

Université de Lille – Faculté des Sciences et Technologies  
Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED446)

**THESE DE DOCTORAT**

Présentée et soutenue publiquement le 11/12/2020 par

**Amélie DECOURCELLE**

Pour l'obtention du titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

---

**Régulation de l'expression d'UNC5A par l'axe OGT-EZH2 :  
une nouvelle connexion entre nutrition, épigénétique et  
cancer colorectal ?**

---

**Composition du jury :**

**Présidente :** Pr. Ikram EL YAZIDI-BELKOURA

**Rapporteurs :** Dr. Patrick MEHLEN  
Dr. Tarik ISSAD

**Examineurs :** Dr. Caroline CIENIEWSKI-BERNARD  
Dr. Eric LELIEVRE

**Directrice de thèse :** Dr. Vanessa DEHENNAUT

Thèse préparée au sein du Laboratoire « CANTHER – UMR9020 CNRS – UMR1277  
Inserm »

« Avoir un mental 100% positif, c'est le secret. La clé de toutes les victoires. »

Mike Horn

# **Remerciements**

## Remerciements

---

Je remercie dans un premier temps les Dr. **Patrick Mehlen** et **Tarik Issad** d'avoir jugé mes travaux en tant que rapporteurs. Mes remerciements vont également aux Dr. **Caroline Cieniewski-Bernard** et **Eric Lelièvre** d'avoir accepté d'être mes examinateurs. Un grand merci aussi au Pr. **Ikram El Yazidi** d'avoir présidé ce jury. J'adresse mes remerciements au Dr. **Caroline Cieniewski-Bernard** et au Pr. **Olivier Coqueret** pour les précieux conseils fournis lors de mes différents comités de suivi de thèse.

Merci au Dr. **Isabelle Van Seuningen** de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et au Pr. **Corinne Abbadie** pour l'accueil dans son équipe.

Je remercie infiniment et j'adresse toute ma gratitude à ma directrice de thèse, le Dr. **Vanessa Dehennaut**. Sans vous, je ne sais pas si j'aurais eu l'ambition d'accéder à la plus haute marche de l'Université. Merci de m'avoir soutenue, encadrée, supportée et fait confiance pendant ces cinq années ! Merci aussi d'avoir sauvé certaines de mes manip... J'ai beaucoup apprécié nos discussions scientifiques mais également celles qui l'étaient beaucoup moins (Pandora, Les Georgettes... et j'en passe) ! Même si certaines manip nous ont donné du fil à retordre, j'espère avoir effectué un travail à la hauteur de vos attentes. Cinq années à vos côtés et pourtant, j'en suis désolée mais le tutoiement n'aura pas eu raison de moi ! Merci pour tout, ça a été un réel plaisir de travailler avec vous !!

J'adresse mes remerciements au Pr. **Tony Lefebvre** sans qui je n'aurais sans doute jamais trouvé de stage de Licence 3. Merci de m'avoir orientée à ce moment-là vers Vanessa.

Merci au Dr. **Dominique Leprince** d'avoir accepté d'être temporairement mon directeur de thèse et merci également pour ses nombreux conseils notamment durant la préparation d'oraux.

Je remercie tous mes **collègues du R+3 de l'Institut de Biologie de Lille ainsi que ceux du service informatique et de la gestion** pour leur gentillesse et leur disponibilité. Merci notamment à **Marie, Martine, Erwan** et **Alexandre** pour nos échanges sur les galères de thésards. Merci aux **personnes de la dent 1** que l'on retrouvait chaque midi à 11h30 (et pas une minute de plus !) pour des pauses déjeuners tout en détente. Je remercie également **Anne-Claire** pour son soutien qui m'a permis de faire face à de nombreuses déconvenues durant certaines manip. Merci à mes collègues de l'équipe « **SENFIB** » : **Nathalie, Grégoire, Gautier, Clémentine, Elise, Albin** et **Olivier** pour leur sympathie. J'adresse un grand merci à **Ingrid** pour son aide dans les manip. Merci aussi pour ta bonne humeur au quotidien. Tes

## Remerciements

---

blagues et tes sous-entendus plus ou moins élégants m'auront bien fait rire et me manqueront très certainement ! Merci aux « **anciens HIC** » : **Nathalie, Souhila** et **Sonia**. Nathalie, vos aventures totalement rocambolesques comme par exemple la cuisson du crabe en maillot de bain sont tout simplement inoubliables et nous auront causé bien des fous rires ! Je vous souhaite une belle retraite pleine de voyages et de parties de golf.

Mes remerciements vont également à l'ensemble de mes collaborateurs. Merci à **Julien, Madjid**, au Pr. **Ikram El Yazidi** et à **Ninon** pour leur aide dans la réalisation des expériences *in vivo*. **Ninon**, nous pouvons désormais le dire : quelle galère ces manip souris ! Nous formions un bon binôme très synchronisé et organisé. Avec ces manip, nous sommes presque passées des rires aux larmes ! Certaines souris nous ont quand même causé bien des ennuis... Et nous ne sommes pas prêtes d'oublier non plus les immunohistochimies faites à échelle quasi industrielle qu'on avait plus que hâte de terminer. Je te souhaite un bel avenir professionnel !

Je remercie aussi le Pr. **Olivier Coqueret** de m'avoir accueillie au sein de son équipe à Angers pour me former à la technique si complexe d'immunoprécipitation de la chromatine et le Dr. **Eric Lelièvre** pour ses avis éclairés à ce sujet. Un grand merci à l'ensemble de l'équipe d'Angers pour son accueil. Je remercie notamment **Coralie** et **Amine** de m'avoir fait une place dans leur bureau et de m'avoir fait découvrir leur belle ville et ses spécialités. J'ai passé d'excellents moments chez vous les angevins ! Je n'oublierai jamais ni notre soirée au James Joyce (les tables se souviennent aussi de notre passage je pense) ni l'apéro sur la Maine à bord de notre petit bateau électrique (fous rires garantis) !

**Mélina** et **Julie**, merci pour toutes nos sorties culinaires qui nous permettaient de se remonter le moral ! Merci de m'avoir supportée durant toutes ces années de fac et surtout d'avoir écouté toutes mes mésaventures dignes de Gaston Lagaffe. Nous voici enfin (presque pour toi Mélina) arrivées au bout de ce long périple qui n'a pas toujours été facile ! Mélina, bon courage pour ta dernière année !

Un immense merci à mes extraordinaires amies de longue date, **Justine** et **Pauline**, pour leur soutien sans faille ! Merci pour les très nombreux moments passés ensemble et notamment nos sorties poney qui m'ont vraiment permis de décompresser ! L'année 2020 est une année très particulière mais marquée quand même par de beaux événements. **Justine** et **Pierre**, je ne suis pas prête d'oublier notre conversation vidéo, confinement oblige, au cours de laquelle vous m'avez demandé d'être la marraine de **Rose** qui est un vrai rayon de soleil.

## Remerciements

---

**Pauline** et **Thomas**, en fin d'année, ce sera à votre tour de devenir parents. Peut-être que votre baby boy décidera de pointer le bout de son nez le jour de ma soutenance. En tout cas, je vous souhaite beaucoup de bonheur !

Merci du fond du cœur aux **familles Raeckelboom, Vittu et Decourcelle**. Quel bonheur de vous avoir dans ma vie ! Nos moments en famille sont tous aussi chaleureux les uns que les autres.

Je remercie **Tata Anne-Marie** pour sa bienveillance notamment durant mes premières années de fac. Merci à mes **grands-parents** et à ma **grand-mère** de m'avoir toujours soutenue et de m'avoir préparé de bons petits plats. Vous avez largement participé à la réussite de mes études ! **Mamie**, des devoirs, ça fait bien longtemps que je n'en ai plus et je ne suis pas en passe de devenir médecin... mais docteur !

Un grand merci à mes deux cousines, **Mildred** et **Bridget**, qui sont comme mes sœurs. Nous nous souviendrons de notre séjour à Sunparks et de nos nombreuses soirées plus ou moins déjantées qui m'ont bien permis de souffler ! Le temps des études est enfin terminé pour moi, à vous de jouer et de briller dans votre domaine !

Je remercie vivement mon frère **Pierre** pour son soutien et son franc-parler. Je sais que mon nombre d'années d'études te donne le vertige mais tu vois, en faisant une année à la fois c'est réalisable... Même si nous sommes comme chien et chat, en réalité nous ne pouvons pas faire l'un sans l'autre ! Bien que je ne cesse de te répéter de lever le pied, je suis fière de toi et de tout ce que tu accomplis !

Merci à mes **beaux-parents** et à ma **belle-sœur** pour leur bonne humeur à toutes épreuves ! Vous me faites toujours beaucoup rire. Je vous remercie de m'avoir si bien intégrée dans votre famille. **Monique** : « don't panic » ! **Christian**, à quand notre prochain semi-marathon (je commanderai le beau temps cette fois-ci) ?! **Marie**, je ne suis pas prête d'oublier la soirée surprise orientale que tu as organisée avec mon frère et encore moins l'entrée fracassante que vous avez faite ! Je me souviendrai toujours aussi de notre virée dansante lilloise avec Pierre et Clément... du « grand nimp » ! Je te souhaite bon courage pour ton Master, je suis confiante pour toi et promis nous viendrons te voir à La Rochelle !

J'exprime toute ma reconnaissance à mes **parents** qui m'ont constamment poussée plus haut ! La route a été longue et semée d'embûches mais vous avez toujours été là pour moi même si j'ai parfois beaucoup râlé pour rien. Il est enfin temps pour moi de quitter

## *Remerciements*

---

l'Université et de me lancer dans le « vrai » monde professionnel. Vous êtes pour moi un exemple de force, de détermination et de courage ! Je vous remercie de l'éducation et des principes que vous m'avez inculqués. Vous êtes des parents parfaits, merci pour tout ! Et continuez de profiter de la vie comme vous le faites déjà si bien !

**Clément**, jamais je n'aurais pensé vivre une histoire d'amour aussi épanouissante et évidente ! Il est difficile de te remercier à la hauteur de tout le soutien que tu m'as apporté ces derniers mois. Tu as toujours su me reconforter dans les moments de doutes et tu as toujours été très indulgent certains jours de grande fatigue et d'irritabilité. L'épreuve de la rédaction de mon introduction en mode confinement a été réalisée avec brio grâce à toi qui savais me sortir de mon plaid et me faire éteindre mon ordinateur pour prendre l'air ! Tous nos séjours plus ou moins insolites m'ont aussi largement aidée à garder le cap. Je t'aime et vraiment merci pour tout ! Désormais, le temps est venu pour nous de réaliser nos projets et Dieu sait qu'on déborde d'idées...

# **Avant-propos**

*Cette thèse de doctorat a été réalisée au sein du laboratoire « CANTHER – UMR9020 CNRS – UMR1277 Inserm » dirigé par le Dr. Isabelle Van Seuningen dans l'équipe « Sénescence, Fibrose et Cancer » conduite par le Pr. Corinne Abbadie. Ce travail a été effectué sous la direction du Dr. Vanessa Dehennaut et financé par l'Université de Lille.*

### **Cursus académique :**

#### **2017 - 2020 :**

Préparation de la **Thèse de Doctorat** spécialité « Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie » - Université de Lille.

#### **2016 - 2017 :**

**Master 2 Recherche Biologie Santé** option thématique « Oncologie fondamentale et clinique » - Université de Lille - Mémoire de recherche : « **Etude de la régulation de l'activité du Complexe Répresseur Polycomb 2 (PRC2) par O-GlcNAcylation dans un contexte de cancer colorectal** » sous la direction du Dr. Vanessa Dehennaut.

#### **2015 - 2016 :**

**Master 1 Biologie Santé** parcours Biologie Cellulaire - Université de Lille.

#### **2012 - 2015 :**

**Licence Biologie Cellulaire et Physiologie** - Université de Lille.

### **Publications scientifiques dans des revues à comité de lecture :**

1. **Decourcelle A**, Very N, Djouina M, Loison I, Thevenet J, Body-Malapel M, Lelievre E, Coqueret E, Leprince D, El Yazidi-Belkoura I, Dehennaut V. *O-GlcNAcylation links nutrition to the epigenetic downregulation of *UNC5A* during colon carcinogenesis. Cancers.* **2020** Oct 28;12(11):3168.
2. **Decourcelle A**, Loison I, Baldini S, Leprince D, Dehennaut V. Evidence of a compensatory regulation of colonic *O-GlcNAc* transferase and *O-GlcNAcase* expression in response to disruption of *O-GlcNAc* homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.* **2020** Jan 1;521(1):125-30.
3. **Decourcelle A**, Leprince D, Dehennaut V. Regulation of Polycomb Repression by *O-GlcNAcylation*: Linking Nutrition to Epigenetic Reprogramming in Embryonic Development and Cancer. *Front Endocrinol.* **2019**;10:117.

### **Communications orales et « flashtalks » :**

1. **Amélie Decourcelle « Régulation de l'expression d'UNC5A par l'axe OGT/EZH2 : une nouvelle connexion entre nutrition, épigénétique et cancer colorectal ? »** - Journée annuelle de l'axe 1 du Cancéropôle Nord-Ouest - 3 novembre 2020 - Lille.
2. **Amélie Decourcelle « Regulation of the expression of UNC5A by the OGT-EZH2 axis »** - 19ème édition de la journée des Doctorants (conférence annuelle des doctorants) - 10 septembre 2019 - Lille.
3. **Amélie Decourcelle « The OGT-EZH2 axis regulates the expression of UNC5A in colon cancer cells »** - Journée des Doctorants du Laboratoire CANTHER - 7 mars 2019 - Lille.

### **Communications par affiche :**

1. **Amélie Decourcelle, Ingrid Loison, Dominique Leprince et Vanessa Dehennaut « Régulation de l'expression d'UNC5A par l'axe OGT-EZH2 : une nouvelle connexion entre nutrition, épigénétique et cancer colorectal ? »** - 12èmes Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest - 15 au 17 mai 2019 - Deauville.
2. **Amélie Decourcelle, Ingrid Loison, Steffi Baldini, Dominique Leprince et Vanessa Dehennaut « Régulation de l'expression d'UNC5A par l'axe OGT-EZH2 : une nouvelle connexion entre nutrition, épigénétique et cancer colorectal ? »** - 11èmes Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest - 23 au 25 mai 2018 - Deauville.

### **Activités d'enseignement :**

#### **2018 - 2020 :**

Enseignements effectués pour le département de Biologie de la Faculté des Sciences et Technologies de l'Université de Lille à raison de 64h Eq.TD/an :

- Licence Sciences de la Vie (TD et TP) : embryologie animale précoce, apports des modèles animaux, plasticité cellulaire et ontogenèse animale et rapport thématique.

### **Autres activités :**

#### **2019 :**

**Mobilité de deux mois à l'Institut de Cancérologie de l'Ouest Paul Papin (Angers) dans l'équipe du Pr. Olivier Coqueret - Mobilité financée par une bourse du Cancéropôle Nord-Ouest.**

#### **2017 :**

**Attestation Universitaire d'Enseignement Complémentaire : Formation à l'expérimentation animale « Personnel concevant (ex-niveau 1) des procédures expérimentales (hors chirurgie) » - Université de Lille.**

*Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressée au fait que la régulation de l'expression d'UNC5A par l'axe OGT/EZH2 puisse représenter une nouvelle connexion entre la nutrition, l'épigénétique et le cancer colorectal. Parallèlement, j'ai mis en évidence la régulation compensatoire de l'expression colique de l'OGT et de l'OGA en réponse à des perturbations de l'homéostasie de O-GlcNAcylation. Dans la partie « Introduction », des notions sur le cancer colorectal, le complexe PRC2, le récepteur UNC5A et la O-GlcNAcylation seront introduites. Le concept de maintien de l'homéostasie de O-GlcNAcylation sera quant à lui présenté dans la deuxième partie de la section « Travaux personnels ».*

# Résumé

Si de nombreuses études soutiennent l'existence d'une relation étroite entre les désordres nutritionnels, les modifications épigénétiques et l'étiologie du cancer colorectal (CCR), les mécanismes sous-jacents restent à éclaircir. Les gènes suppresseurs de tumeurs de la famille *UNC5H* (*UNC5A*, *B*, *C* et *D*) qui codent des récepteurs membranaires contrôlant la balance survie/apoptose font partie des gènes fréquemment réprimés au cours de la carcinogenèse colique par des mécanismes épigénétiques encore peu compris. Dans le modèle murin de carcinogenèse colique AOM/DSS, nous avons montré que l'expression d'*UNC5A*, *UNC5B* et *UNC5C* était diminuée dans les tumeurs mais exclusivement chez les souris soumises à un régime riche en sucres (HCD) durant toute la durée de l'expérience, reliant ainsi la nutrition à leur perte d'expression dans le CCR. La *O*-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle ciblant des milliers de protéines nucléocytoplasmiques et mitochondriales intervenant dans divers processus cellulaires fondamentaux parmi lesquels la régulation épigénétique de l'expression génique et dont les niveaux sont augmentés au cours de la carcinogenèse colique. Les niveaux de *O*-GlcNAcylation dépendent étroitement du nucléotide sucre donneur de la réaction, l'UDP-GlcNAc, qui lui-même est au carrefour de plusieurs métabolismes définissant cette glycosylation comme un senseur nutritionnel. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la *O*-GlcNAcylation puisse représenter un des relais moléculaires entre la nutrition et la répression des gènes de la famille *UNC5H* au cours de la carcinogenèse colique. Dans des cellules cancéreuses coliques humaines, par une combinaison d'approches incluant inhibitions pharmacologiques et interférence à l'ARN couplées à des analyses en RT-qPCR et à des tests d'activité promotrice, nous avons montré l'action conjointe de la *O*-GlcNAcylation et d'EZH2 (la sous-unité catalytique du complexe PRC2 responsable du dépôt de la marque épigénétique répressive H3K27Me3) dans la régulation de l'expression d'*UNC5A*. Plus précisément, des expériences de CUT&RUN nous ont permis de prouver que la *O*-GlcNAcylation d'EZH2 permet son recrutement sur le promoteur d'*UNC5A* afin de réprimer sa transcription. L'ensemble de nos résultats soutiennent donc l'hypothèse selon laquelle la *O*-GlcNAcylation pourrait représenter une nouvelle connexion entre la nutrition et la régulation épigénétique de gènes suppresseurs de tumeurs clés régissant la cancérisation de la muqueuse colique.

**Mots clés : OGT - EZH2 - UNC5A - Nutrition - Epigénétique - Cancer colorectal**

# **Abstract**

Although many studies support a close relationship between nutritional disorders, epigenetic changes and the etiology of colorectal cancer (CRC), the underlying mechanisms remain to be elucidated. The *UNC5H* tumor suppressor genes (*UNC5A, B, C and D*) that code for membrane receptors controlling the survival/apoptosis balance are among the genes frequently repressed during colonic carcinogenesis by epigenetic mechanisms that are still poorly understood. In the AOM/DSS mouse model of colonic carcinogenesis, we showed that *UNC5A, UNC5B* and *UNC5C* expression was decreased in tumors but exclusively in mice subjected to a High Carbohydrate Diet (HCD) during all the time course of the experiment, thus linking nutrition to their repression in CRC. *O*-GlcNAcylation is a post-translational modification targeting thousands of nucleocytoplasmic and mitochondrial proteins involved in various fundamental cellular processes including epigenetic regulation of gene expression and whose levels are increased during colonic carcinogenesis. *O*-GlcNAcylation levels depend of UDP-GlcNAc, the sugar nucleotide donor of the reaction, which itself is at the crossroad of several metabolisms, thus defining this glycosylation as a nutritional sensor. In this context, we hypothesized that *O*-GlcNAcylation could be one of the molecular relays between nutrition and *UNC5H* genes repression during colonic carcinogenesis. In human colon cancer cells, by using a combination of pharmacological inhibitions and siRNA approaches coupled to RT-qPCR analyses and promoter activities studies, we showed that *O*-GlcNAcylation and EZH2 (the catalytic subunit of the PRC2 complex responsible for the deposition of the epigenetic repressive mark H3K27Me3) act jointly to repress *UNC5A* expression. More precisely, by CUT&RUN experiments, we demonstrated that *O*-GlcNAcylation of EZH2 allows its recruitment onto the *UNC5A* promoter to repress its transcription. To conclude, all these results confirm the hypothesis that *O*-GlcNAcylation could be a new connection between nutrition and epigenetic regulation of tumor suppressor genes governing the cancerization of the colonic mucosa.

**Key words: OGT - EZH2 - UNC5A - Nutrition - Epigenetics - Colorectal cancer**

# **Abréviations**

**3'UTR** : 3'UnTranslated Region

**5caC** : 5-carboxylcytosine

**5fC** : 5-formylcytosine

**5-FU** : 5-Fluoro-Uracile

**5hmC** : 5-hydroxyméthylcytosine

**5mC** : 5-méthylcytosine

**6AzGlcNAc** : 6-azido-6-deoxy-N-Acetyl-Glucosamine

**AceCS1** : Acetyl-CoA Synthetase 1

**ALK** : Anaplastic Lymphoma Kinase

**AOM** : Azoxyméthane

**AOS** : Syndrome d'Adam-Olivers

**APC** : Adenomatous Polyposis Coli

**ARC** : Apoptosis Repressor with Caspase recruitment domain

**BAM** :  $\beta$ -Addition Motif

**C2** : C2 domain

**CAMK** : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase

**CAMKII** : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II

**CAZy** : Carbohydrate-Active enZymes

**CCR** : Cancer ColoRectal

**CDON** : Cell-adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes

**Chk1** : Checkpoint kinase 1

**CID** : Collision Induced Dissociation

**CIMP** : Phénotype de méthylation des îlots CpG

**CIN** : Chromosomal instability

**circRNA** : ARN non codant circulaire

**CK1 $\alpha$**  : Caséine Kinase 1 $\alpha$

**CK2** : Caséine Kinase 2

**CMS** : Consensus Molecular Subtypes

**CXC** : CXC domain

**CXCR4** : C-X-C chemokine receptor 4

**DAPK** : Death-Associated Protein Kinase

**DB** : DCC-Binding

**D-box** : Boite de destruction

**DCC** : Deleted in Colorectal Carcinoma

**DNMTs** : ADN méthyltransférases

**dRAF** : dRING-associated factors

**DSS** : Dextran Sodium Sulfate

**DZNep** : 3-déazaneplanocine A

**E(z)** : Enhancer of Zeste

**EBD** : EED-binding domain

**ECD** : Electron-Capture Dissociation

**EGCG** : EpiGalloCatechin-3-Gallate

**EGF** : Epidermal Growth Factor

**EGF-like** : Epidermal Growth Factor like

**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor

**EOGT** : EGF domain-specific O-GlcNAc Transferase

**EphA4** : Ephrin type A receptor 4

**Esc** : Extra sex combs

**ETD** : Electron-Transfer Dissociation

**EZH2** : Enhancer of Zeste Homolog

**F6P** : Fructose-6-P

**Fz** : Frizzled

**GalNAz** : N-AzidoacétylGalactosamine

**GFAT** : Glutamine Fructose-6-phosphate AmidoTransférase

**GK** : Glucokinase

**Glc** : Glucose

**Glc6P** : Glucose-6-Phosphate

**GlcN6P** : Glucosamine-6-Phosphate

**GlcNAc** : N-AcétylGlucosamine

**GlcNAc1P** : N-Acétylglucosamine-1-P

**GlcNAc6P** : N-Acétylglucosamine-6-P

**Globin1** : OGT bisubstrate-linked inhibitor 1

**GNK** : GlcNAc Kinase

**GNPNAT** : Glucosamine-Phosphate N-AcétylTransférase

**GPI** : Glucose-6-Phosphate Isomérase

**GSK3 $\beta$**  : Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$

**H2AK119Ub** : Ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A

**H3K27Me3** : Triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3

**H3K9Ac** : Acétylation de la lysine 9 de l'histone H3

**H3R17Me2** : Diméthylation de l'arginine 17 de l'histone H3

**H3S10P** : Phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3

**HBP** : Voie de biosynthèse des hexosamines

**HCD** : Higher-energy Collisional Dissociation

**HCF-1** : Host Cell Factor-1

**HDAC** : Histone Déacétylase

**HFD** : High Fat Diet

**HIC1** : Hypermethylated In Cancer 1

**HK** : HexoKinase

**HNF1A** : Hepatocyte Nuclear Factor 1 homologue A

**HNPCC** : Syndrome de Lynch

**HOTAIR** : HOX Antisense Intergenic RNA

**hPCL3L** : Longest isoform of human Polycomb-Like 3

**HUVECs** : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

**ICAM-1** : IntraCellular Adhesion Molecule 1

**IGF-1R** : Insulin-like Growth Factor 1 Receptor

**IR** : Insulin Receptor

**ISS** : Intronic Splicing Silencer

**ITGA5** : Intégrine  $\alpha$ 5

**JMJD3** : Jumonji domain containing 3

**JNK** : c-Jun N-term Kinase

**LIP** : Liver-enriched Inhibitor Protein

**lncRNAs** : Longs ARNs non codants

**MAGE** : Melanoma antigen

**MALAT1** : Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1

**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase

**MCM** : MiniChromosome Maintenance

**MCR** : Metabolic Chemical Reporters

**MCSS** : Motif Connecting SANT1 and SANT2

**MDM2** : Murine Double Minute 2  
**MEF2** : Myocyte Enhancer Factor 2  
**Mge5a** : Meningioma expressed antigen 5  
**MLL5** : Mixed Lineage Leukemia 5  
**MMR** : MisMatch Repair  
**mOGT** : OGT mitochondriale  
**MPF** : M-Phase-Promoting Factor  
**MSI** : Instabilité microsatellitaire  
**MSS** : Stabilité des microsatellites  
**MYPT1** : Myosin Phosphatase Targeting protein 1

**NAGK** : N-Acetyl-D-Glucosamine Kinase  
**NCOAT** : Nuclear Cytoplasmic O-GlcNAcase and AcetylTransferase  
**ncOGT** : OGT nucléocytoplasmique  
**NLS** : Nuclear Localisation Sequence  
**Nurf55** : Nucleosome remodeling factor 55

**OGA** : O-linked  $\beta$ -N-acétyl-D-GlucosAminidase ou O-GlcNAcase  
**OGT** : O-linked  $\beta$ -N-acétyl-D-GlucosaminyITransférase ou O-GlcNAc Transférase  
**OIP106** : OGT-interacting protein

**p75NTR** : p75 NeuroTrophin Receptor  
**PAF** : PCNA-associated factor  
**PAF** : Polypose Adénomateuse Familiale  
**PCAF** : P300/CBP-Associated Factor  
**PCAT6** : Prostate cancer-associated ncRNA transcript 6  
**PCL** : Polycomb-like  
**PDK1** : Phosphatidylinositol-Dependent protein Kinase 1  
**PGC-1 $\alpha$**  : Peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$   
**PGM3** : Phosphoglucomutase-3  
**PHF1** : hPCL1 human Polycomb-Like 1  
**PHORC** : PHO Repressive Complex 1  
**PI(3,4,5)P<sub>3</sub>** : Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate  
**PI3K** : Phosphoinositide 3-Kinase  
**PIGF** : Placental Growth Factor  
**PIP2** : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate  
**PIP3** : Phosphatidylinositol-4,5-triphosphate  
**PKA** : Protein Kinase A  
**PP2A** : Protein Phosphatase 2A  
**PRC1** : Polycomb Repressive Complex 1  
**PRC2** : Polycomb Repressive Complex 2  
**PR-DUB** : Polycomb Repressive DeUBiquitinase  
**PRE** : Polycomb Response Element  
**PTEN** : Phosphatase and Tensin homolog  
**PVL** : Psathyrella Velutina Lectin

**RBP** : Protéine de liaison à l'ARN  
**RHPN1-AS1** : Rhophilin Rho GTPase binding protein 1 antisense RNA 1  
**RING1A/B** : RING Finger Protein 1A/B  
**RRCECs** : Rat Retinal Capillary Endothelial Cells

**SAH** : S-Adénosylhomocystéine  
**SAL** : SET Activation Loop  
**SAM** : S-adénosyl méthionine  
**SANT1** : Swi3, Ada2, N-CoR and TFIIB DNA-binding domain 1 like  
**SANT2** : SANT2-like

**SBD** : SANT1L-binding domain  
**SEC** : SECRET AGENT  
**SET** : Su(var)3-9, E(z) and Trx domain  
**sOGT** : OGT courte  
**Sp1** : Specificity protein 1  
**SPY** : SPINDLY  
**SREBP2** : Sterol Regulatory Element Binding Protein 2  
**SRM** : Stimulation-Responsive Motif  
**STAT3** : Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
**Su(z)12** : Suppressor of zeste 12  
**Sxc** : Super sex combs

**TCF/LEF** : T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor  
**TET** : Ten-Eleven Translocation  
**Thiamet-G** : thiazoline amino ethyl gluco-configured  
**TIE2** : Tyrosine kinase with Immunoglobulin and EGF homology domains  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor  
**TPR** : répétitions tétratricopeptides  
**TrkA/TrkC** : Tropomyosin Receptor kinase A/C  
**TR $\alpha$**  : Thyroid hormone receptor  $\alpha$   
**TWD** : Total Western Diet

**UAP1** : UDP-N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylase  
**UAP1** : UDP-N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylase-1  
**UAP1L1** : UDP-N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylase-1-Like-1  
**UDP-GlcNAc** : Uridine-DiPhosphate-N-AcetylGlucosamine  
**UNC5A** : Uncoordinated 5A  
**UNC5C** : Uncoordinated 5C  
**UNC5H** : Uncoordinated 5 Homolog  
**UTX** : Ubiquitously Transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome

**VEFS** : VRN2-EMF2-FIS2-Su(z)12 box  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VEGF-A** : Vascular endothelial growth factor-A

**WD** : WD-repeat region  
**WDB1** : WD-domain binding 1  
**WDB2** : WD-domain binding 2  
**WGA** : Wheat Germ Agglutinin

**XIAP** : X-linked Inhibitor of apoptosis  
**XIC** : Centre d'inactivation du chromosome X  
**Xist** : X inactive specific transcripts

**YY1** : Yin Yang 1

**Zn** : Zn Finger  
**ZnB** : Zn Finger binding domain  
**ZU5** : Zona Occludens 5

# Listes des figures et des tableaux

## Liste des figures :

|  |    |
|--|----|
| <b>Figure 1 :</b> Altérations génétiques du CCR. _____   | 3  |
| <b>Figure 2 :</b> Voie de signalisation Wnt- $\beta$ -caténine. _____  | 4  |
| <b>Figure 3 :</b> Voies de signalisation associées aux récepteurs à activité tyrosine kinase. _____  | 6  |
| <b>Figure 4 :</b> Régulation de la stabilité de p53 par MDM2. _____  | 7  |
| <b>Figure 5 :</b> Dérégulations épigénétiques retrouvées dans le CCR. _____  | 8  |
| <b>Figure 6 :</b> Notion de writer, eraser et reader. _____  | 13 |
| <b>Figure 7 :</b> Les complexes Polycomb chez l'Homme. _____   | 14 |
| <b>Figure 8 :</b> Organisation des domaines protéiques d'EZH2, SUZ12, EED et RbAp46/48. ____   | 16 |
| <b>Figure 9 :</b> Le complexe PRC2 existe sous deux formes distinctes : le PRC2.1 et le PRC2.2. _  | 17 |
| <b>Figure 10 :</b> La triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 est une modification réversible.<br>_____   | 18 |
| <b>Figure 11 :</b> Recrutement du complexe PRC2 à la chromatine. _____   | 23 |
| <b>Figure 12 :</b> Les miRNA et les lncRNA participent à la dérégulation de l'expression d'EZH2<br>dans le cancer colorectal. _____                            | 29 |
| <b>Figure 13 :</b> Inhibiteurs d'EZH2. _____   | 32 |
| <b>Figure 14 :</b> Notion de récepteur à dépendance. _____   | 34 |
| <b>Figure 15 :</b> Mécanismes permettant à une cellule tumorale d'échapper à l'activité pro-<br>apoptotique induite par les récepteurs à dépendance. _____     | 36 |
| <b>Figure 16 :</b> Structure de la nétrine-1 et des récepteurs UNC5H. _____  | 37 |
| <b>Figure 17 :</b> Signalisation pro-apoptotique induite par les récepteurs UNC5H en absence de<br>nétrine-1. _____  | 40 |
| <b>Figure 18 :</b> La nétrine-1 et les récepteurs à dépendance dans le guidage axonal. _____   | 42 |
| <b>Figure 19 :</b> DCC/UNC5H et la nétrine-1 contrôlent l'homéostasie intestinale. _____   | 43 |
| <b>Figure 20 :</b> La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle réversible des<br>protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales. _____ | 51 |
| <b>Figure 21 :</b> Relations entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation. _____   | 54 |
| <b>Figure 22 :</b> Structure des trois isoformes de l'OGT. _____   | 57 |
| <b>Figure 23 :</b> L'OGT O-GlcNAcyle et clive sa protéine cible HCF-1. _____   | 61 |
| <b>Figure 24 :</b> Régulation de l'OGT. _____  | 62 |
| <b>Figure 25 :</b> HNF1A régule la transcription de l'OGT et semble participer au maintien de<br>l'homéostasie de O-GlcNAcylation. _____                       | 64 |

## Listes des figures et des tableaux

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 26 :</b> L'expression de l'OGT est régulée par un processus de rétention d'intron en réponse à des modulations des niveaux de O-GlcNAcylation. _____  | 66  |
| <b>Figure 27 :</b> Structure des deux isoformes de l'OGA. _____   | 70  |
| <b>Figure 28 :</b> La voie de biosynthèse des hexosamines (voie HBP). _____   | 74  |
| <b>Figure 29 :</b> L'Ac5S-GlcNAc inhibe l'OGT. _____  | 78  |
| <b>Figure 30 :</b> Utilisations de la lectine (s)WGA pour l'enrichissement et la détection des protéines O-GlcNAcylées. _____   | 80  |
| <b>Figure 31 :</b> Principe de la Click-Chemistry. _____  | 83  |
| <b>Figure 32 :</b> Les niveaux de O-GlcNAcylation fluctuent au cours du cycle cellulaire. _____   | 86  |
| <b>Figure 33 :</b> La maturation des ovocytes de xénope est perturbée par des modulations des niveaux de O-GlcNAcylation. _____   | 87  |
| <b>Figure 34 :</b> La O-GlcNAcylation régule des protéines impliquées dans le contrôle et la progression du cycle cellulaire. _____   | 89  |
| <b>Figure 35 :</b> La O-GlcNAcylation régule l'activité de l'ARN polymérase II en modifiant son domaine C-terminal (CTD). _____   | 91  |
| <b>Figure 36 :</b> La O-GlcNAcylation régule positivement et négativement l'activité du facteur de transcription Sp1. _____   | 93  |
| <b>Figure 37 :</b> La O-GlcNAcylation régule les protéines TET. _____   | 96  |
| <b>Figure 38 :</b> La O-GlcNAcylation régule HDAC4. _____   | 100 |
| <b>Figure 39 :</b> La O-GlcNAcylation régule les propriétés des protéines Polycomb chez la drosophile. _____  | 102 |
| <b>Figure 40 :</b> La O-GlcNAcylation régule les propriétés des protéines Polycomb chez l'Homme. _____  | 105 |
| <b>Figure 41 :</b> L'altération de l'homéostasie de O-GlcNAcylation module les propriétés de nombreuses protéines impliquées dans la tumorigenèse colique. _____  | 111 |
| <b>Figure 42 :</b> Acteurs de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B modifiés par O-GlcNAcylation. _____   | 113 |
| <b>Figure 43 :</b> Hypothèse de travail. _____  | 117 |
| <b>Figure 44 :</b> Le régime HCD aggrave les processus de cancérogenèse colique. _____  | 120 |
| <b>Figure 45 :</b> L'expression d' <i>UNC5A</i> , <i>UNC5B</i> et <i>UNC5C</i> est réprimée dans les tumeurs coliques mais uniquement chez les souris soumises à un régime riche en sucres et est corrélée à une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation. _____ | 122 |
| <b>Figure 46 :</b> La O-GlcNAcylation est impliquée dans la régulation de la transcription d' <i>UNC5A</i> dans les cellules cancéreuses coliques HCT116. _____   | 124 |

## *Listes des figures et des tableaux*

---

**Figure 47 :** L'OGT et EZH2 participent conjointement à la répression de la transcription d'*UNC5A* dans les cellules cancéreuses coliques. \_\_\_\_\_ 127

**Figure 48 :** La O-GlcNAcylation régule la transcription d'*UNC5A* via le complexe PRC2 dans les cellules cancéreuses coliques HCT116. \_\_\_\_\_ 128

**Figure 49 :** Dans les cellules cancéreuses coliques, la O-GlcNAcylation n'influence ni la stabilité ni la stabilité d'EZH2, ni son activité, ni son interaction avec SUZ12 mais permet son recrutement sur le promoteur d'*UNC5A*. \_\_\_\_\_ 132

**Figure 50 :** Les variations du flux de la voie HBP et l'inhibition de l'expression ou de l'activité de l'OGT et de l'OGA mènent à des variations d'expression compensatoire de ces deux enzymes. \_\_\_\_\_ 164

### **Liste des tableaux :**

**Tableau 1 :** Les lncRNA, miRNA et les ARN circulaires régulent l'expression d'EZH2 et sont impliqués dans la progression tumorale colique. \_\_\_\_\_ 27

**Tableau 2 :** Sites de O-GlcNAcylation des histones H2A, H2B, H3 et H4. \_\_\_\_\_ 97

# **Table des matières**

|   |    |
|---|----|
| <b>INTRODUCTION :</b>   | 1  |
| <b>Partie I : Le cancer colorectal</b>                                | 1  |
| <b>I. Généralités :</b>   | 1  |
| 1) Epidémiologie :  | 1  |
| 2) Les différentes formes de cancer colorectal :                      | 1  |
| 3) Les facteurs de risques :  | 2  |
| <b>II. Altérations du cancer colorectal :</b>                         | 3  |
| 1) Anomalies génétiques :   | 3  |
| 2) Anomalies épigénétiques :  | 7  |
| 3) Classification du cancer colorectal :                              | 9  |
| 4) Les différents traitements :                                       | 10 |
| <b>Partie II : Le Complexe Répresseur Polycomb 2 (PRC2)</b>           | 12 |
| <b>I. Histoire et généralités :</b>                                   | 12 |
| <b>II. Structure et fonctions du Complexe Répresseur Polycomb 2 :</b> | 14 |
| 1) Composition et organisation du complexe :                          | 14 |
| 2) Activité histone méthyltransférase d'EZH2 :                        | 17 |
| 3) Recrutement du complexe PRC2 à la chromatine :                     | 18 |
| 1. Propriétés des régions fixées :                                    | 18 |
| 2. Influence des modifications des histones :                         | 19 |
| 3. Relation réciproque PRC1/PRC2 :                                    | 19 |
| 4. Partenaires d'interaction :  | 20 |
| 5. Modifications post-traductionnelles d'EZH2 :                       | 21 |
| 4) Fonctions physiologiques d'EZH2 :                                  | 23 |
| <b>III. Implications du complexe PRC2 dans le CCR :</b>               | 24 |
| 1) Les différentes dérégulations du complexe PRC2 :                   | 24 |
| 1. Surexpression des membres du complexe PRC2 :                       | 24 |

|   |   |       |                 |
|---|---|-------|-----------------|
| 2.  | Augmentation du recrutement du complexe PRC2 à la chromatine :            | _____ | 27              |
| 3.  | Fonctions d'EZH2 indépendantes du complexe PRC2 :                         | _____ | 30              |
| 2)  | EZH2 comme cible thérapeutique :  | _____ | 30              |
| 1.  | Inhibiteurs pharmacologiques :  | _____ | 30              |
| 2.  | Composés naturels :   | _____ | 32              |
| <b>Partie III : Les récepteurs à dépendance de la famille UNC5H</b> |   |       | <b>_____ 34</b> |
| <b>I. Généralités sur les récepteurs à dépendance :</b>             |   |       | <b>_____ 34</b> |
| <b>II. Les récepteurs à dépendance de la famille UNC5H :</b>        |   |       | <b>_____ 36</b> |
| 1)  | Structure et expression des récepteurs UNC5H :                            | _____ | 36              |
| 2)  | Signalisations induites par les récepteurs UNC5H :                        | _____ | 38              |
| 1.  | La signalisation positive :   | _____ | 38              |
| 2.  | La signalisation négative :   | _____ | 38              |
| i.  | Régulation du switch signal « positif » / signal « négatif » :            | _____ | 38              |
| ii.   | Clivage par les caspases et recrutement de partenaires pro-apoptotiques : | __    | 39              |
| 3)  | Rôles physiologiques des récepteurs UNC5H :                               | _____ | 40              |
| 1.  | Rôle dans le développement du système nerveux central :                   | _____ | 40              |
| 2.  | Rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale chez l'adulte :        | _____ | 42              |
| <b>III. Les récepteurs UNC5H et la nétrine-1 dans le cancer :</b>   |   |       | <b>_____ 44</b> |
| 1)  | Dérégulations des récepteurs UNC5H :                                      | _____ | 44              |
| 1.  | UNC5A et cancer :   | _____ | 44              |
| 2.  | UNC5B et cancer :   | _____ | 45              |
| 3.  | UNC5C et cancer :   | _____ | 46              |
| 4.  | UNC5D et cancer :   | _____ | 46              |
| 2)  | Dérégulations des partenaires pro-apoptotiques :                          | _____ | 47              |
| 3)  | Dérégulations de la nétrine-1 :   | _____ | 48              |
| 4)  | UNC5H et la nétrine-1 comme cibles thérapeutiques :                       | _____ | 48              |
| <b>Partie IV : La O-GlcNAcylation</b>                               |   |       | <b>_____ 50</b> |

|   |    |
|---|----|
| <b>I. Histoire et généralités :</b>   | 50 |
| 1) La O-GlcNAcylation : une modification post-traductionnelle conservée et abondante :      | 50 |
| 2) Interaction entre la O-GlcNAcylation et les autres modifications post-traductionnelles : | 52 |
| 1. Relation entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation :                                | 52 |
| 2. Relation entre la O-GlcNAcylation et les autres modifications post-traductionnelles :    | 54 |
| 3) L'EOGT : une nouvelle O-GlcNAc Transférase :   | 55 |
| <b>II. La O-GlcNAc Transférase :</b>  | 56 |
| 1) Structure de l'OGT :   | 56 |
| 1. Le domaine N-terminal :  | 57 |
| 2. Le domaine C-terminal :  | 59 |
| 2) Activités enzymatiques de l'OGT :  | 60 |
| 1. Activité glycosyltransférase : mécanismes de reconnaissance du substrat :                | 60 |
| 2. Activité protéolytique :   | 61 |
| 3) Régulation de l'OGT :  | 61 |
| 1. Régulation transcriptionnelle :  | 63 |
| 2. Régulation post-transcriptionnelle :   | 64 |
| 3. Régulation post-traductionnelle :  | 66 |
| 4. Disponibilité du substrat donneur :  | 68 |
| 5. Protéines modulatrices et interactions avec des partenaires :                            | 68 |
| <b>III. La O-GlcNAcase :</b>  | 68 |
| 1) Structure de l'OGA :   | 69 |
| 2) L'activité catalytique de l'OGA :  | 70 |
| 3) Régulation de l'OGA :  | 71 |
| <b>IV. La O-GlcNAcylation : un senseur nutritionnel :</b>                                   | 72 |

|   |           |
|---|-----------|
| 1) La voie de biosynthèse des hexosamines, source de l'UDP-GlcNAc : _____                                     | 72        |
| 2) Régulation nutritionnelle des mécanismes de O-GlcNAcylation : _____  | 75        |
| 1. La disponibilité en glucose module les niveaux de O-GlcNAcylation : _____                                  | 75        |
| 2. La disponibilité en glucosamine, glutamine et en acides gras module les niveaux de O-GlcNAcylation : _____ | 76        |
| <b>V. Les outils d'étude de la O-GlcNAcylation : _____</b>  | <b>77</b> |
| 1) Les inhibiteurs pharmacologiques : _____   | 77        |
| 1. Les inhibiteurs de l'OGT : _____   | 77        |
| 2. Les inhibiteurs de l'OGA : _____   | 78        |
| 2) Les méthodes de détection et d'enrichissement des protéines O-GlcNAcylées : _____                          | 79        |
| 1. Les lectines : _____   | 79        |
| 2. Les anticorps anti-O-GlcNAc : _____  | 81        |
| 3. La « Click-Chemistry » : _____   | 81        |
| 3) La spectrométrie de masse : _____  | 83        |
| <b>VI. Régulation des processus cellulaires fondamentaux par O-GlcNAcylation : _____</b>                      | <b>85</b> |
| 1) O-GlcNAcylation et cycle cellulaire : _____  | 85        |
| 1. Les niveaux de O-GlcNAcylation fluctuent au cours du cycle cellulaire : _____                              | 85        |
| 2. La modulation des niveaux de O-GlcNAcylation perturbe la progression normale du cycle cellulaire : _____   | 86        |
| 3. La O-GlcNAcylation régule des protéines impliquées dans le cycle cellulaire : _____                        | 87        |
| 2) O-GlcNAcylation et transcription : _____   | 89        |
| 1. O-GlcNAcylation et ARN polymérase II : _____   | 89        |
| 2. O-GlcNAcylation et facteurs de transcription : _____   | 91        |
| i. La O-GlcNAcylation régule Sp1 : _____  | 91        |
| ii. La O-GlcNAcylation régule NF- $\kappa$ B : _____  | 94        |
| 3) O-GlcNAcylation et épigénétique : _____  | 94        |

|   |            |
|---|------------|
| 1. La O-GlcNAcylation régule les protéines TET : _____  | 95         |
| 2. L'OGT fait partie du code des histones : _____   | 96         |
| 3. L'OGT régule les protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles des histones : _____                            | 98         |
| i. La O-GlcNAcylation régule les HDACs : _____  | 98         |
| ii. L'OGT régule l'histone méthyltransférase MLL5 : _____   | 100        |
| iii. L'OGT régule les protéines du groupe Polycomb : _____  | 100        |
| Les protéines Polycomb sont régulées par O-GlcNAcylation chez la drosophile : _____   | 101        |
| Les protéines Polycomb sont régulées par O-GlcNAcylation chez les mammifères : _____  | 102        |
| <b>VII. O-GlcNAcylation et CCR : _____</b>  | <b>106</b> |
| 1) Altération de l'homéostasie de O-GlcNAcylation et régulation des propriétés des cellules cancéreuses coliques : _____              | 106        |
| 1. Dérégulation de l'expression de l'OGT et des niveaux de O-GlcNAcylation : _  | 106        |
| 2. La O-GlcNAcylation régule de nombreuses « hallmarks » du CCR : _____   | 107        |
| 2) Régulation par O-GlcNAcylation de protéines impliquées dans les propriétés des cellules cancéreuses coliques : _____               | 109        |
| 1. O-GlcNAcylation et $\beta$ -caténine : _____   | 109        |
| 2. O-GlcNAcylation et ITGA5 : _____   | 110        |
| 3. O-GlcNAcylation et DDX5 : _____  | 110        |
| 4. O-GlcNAcylation et NF- $\kappa$ B : _____  | 112        |
| 5. O-GlcNAcylation et p53 : _____   | 113        |
| <b>TRAVAUX PERSONNELS : _____</b>   | <b>115</b> |
| <b>Partie I : La O-GlcNAcylation connecte la nutrition à la répression épigénétique d'UNC5A durant la cancérogenèse colique _____</b> | <b>115</b> |
| <b>I. Contexte de l'étude : _____</b>   | <b>115</b> |

|  |     |
|--|-----|
| <b>II. Résultats :</b>   | 118 |
| 1) Le régime HCD aggrave la carcinogenèse colique et provoque une répression d' <i>UNC5A</i> , <i>UNC5B</i> et <i>UNC5C</i> :  | 118 |
| 2) La O-GlcNAcylation intervient dans la régulation de l'expression d' <i>UNC5A</i> dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 :  | 123 |
| 3) La O-GlcNAcylation régule la transcription d' <i>UNC5A</i> via le complexe PRC2 dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 :   | 125 |
| 4) La O-GlcNAcylation d'EZH2 permet son recrutement sur le promoteur d' <i>UNC5A</i> dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 :   | 129 |
| <b>III. Conclusion et discussion :</b>   | 132 |
| <b>Partie II : Mise en évidence d'une régulation compensatoire de l'expression colique de l'OGT et de l'OGA en réponse à des perturbations de l'homéostasie de O-GlcNAcylation</b> | 161 |
| <b>I. Introduction :</b>   | 161 |
| <b>II. Résultats :</b>   | 163 |
| <b>III. Conclusion et discussion :</b>   | 164 |
| <b>ANNEXE :</b>  | 186 |
| <b>BIBLIOGRAPHIE :</b>   | 195 |

# **Introduction**

**Partie I :**  
**Le cancer colorectal**

# INTRODUCTION :

## Partie I : Le cancer colorectal

### I. Généralités :

#### 1) Epidémiologie :

Dans le monde, le cancer est un problème de santé public majeur et est une cause principale de décès avec 8,8 millions de décès en 2015 selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Le cancer colorectal (CCR) représente la 3<sup>ème</sup> cause de décès par cancer tous sexes confondus derrière les cancers du poumon et du foie. A notre échelle nationale, le cancer colorectal fait également partie des cancers les plus fréquents. Chez la femme, il représente le 2<sup>ème</sup> rang en ce qui concerne l'incidence et est la 3<sup>ème</sup> cause de décès par cancer. Chez l'homme, il se situe au 3<sup>ème</sup> rang en matière d'incidence et est la 2<sup>ème</sup> cause de décès par cancer. En France, on estime à environ 43336 nouveaux cas (données de l'Institut National du Cancer) en 2018. L'incidence semble diminuer chez l'homme depuis 2010 alors qu'elle reste stationnaire chez la femme et globalement la mortalité baisse. La survie à 5 ans est de 63% pour les personnes diagnostiquées en 2005-2010. Il faut également noter que le cancer colorectal reste rare avant l'âge de 50 ans et que les décès surviennent majoritairement chez des personnes âgées de plus de 65 ans. Par ailleurs, au niveau régional, il existe peu de disparités d'incidence du cancer colorectal mais il faut toutefois souligner qu'une forte surmortalité est observée dans la région Hauts-de-France.

#### 2) Les différentes formes de cancer colorectal :

Le développement d'une tumeur est un processus multi-étapes conduisant une cellule initialement normale à se transformer et à proliférer de manière anarchique. Le côlon et le rectum présentent différents types cellulaires et tous peuvent être à l'origine d'une forme de cancer. Retrouvé dans 90% des cas de cancer colorectal, l'adénocarcinome est le

type le plus fréquent. Il se développe majoritairement à partir des glandes de Lieberkühn qui tapissent l'intérieur de la paroi du côlon et du rectum. D'autres formes plus rares peuvent aussi survenir : sarcomes, lymphomes, tumeurs carcinoïdes ou mélanomes. Les cellules cancéreuses colorectales peuvent envahir et développer des métastases dans le foie, les poumons et le péritoine.

### 3) Les facteurs de risques :

Comme pour de nombreux cancers, le risque de développer un cancer colorectal augmente avec l'âge. Il existe également d'autres facteurs de risque qui sont : (1) la présence plus ou moins importante de polypes sur la paroi du côlon et du rectum respectivement chez des personnes atteintes d'une polypose adénomateuse familiale (PAF) ou d'un syndrome de Lynch (HNPCC), (2) des antécédents familiaux de cancer colorectal ou des antécédents personnels de cancer colorectal ou autre cancer, (3) les maladies inflammatoires telles que la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique et enfin (4) les habitudes de vie telles que la consommation d'alcool ou de tabac, l'inactivité physique, le surpoids et les mauvaises habitudes alimentaires.

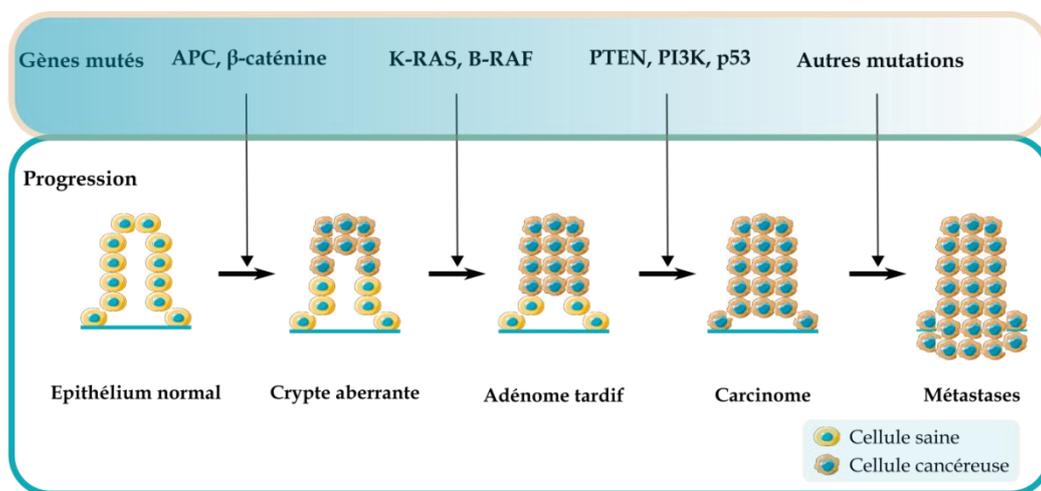
Certains nutriments de notre alimentation dont les glucides représentent des éléments importants dans l'émergence du cancer colorectal. Dans ce sens, plusieurs études ont mis en évidence une corrélation positive entre l'indice de masse corporelle et l'incidence du cancer colorectal (Ning et al. 2010; Matsuo et al. 2012; Nam et al. 2019). Une méta-analyse a aussi démontré qu'une charge glycémique et un index glycémique élevés sont associés à un risque accru de cancer colorectal (Gnagnarella et al. 2008). Une étude plus récente a confirmé ces résultats en montrant une corrélation positive entre le taux de glucose plasmatique et l'incidence du cancer colorectal chez des patients non diagnostiqués diabétiques auparavant (Pang et al. 2018). De manière intéressante, l'impact d'un régime alimentaire occidental typique, composé d'une quantité de gras et de sucres simples et complexes plus importante qu'un régime standard, sur le développement du cancer colorectal a été étudié dans un modèle murin de cancérogenèse colique induite par l'Azoxyméthane (AOM) et le Dextran Sodium Sulfate (DSS), modèle sur lequel nous reviendrons ultérieurement dans ce manuscrit. Les auteurs ont montré que le régime TWD (Total Western Diet) conduit à une augmentation du nombre de tumeurs et à une hausse du volume tumoral moyen en comparaison à des souris soumises au régime standard (Benninghoff et al. 2020). Gröschel et

ses collaborateurs ont également démontré dans un modèle murin de cancérogenèse colique AOM/DSS qu'un régime occidental en comparaison à un régime standard conduisait à une augmentation du nombre et de la taille de foyers de cryptes aberrantes qui représentent les lésions malignes coliques les plus précoces (Gröschel et al. 2019).

## II. Altérations du cancer colorectal :

### 1) Anomalies génétiques :

En 1990, Fearon et Vogelstein proposent un modèle génétique multi-étapes pour illustrer l'émergence et la progression du cancer colorectal (Fearon and Vogelstein 1990). Cette séquence reprend la succession d'altérations génétiques conduisant à l'activation d'oncogènes et à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et provoquant donc la cancérisation colique (**Figure 1**).

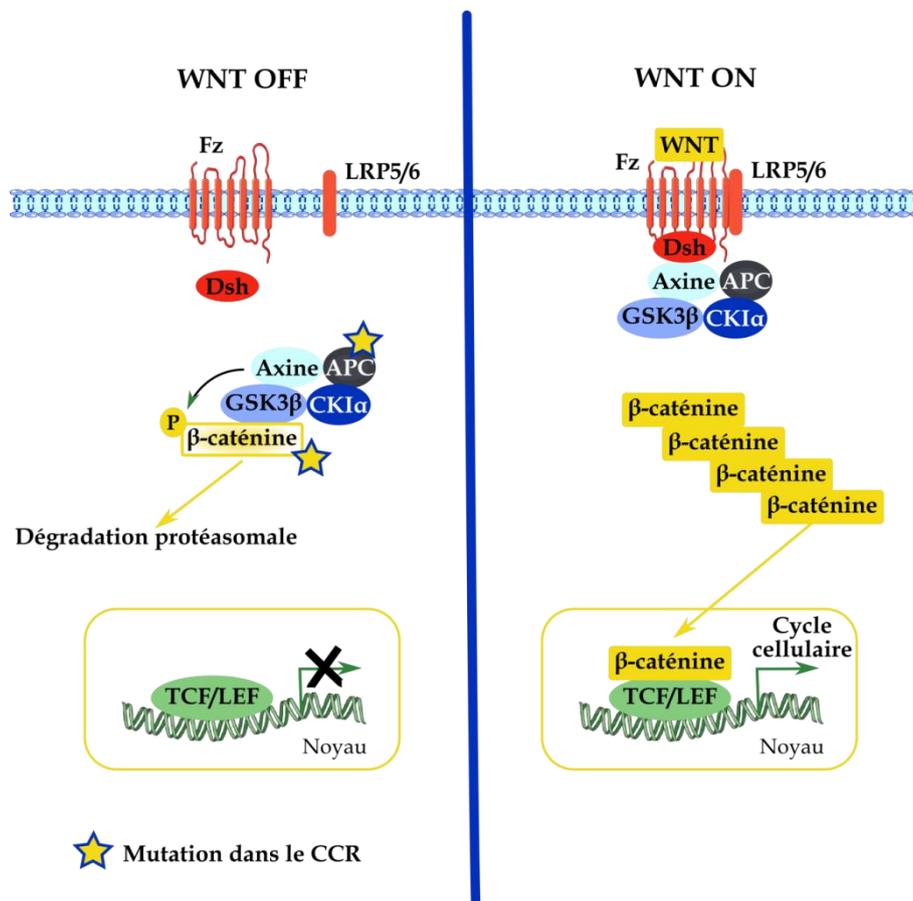


**Figure 1 : Altérations génétiques du CCR.**

Les cellules saines acquièrent différentes altérations conduisant ainsi à l'activation d'oncogènes et à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs et permettant la transition d'une étape à l'autre de l'épithélium normal jusqu'au développement d'un cancer.

Dans la grande majorité des cas, l'altération de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est à l'origine du processus de cancérisation colique. Cette voie de signalisation a un rôle important dans l'homéostasie tissulaire. En l'absence du facteur Wnt, la  $\beta$ -caténine fait partie d'un complexe composé de l'axine, d'APC (Adenomatous Polyposis Coli) et de deux sérine/thréonine kinases : la GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) et CK1 $\alpha$  (Casein Kinase 1 $\alpha$ ). La  $\beta$ -caténine

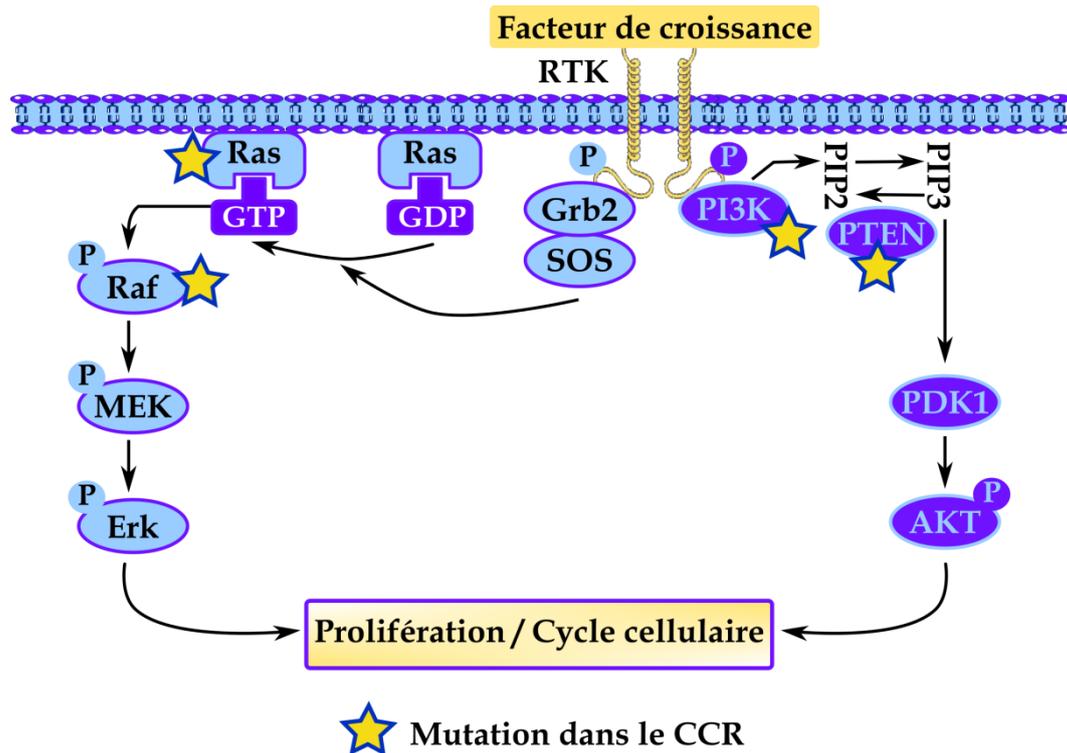
est alors phosphorylée sur plusieurs résidus dans sa boîte de destruction (D-box) puis ubiquitinée pour être dégradée par le protéasome. A l'inverse, en présence du facteur Wnt, un complexe membranaire constitué du récepteur Frizzled (Fz), du co-récepteur LRP5/6 et de Dishevelled est formé. Après la phosphorylation de Dishevelled et de LRP5/6, l'axine est également recrutée à la membrane empêchant ainsi la dégradation de la  $\beta$ -caténine par le protéasome. La  $\beta$ -caténine peut alors migrer dans le noyau où elle se lie aux facteurs TCF/LEF (T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer-binding Factor) pour activer la transcription de ses gènes cibles dont des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (Clevers and Nusse 2012; Gammons and Bienz 2018) (**Figure 2**). Les altérations génétiques retrouvées dans le cancer colorectal au niveau de cette voie de signalisation touchent majoritairement APC et la boîte de destruction de la  $\beta$ -caténine conduisant dans les deux cas à une inhibition de la dégradation protéasomale de la  $\beta$ -caténine et donc à une prolifération incontrôlée (Cheng et al. 2019).



**Figure 2 :** Voie de signalisation Wnt- $\beta$ -caténine.

En absence du facteur Wnt, la  $\beta$ -caténine fait partie d'un complexe composé de l'axine, APC, CK1 $\alpha$  et GSK3 $\beta$  promouvant sa dégradation protéasomale. A l'inverse, en présence de Wnt, un complexe membranaire composé de Fz, LRP5/6, Dsh, l'axine, APC, CK1 $\alpha$  et GSK3 $\beta$  se forme permettant ainsi une stabilisation de la  $\beta$ -caténine qui migre dans le noyau où elle se fixe sur des facteurs TFC/LEF pour activer la transcription de ses gènes cibles. Des mutations de l'axine, d'APC et de la  $\beta$ -caténine sont fréquemment retrouvées dans le CCR.

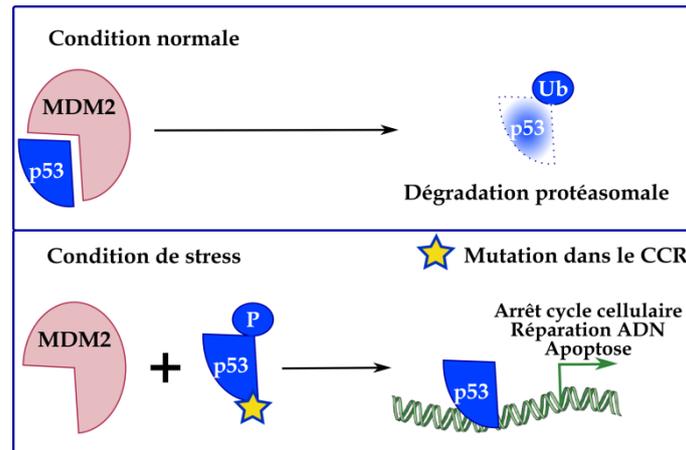
Les facteurs de croissance *via* les récepteurs à activité tyrosine kinase sont des acteurs importants dans la prolifération cellulaire. Parmi les voies de signalisation activées par ces récepteurs, nous pouvons citer la voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). En condition physiologique, la phosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase en réponse à la fixation de leur ligand permet le recrutement de protéines relais dont Grb2 et SOS qui stimulent la voie MAPK constituée de : K-Ras, Raf, MEK et Erk (**Figure 3**). Erk va alors migrer dans le noyau où elle active différents facteurs de transcription par phosphorylation dont c-myc et c-fos impliqués dans la prolifération cellulaire et elle est également capable de séquestrer Bad dans le cytoplasme bloquant ainsi l'apoptose. Dans le cadre du cancer colorectal, des mutations activatrices de K-Ras et B-Raf sont retrouvées provoquant ainsi une activation constitutive de la voie et conduisant donc à une prolifération anarchique et un échappement à l'apoptose (Bos et al. 1987; Davies et al. 2002; Al-Sohaily et al. 2012; Boussios et al. 2019). La PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) est également capable de se fixer aux récepteurs à activité tyrosine kinase phosphorylés en réponse à un facteur de croissance. La PI3K est responsable de la transformation du PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-4,5-triphosphate). La réaction inverse est assurée par PTEN (Phosphatase and Tensin homolog). L'accroissement de la quantité de PIP3 permet le recrutement de protéines telles que PDK1 (Phosphatidylinositol-Dependent protein Kinase 1) puis AKT qui régulera de nombreuses protéines assurant un rôle dans le cycle cellulaire et l'apoptose (**Figure 3**). Il a été retrouvé dans le cancer colorectal des mutations activatrices de l'oncogène PI3K (Arafeh and Samuels 2019) et des mutations inhibitrices du gène suppresseur de tumeur PTEN (Salvatore et al. 2019).



**Figure 3:** Voies de signalisation associées aux récepteurs à activité tyrosine kinase.

La phosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase, en réponse à un facteur de croissance, permet le recrutement de protéines relais dont Grb2 et SOS qui vont activer la voie des MAPK à savoir Ras, Raf, MEK et Erk. Une fois dans le noyau, Erk active, par phosphorylation, différents facteurs de transcription impliqués dans la prolifération. La PI3K peut également se fixer aux récepteurs à activité tyrosine kinase phosphorylés en réponse à un facteur de croissance. Elle est responsable de la transformation du PIP2 en PIP3. L'accumulation de PIP3 permet le recrutement de PDK1 qui phosphoryle AKT qui pourra alors réguler de nombreuses protéines impliquées dans le cycle cellulaire. Des mutations de Ras, Raf, PI3K et PTEN sont retrouvées dans le CCR.

La dérégulation du gardien du génome p53 est une des dernières étapes avant la métastase des cellules cancéreuses coliques. En condition normale, l'expression de p53 est faible car régulée négativement par l'ubiquitine ligase MDM2 (Murine Double Minute 2) qui induit sa dégradation par le protéasome. Lors de l'apparition de lésions à l'ADN, p53 est phosphorylée ce qui empêche son interaction avec MDM2 et permet donc sa stabilisation. La protéine p53 peut alors activer de nombreux gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation des lésions ou dans l'apoptose en cas de non réparation des dommages (**Figure 4**). Les altérations de p53 conduisent donc à une persistance des lésions de l'ADN et à un échappement à l'apoptose (Farooqi et al. 2019).

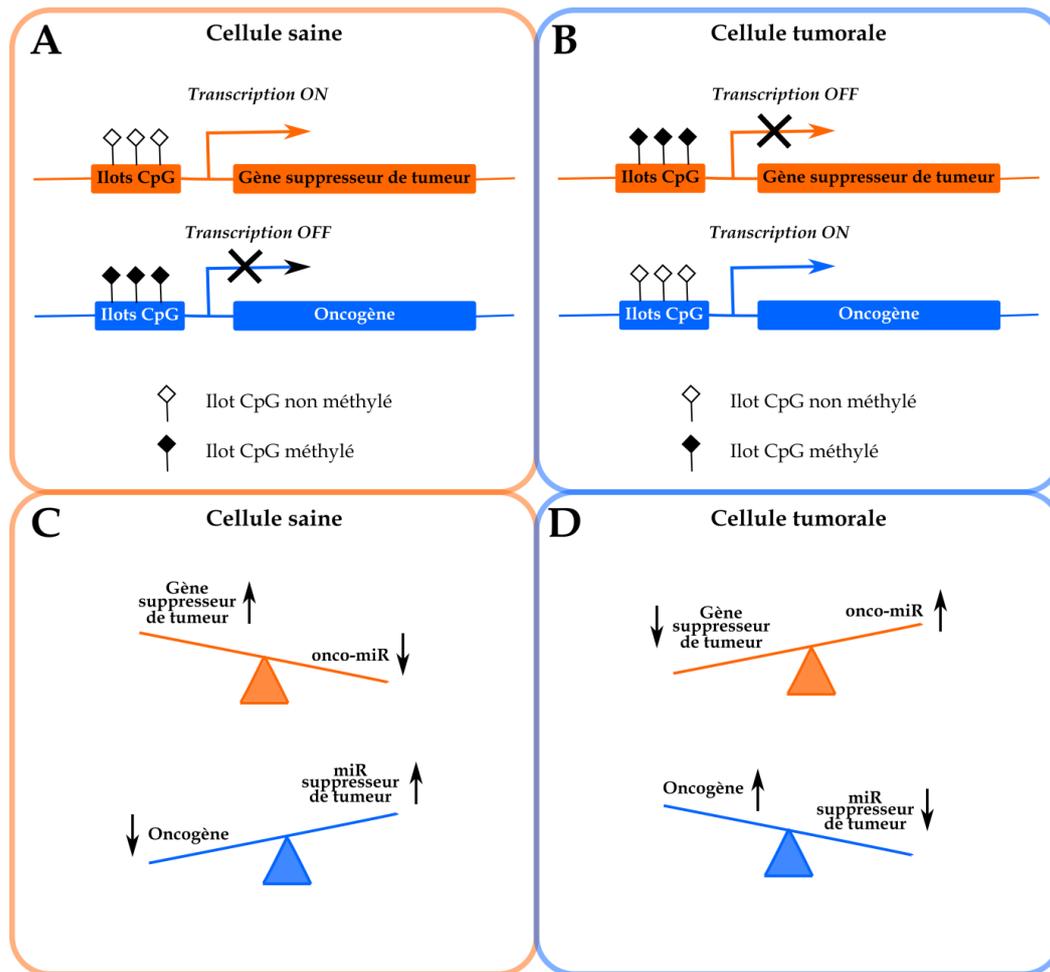


**Figure 4 :** Régulation de la stabilité de p53 par MDM2.

En condition normale, p53 est peu exprimée puisqu'elle est dégradée par la protéasome sous l'impulsion de l'ubiquitine ligase MDM2. Lors d'un stress, p53 est phosphorylée empêchant sa liaison avec MDM2 et permettant son accumulation et l'activation de ses gènes cibles impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'apoptose. Des mutations de p53 sont retrouvées dans le CCR.

## 2) Anomalies épigénétiques :

L'apport de connaissances sur les acteurs moléculaires contrôlant l'expression des gènes a permis de révéler le rôle tout aussi important de l'épigénétique dans le processus de cancérisation. En effet, des modifications de l'expression des gènes par des mécanismes ne touchant pas la structure primaire de l'ADN sont également impliquées dans le développement tumoral colique (Goel and Boland 2012). Ces altérations incluent (1) la méthylation de l'ADN (répression de gènes suppresseurs de tumeurs et activation d'oncogènes *via* respectivement l'hyperméthylation et l'hypométhylation de leur région promotrice) (**Figure 5A-B**), (2) la dérégulation de l'expression d'ARN non codants (**Figure 5C-D**) et (3) les nombreuses modifications post-traductionnelles des histones H2A, H2B, H3 et H4 qui affectent les extrémités amino-terminales de ces dernières permettant ainsi de contrôler l'état de compaction de la chromatine (Porcellini et al. 2018). Seuls quelques exemples d'altérations épigénétiques sont mentionnés ci-dessous. Ces anomalies épigénétiques sont très abondantes et variées et se produisent dès le début du processus de cancérisation colique.



**Figure 5 : Dérégulations épigénétiques retrouvées dans le CCR.**

(A-B) Un nombre élevé de dinucléotides CpG rassemblés en îlots CpG est retrouvé au niveau des régions promotrices de nombreux gènes. Dans une cellule normale, les îlots CpG des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs sont non méthylés permettant ainsi leur transcription. À l'inverse, les îlots CpG des promoteurs des oncogènes sont hyperméthylés les maintenant ainsi réprimés. Dans une cellule tumorale, l'opposé est retrouvé à savoir une hyperméthylation des îlots CpG des régions promotrices des gènes suppresseurs de tumeurs et des îlots CpG non méthylés dans les régions promotrices des oncogènes. (C-D) Les miRNA sont de petits ARN non codants régulant de façon négative l'expression d'ARNm. Ils sont capables d'agir en tant que suppresseur de tumeur (miR suppresseur de tumeur) ou en tant qu'oncogène (onco-miR) en ciblant respectivement des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs. L'expression de ces miRNA est dérégulée dans le CCR. Les onco-miR sont surexprimés et sont donc susceptibles d'inhiber l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs. Inversement, l'expression des miR suppresseurs de tumeurs est diminuée conduisant ainsi à une surexpression des oncogènes.

mise en évidence dans le cancer colorectal. Parmi les nombreux gènes suppresseurs de tumeurs réprimés par une hyperméthylation de leur promoteur, nous pouvons notamment citer *PTEN* (Goel et al. 2004) mais aussi *UNC5C* (Shin et al. 2007). Nous reviendrons dans la suite de ce manuscrit sur le gène suppresseur de tumeur *UNC5C* (Uncoordinated 5C) appartenant à la même famille que le gène auquel je me suis intéressée pendant ma thèse à savoir *UNC5A* (Uncoordinated 5A).

La compréhension des altérations épigénétiques dues aux protéines modifiant les histones est plus restreinte. Néanmoins, les connaissances sur les modifications d'acétylation/déacétylation et méthylation/déméthylation sont les plus conséquentes. Les gènes transcriptionnellement inactifs sont notamment souvent associés à la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 notée H3K27Me3. Cette marque épigénétique répressive est mise en place par le Complexe Répresseur Polycomb 2 (PRC2) dont EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog) est la sous-unité catalytique. Les altérations liées à ce complexe sont multiples dans le cancer colorectal et nous reviendrons en détail sur ces dernières ultérieurement dans ce manuscrit.

Parmi les ARN non codants dérégulés dans le cancer colorectal, nous pouvons mentionner les miRNA dont certains sont impliqués dans la régulation de l'expression de gènes appartenant aux voies de signalisation mentionnées précédemment à savoir la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, la voie des MAPK et de PI3K/AKT et enfin d'autres ciblent p53 (Goel and Boland 2012; Balacescu et al. 2018). Par exemple, il a été montré que miR-494 et miR-501-3p sont surexprimés dans des tissus cancéreux coliques en comparaison aux tissus sains adjacents et qu'APC (Adenomatous Polyposis Coli) est une cible directe de ces microRNA (Zhang et al. 2018a; Wu et al. 2019a).

### 3) Classification du cancer colorectal :

Sur le plan anatomo-pathologique, le cancer colorectal est un cancer homogène retrouvé dans la majorité des cas sous forme d'adénocarcinome. D'un point de vue moléculaire, nous venons de voir à travers une liste non exhaustive d'altérations que cette pathologie est beaucoup plus hétérogène. Jass a proposé en 2007 une classification des sous-types moléculaires de cancer colorectal prenant en compte à la fois des altérations retrouvées au niveau du génome et de l'épigénome (Jass 2007). Il a décrit cinq catégories en se basant sur : (1) la présence d'instabilité microsatellitaire due à des mutations des gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN (système Mismatch Repair ou MMR) et provoquant des anomalies nucléotidiques (mutations ponctuelles, délétions ou insertions) dans la séquence de gènes suppresseurs de tumeurs (mutation perte de fonction) ou d'oncogènes (mutation gain de fonction) et (2) la présence d'un phénotype de méthylation des îlots CpG (CIMP). Les cinq sous-types sont les suivants : (1) CIMP High/MSI High/Mutation B-Raf, (2) CIMP High/MSI Low ou MSS (stabilité des

microsatellites)/Mutation B-Raf, (3) CIMP Low/MSI Low ou MSS/Mutation K-Ras, (4) CIMP négatif/MSS et (5) CIMP négatif/MSI Low. Une classification moléculaire appelée CMS (Consensus Molecular Subtypes) et basée également en partie sur la présence de MSI/CIMP a aussi été proposée plus récemment par Guinney et ses collaborateurs (Guinney et al. 2015). Enfin, il faut noter que les altérations retrouvées au niveau du génome peuvent également être la conséquence d'une instabilité chromosomique (CIN).

#### 4) Les différents traitements :

A ce jour, il existe plusieurs traitements proposés pour lutter contre le cancer colorectal. La chirurgie représente le traitement de base de ce cancer et peut être réalisée à tous les stades de la maladie. La chimiothérapie est également une solution thérapeutique utilisée pour éliminer les cellules cancéreuses. Les molécules les plus fréquemment utilisées sont : (1) le 5-fluorouracile (5-FU) qui est un inhibiteur de la thymidylate synthase, (2) la capécitabine qui représente un précurseur du 5-FU, (3) l'oxaliplatine qui est un agent alkylant et (4) l'irinotécan qui inhibe l'ADN topo-isomérase 1. Plusieurs de ces molécules sont généralement administrées en même temps comme par exemple l'association chimiothérapeutique « FOLFOX » composée de 5-FU, d'oxaliplatine et de leucovorine utilisée comme adjuvant. La chimiothérapie peut être associée à la chirurgie ou à la radiothérapie. Enfin, les thérapies ciblées représentent également une option thérapeutique dans le cadre du cancer colorectal. Parmi les plus connues, nous pouvons citer : (1) le bévacizumab qui est un anticorps monoclonal dirigé contre un facteur clé de l'angiogenèse à savoir le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), (2) le cétuximab qui est également un anticorps monoclonal dirigé contre un acteur majeur de l'angiogenèse, l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), mais qui est aussi impliqué dans d'autres voies de signalisation dont la survie cellulaire, le cycle cellulaire, la migration et l'invasion, (3) l'aflibercept qui est une protéine de fusion recombinante se liant au VEGF-A (Vascular endothelial growth factor-A) et au PlGF (Placental Growth Factor) appartenant tous deux à la famille des facteurs angiogéniques de type VEGF et (4) le régorafénib qui est un inhibiteur de protéines kinases ciblant notamment des protéines impliquées dans l'angiogenèse comme TIE2 (Tyrosine kinase with Immunoglobulin and EGF homology domains) et dans la prolifération cellulaire telle que B-Raf (V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1).

Bien que plusieurs options thérapeutiques soient disponibles à ce jour pour faire face au cancer colorectal, les taux de réponse aux traitements et les améliorations en matière de survie globale des patients ne sont pas toujours satisfaisants à cause entre autres de l'émergence de résistance. Des combinaisons de ces différents traitements sont effectuées pour tenter d'augmenter l'activité anti-tumorale et essayer de surmonter ces mécanismes de résistance. Cependant, au vu de la variabilité interindividuelle génétique et épigénétique, le souhait aujourd'hui est donc de se tourner vers une médecine personnalisée pour augmenter les taux de réponse aux traitements et celle-ci nécessite notamment l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux biomarqueurs prédictifs et pronostics. Dans ce contexte, au cours de ma thèse, je me suis intéressée à UNC5A et à EZH2, deux protéines dérégulées dans le cancer colorectal et qui pourraient représenter de nouveaux biomarqueurs de la maladie.

**Partie II :**  
**Le Complexe Répresseur**  
**Polycomb 2 (PRC2)**

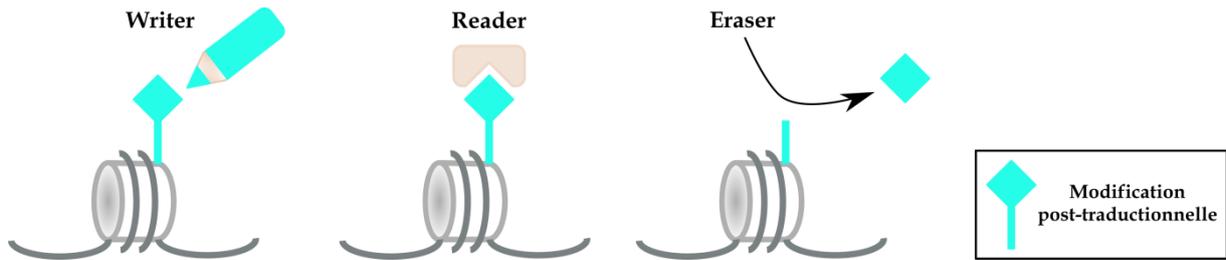
# Partie II : Le Complexe Répresseur Polycomb 2 (PRC2)

---

---

## I. Histoire et généralités :

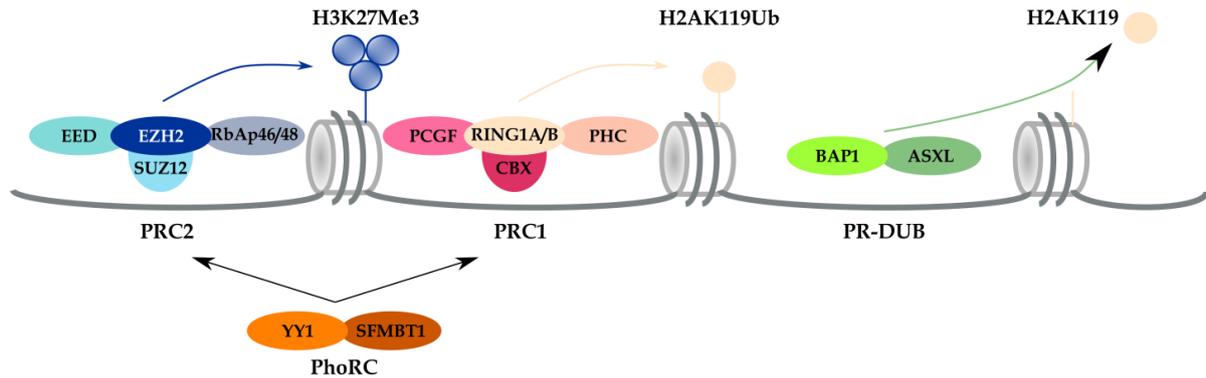
Chez les eucaryotes, le matériel génétique est retrouvé dans le noyau sous forme de chromatine dont l'unité de base est le nucléosome. Ce dernier se compose de 146bp d'ADN enroulées autour d'un octamère d'histones formé par l'assemblage de deux exemplaires des isoformes d'histones suivantes : H2A, H2B, H3 et H4. L'organisation de la chromatine peut être modulée par des modifications de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des histones. Il est maintenant clairement admis que des anomalies épigénétiques contribuent au développement et à la progression de différentes pathologies comme le cancer. Il existe plusieurs modifications post-traductionnelles des histones identifiées à ce jour comme par exemple la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la SUMOylation, la biotinylation, l'ADP-ribosylation et la O-GlcNAcylation. Différentes protéines appelées « writer » ou « eraser » sont respectivement responsables de l'ajout ou de l'hydrolyse de ces modifications. D'autres protéines appelées « reader » sont quant à elles capables de reconnaître et de se lier aux acides aminés modifiés (**Figure 6**). Ces protéines peuvent ensuite avoir des rôles variés : il peut s'agir d'enzymes de remodelage de la chromatine mais également de protéines adaptatrices qui recrutent par exemple des facteurs de transcription ou d'autres protéines qui pourront davantage modifier la chromatine (Workman and Kingston 1998; Andreoli and Del Rio 2014; Tessarz and Kouzarides 2014; Bowman and Poirier 2015). Parmi les modifications post-traductionnelles des histones, la méthylation se produit sur deux acides aminés : la lysine et l'arginine. La triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3, notée H3K27Me3, est une marque épigénétique répressive mise en place par l'histone méthyltransférase EZH2 appartenant au Complexe Répresseur Polycomb 2 (PRC2).



**Figure 6 : Notion de writer, eraser et reader.**

Les histones sont modifiées par des enzymes de modification appelées « writer » et l'activité antagoniste est portée par des protéines appelées « eraser ». Les modifications mises en place par les « writer » peuvent être reconnues et fixées par les « reader » qui auront une activité de remodelage de la chromatine ou qui serviront d'intermédiaire pour le recrutement d'autres protéines.

Les protéines Polycomb jouent un rôle clé dans divers processus et maintiennent les programmes d'expression génique au cours des divisions cellulaires. La construction de mutants Polycomb chez la drosophile a initialement permis de caractériser ces protéines. Ces mutants présentent en effet des défauts d'identité segmentaire comme par exemple une transformation de segments antérieurs en segments plus postérieurs. Ces altérations sont dues à l'expression ectopique de gènes homéotiques dont le patron d'expression détermine l'établissement de l'axe antéro-postérieur. Ceci a donc permis de définir les protéines Polycomb comme des répresseurs des gènes homéotiques. Ces protéines s'organisent en cinq grands complexes chez la drosophile : le complexe PhoRC (PHO Repressive Complex 1), le complexe PR-DUB (Polycomb Repressive DeUBiquitinase), le complexe dRAF (dRING-associated factors), le complexe PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) et le complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). Mon propos se focalisera principalement sur le complexe PRC2 qui a fait l'objet de mes travaux de thèse. Le cœur protéique de ce dernier se compose de : E(z) (Enhancer of Zeste) qui est responsable de la mise en place de la marque H3K27Me<sub>3</sub>, Su(z)12 (Suppressor of zeste 12), Esc (Extra sex combs) et Nurf55 (Nucleosome remodeling factor 55). Des orthologues des protéines Polycomb sont retrouvés chez différents organismes attestant de leur conservation au cours de l'évolution. Chez l'Homme, quatre des cinq complexes sont retrouvés (**Figure 7**), le complexe dRAF n'étant pas conservé (Lanzuolo and Orlando 2012; Kassis et al. 2017; Schuettengruber et al. 2017).



**Figure 7 : Les complexes Polycomb chez l'Homme.**

Les protéines Polycomb s'organisent en quatre grands complexes. Le cœur protéique du complexe PRC2 est composé d'EED, SUZ12, RbAp46/48 et de sa sous-unité catalytique : EZH2. Le complexe PRC1 est composé de RING1A/B qui représente sa sous-unité catalytique, d'une protéine PCGF (1-6), d'une protéine CBX (2, 4, 6, 7 ou 8) et d'une protéine PHC (1, 2 ou 3). Ce complexe est responsable de la mise en place de l'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A. Cette marque épigénétique est hydrolysée par le complexe PR-DUB constitué de BAP1 et ASXL. Enfin, le complexe PhoRC est impliqué dans le recrutement des complexes PRC1 et PRC2. Il se compose de YY1 et SFMBT1.

## II. Structure et fonctions du Complexe Répresseur

### Polycomb 2 :

#### 1) Composition et organisation du complexe :

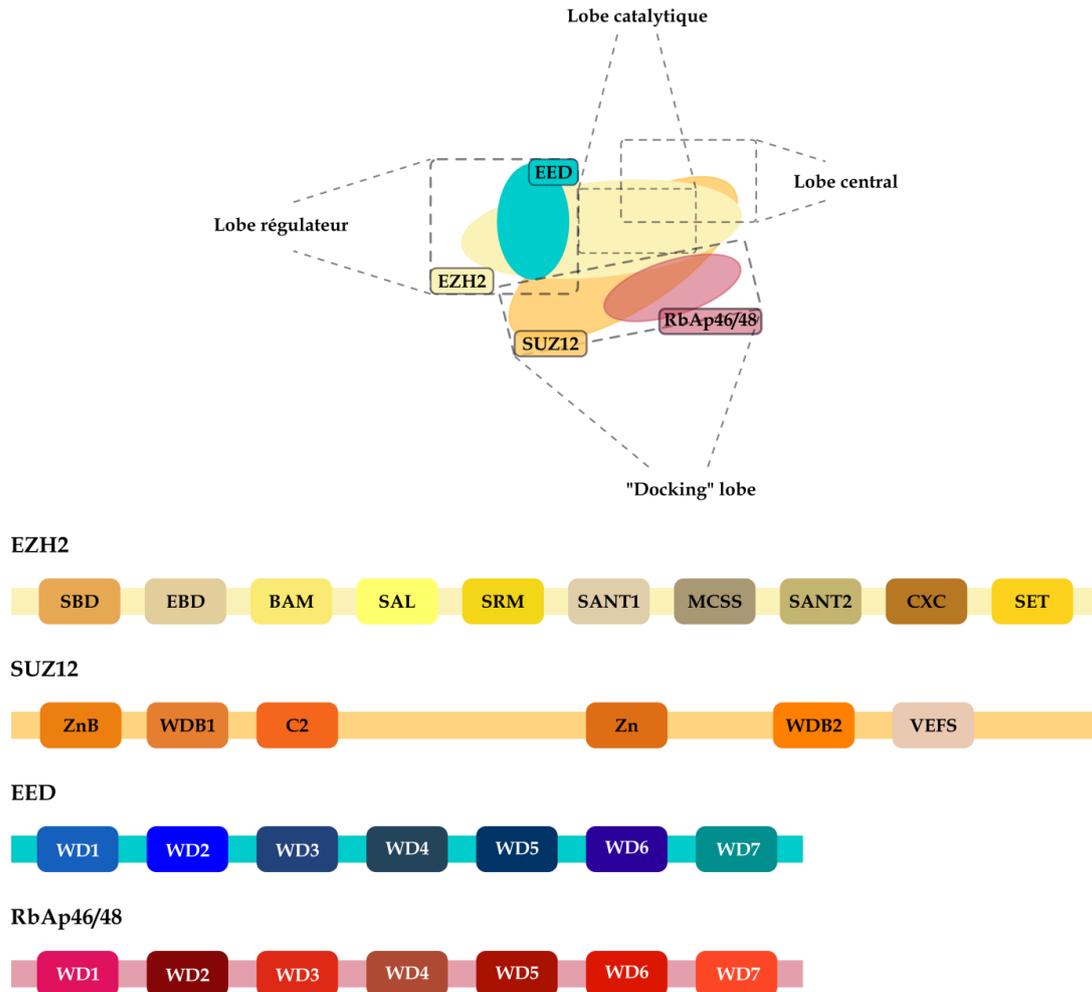
Le cœur protéique du complexe PRC2 humain comprend les membres suivants (**Figure 7**) : EZH2 qui porte l'activité de mono-, di- et tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3, SUZ12, EED (Embryonic Ectoderm Development) et RbAp46/48 (Retinoblastoma protein associated protein 46/48).

EZH1 est un paralogue d'EZH2. Malgré leur forte homologie, ces deux protéines présentent un patron d'expression différent : alors qu'EZH2 est principalement exprimée dans les tissus en prolifération, EZH1 a une expression ubiquitaire. L'abolition de l'expression d'EZH2 par siRNA dans des cellules NIH-3T3 conduit à une diminution des niveaux globaux de H3K27Me2/3 alors que celle d'EZH1 n'a aucun effet. De plus, la perte simultanée d'EZH2 et d'EZH1 cause une réduction des niveaux globaux de H3K27Me2/3 semblable à celle retrouvée lors de l'extinction d'EZH2 seule. Il a également été montré

qu'EZH1 est capable d'interagir avec SUZ12 et EED mais son activité semble plus faible que celle d'EZH2. De plus, les mécanismes permettant à EZH2 et EZH1 de maintenir un état de compaction de la chromatine seraient différents (Margueron et al. 2008). L'activité et le mode d'action d'EZH1 restent toutefois sujets de controverse. En effet, d'autres études ont montré une activité enzymatique plus ou moins comparable entre EZH1 et EZH2 et qui peut également varier selon le type de substrat (Shen et al. 2008; Lee et al. 2018).

L'interaction d'EZH2 avec SUZ12 et EED est indispensable pour l'activité enzymatique du complexe. En effet, il a été montré dans des cellules souches embryonnaires dépourvues d'EED une diminution importante de la mono-, di- et tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3. Cette baisse est corrélée à une réduction de l'expression protéique d'EZH2 alors qu'aucun effet n'est observé sur les transcrits (Montgomery et al. 2005). De la même manière, il a été mis en évidence dans des embryons murins dépourvus de SUZ12 une diminution de l'expression protéique d'EZH2 et de la di- et tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3. Par ailleurs, l'abolition de l'expression de SUZ12 dans les cellules HeLa par siRNA n'a aucun effet sur la quantité de transcrits EZH2 mais conduit à une diminution de l'expression protéique d'EZH2. Cette diminution est empêchée par le traitement des cellules avec un inhibiteur du protéasome, le MG132, suggérant un rôle de SUZ12 dans la stabilisation d'EZH2 (Pasini et al. 2004). Il a également été démontré que la présence de RbAp46/48 au sein du complexe PRC2 n'est pas nécessaire pour l'activité d'histone méthyltransférase (Cao and Zhang 2004). Par ailleurs, il a été mis en évidence qu'EZH2 sous sa forme isolée adopte une conformation d'auto-inhibition empêchant la fixation du substrat et du donneur de groupement méthyl (Antonyamy et al. 2013; Wu et al. 2013).

Il a récemment été proposé que l'assemblage d'EZH2, SUZ12, EED et RbAp46/48 forme une structure stable à quatre lobes : (1) un lobe catalytique formé des domaines SET et CXC d'EZH2, (2) un lobe régulateur composé de l'association d'EED avec la partie N-terminale d'EZH2, (3) un lobe intermédiaire comprenant la partie centrale d'EZH2 et le domaine VEFS de SUZ12 et enfin (4) un lobe servant de plateforme pour les facteurs s'associant avec le complexe PRC2 et formé de la région N-terminale de SUZ12 et de RbAp46/48 (**Figure 8**) (Chammas et al. 2019).

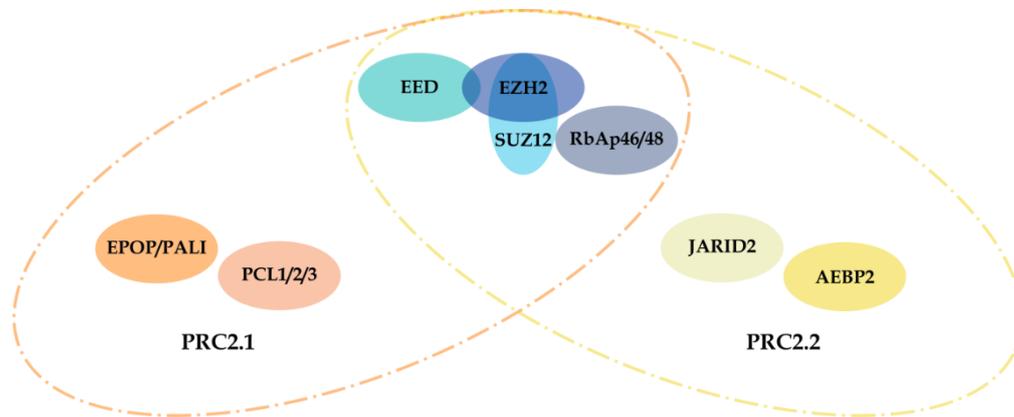


**Figure 8 : Organisation des domaines protéiques d'EZH2, SUZ12, EED et RbAp46/48.**

L'association de ces différentes sous-unités résulte en la formation d'un complexe stable à quatre lobes. Le lobe catalytique comprend les domaines CXC et SET d'EZH2. Le lobe régulateur est composé des domaines SBD, EBD, BAM, SRM et SANT1 d'EZH2 qui s'enroulent autour d'EED. Les domaines MCSS et SANT2 d'EZH2 et le domaine VEFS de SUZ12 composent le lobe central. Les domaines ZnB, WDB1, C2, Zn, WDB2 de SUZ12 et RbAp46/48 font partie du lobe servant de plateforme pour les protéines s'associant au complexe PRC2. ZnB : Zn Finger binding domain - WDB1 : WD-domain binding 1 - C2 : C2 domain - Zn : Zn Finger - WDB2 : WD-domain binding 2 - VEFS : VRN2-EMF2-FIS2-Su(z)12 box - SBD : SANT1L-binding domain - EBD : EED-binding domain - BAM :  $\beta$ -Addition Motif - SAL : SET Activation Loop - SRM : Stimulation-Responsive Motif - SANT1 : Swi3, Ada2, N-CoR and TFIIB DNA-binding domain 1 like - MCSS : Motif Connecting SANT1 and SANT2 - SANT2 : SANT2-like - CXC : CXC domain - SET : Su(var)3-9, E(z) and Trx domain - WD : WD-repeat region.

Le cœur protéique du complexe PRC2 s'associe avec différents partenaires formant ainsi deux complexes distincts (**Figure 9**) : (1) le complexe PRC2.1 interagit avec un homologue PCL (Polycomb-like) ainsi qu'EPOP ou PALI et (2) le complexe PRC2.2 fixe AEBP2 et JARID2. Ces différents partenaires du complexe PRC2 jouent un rôle dans la régulation de

son activité enzymatique ou de son recrutement au niveau de ses gènes cibles (Holoch and Margueron 2017; Laugesen et al. 2019; Mierlo et al. 2019).



**Figure 9 :** Le complexe PRC2 existe sous deux formes distinctes : le PRC2.1 et le PRC2.2.

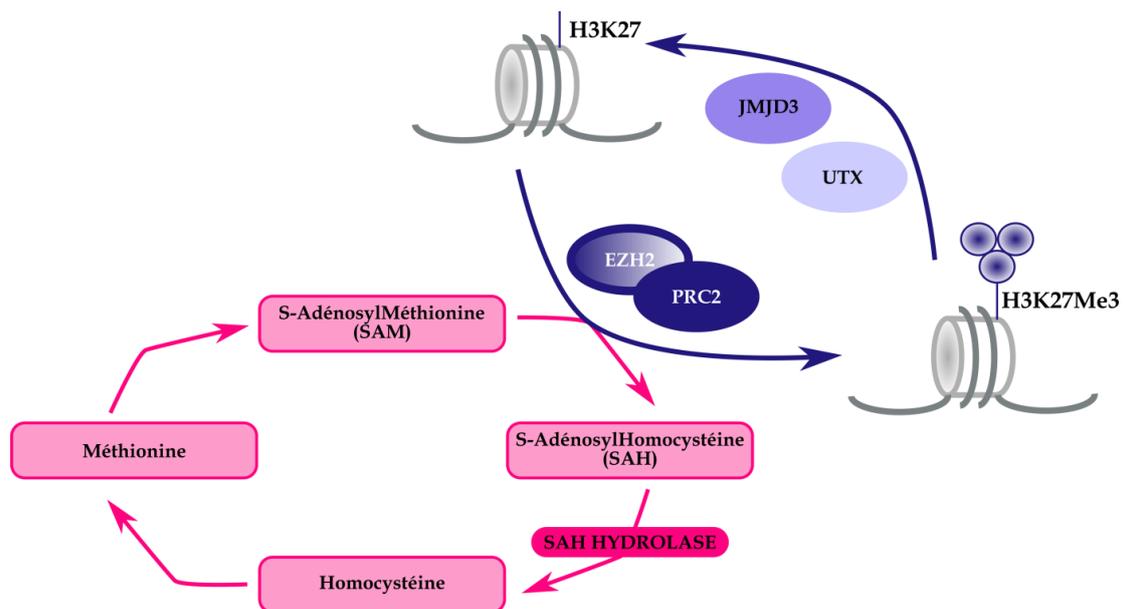
Le cœur protéique du complexe PRC2 est formé d'EZH2, EED, SUZ12 et RbAp46/48. Celui-ci s'associe avec différents partenaires à savoir d'une part un homologue PCL et EPOP ou PALI et d'autre part JARID2 et AEBP2 formant ainsi respectivement les complexes PRC2.1 et PRC2.2.

## 2) Activité histone méthyltransférase d'EZH2 :

EZH2 porte l'activité d'histone méthyltransférase du complexe PRC2 *via* son domaine SET. Le site actif de ce dernier comporte deux poches : une première poche accueillant le substrat et la seconde contenant le donneur S-Adénosyl Méthionine (SAM) nécessaire au transfert de groupement méthyle sur le résidu cible (**Figure 10**). Le complexe PRC2 *via* l'activité enzymatique d'EZH2 et la mise en place de la marque H3K27Me3 fonctionne principalement comme un répresseur transcriptionnel. Il cible de nombreux gènes impliqués dans divers processus cellulaires tels que le renouvellement des cellules souches, la différenciation, la prolifération cellulaire, la sénescence ou l'inactivation du chromosome X chez les mammifères. Le complexe PRC2 est le seul à pouvoir catalyser l'ajout de groupement méthyle sur la lysine 27 de l'histone H3 et est responsable de toutes les méthylations *de novo* (mono-, di- et tri-) dans des cellules souches embryonnaires murines (Højfeldt et al. 2018). Ces trois méthylations présentent des distributions génomiques différentes. En effet, il a été montré dans des cellules souches embryonnaires de souris que la di-méthylation, retrouvée de manière la plus abondante, est distribuée dans les régions intergéniques et intragéniques alors que la mono-méthylation, beaucoup moins présente, est

retrouvée au niveau de gènes transcrits (Ferrari et al. 2014). Concernant H3K27Me3, cette méthylation peu abondante est notamment retrouvée dans les zones enrichies par EZH2 (Laugesen et al. 2019).

La méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 est réversible. Les protéines UTX (Ubiquitously Transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome) et JMJD3 (Jumonji domain containing 3) possèdent en effet une activité de déméthylation de cet acide aminé de l'histone H3 (Hong et al. 2007) (**Figure 10**).



**Figure 10 :** La triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 est une modification réversible. La sous-unité catalytique du complexe PRC2, EZH2, triméthyle la lysine 27 de l'histone H3 à partir de la S-Adénosyl Méthionine (SAM). L'hydrolyse de ces groupements méthyles est assurée par les protéines UTX et JMJD3.

### 3) Recrutement du complexe PRC2 à la chromatine :

#### 1. Propriétés des régions fixées :

Alors que chez la drosophile le processus de recrutement du complexe PRC2 à ses gènes cibles *via* de nombreuses séquences d'ADN spécifiques appelées PRE (Polycomb Response Element) est bien compris (Kassis and Brown 2013), celui-ci semble plus complexe chez les mammifères. En effet, même si une étude récente a mis en évidence la présence de PRE dans le génome humain, leur fonctionnalité reste à éclaircir (Du et al. 2018). Cependant, plusieurs mécanismes peuvent expliquer le recrutement du complexe PRC2 et l'exécution correcte de

son activité dont la propriété des régions fixées. En effet, chez l'homme, le complexe PRC2 se fixerait préférentiellement dans les régions promotrices riches en îlots CpG de ses gènes cibles et de manière proche du site d'initiation de la transcription (**Figure 11A**) (Pan et al. 2007; Tanay et al. 2007; Zhao et al. 2007; Ku et al. 2008).

### **2. Influence des modifications des histones :**

Bien que le rôle des différentes modifications des histones dans la régulation du recrutement du complexe PRC2 ne soit pas encore tout à fait compris, ce dernier semble être sensible à la présence de plusieurs marques dont la sienne. En effet, EED est capable de se fixer aux marques H3K27Me3 conduisant ainsi à une augmentation de l'activité catalytique du complexe et assurant ainsi une propagation efficace de la marque le long du génome et la transmission des marques lors de la division cellulaire (**Figure 11B**) (Margueron et al. 2009; Oksuz et al. 2018). Par ailleurs, le complexe PRC2 est sensible à la marque activatrice H3K36Me3 mais l'influence de celle-ci reste sujette à la controverse. En effet, il a été montré que la protéine PHF19 *via* son domaine TUDOR reconnaissait des marques H3K36Me3 permettant ensuite le recrutement du complexe PRC2 et la mise en place de la marque H3K27Me3 durant le développement. La mise en place de cette marque et l'hydrolyse des marques H3K36Me3 rendue possible par la liaison de PHF19 à une déméthylase conduisent donc à une répression des gènes cibles (**Figure 11C**) (Brien et al. 2012; Cai et al. 2013). En revanche, une autre étude a démontré que la présence de la marque H3K36Me3 empêchait la mise en place de la marque H3K27Me3 (Schmitges et al. 2011).

### **3. Relation réciproque PRC1/PRC2 :**

Le complexe PRC2 est étroitement lié au Complexe Répresseur Polycomb 1 (PRC1) et l'activité enzymatique de l'un peut moduler le recrutement de l'autre. Les études initiales ont permis d'établir le modèle classique de recrutement des complexes PRC1 et PRC2 : dans un premier temps, la marque H3K27Me3 est mise en place par le complexe PRC2. Elle est ensuite reconnue par le complexe PRC1 *via* sa sous-unité CBX. Il s'ensuit alors le dépôt de la marque H2AK119Ub (ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A) par la sous-unité catalytique du complexe PRC1, RING1A/B, et enfin la compaction de la chromatine (**Figure 11D**). Néanmoins, des études plus récentes ont mis en évidence que le complexe PRC1 pourrait également être impliqué dans le recrutement du complexe PRC2. En réalisant un modèle de ciblage artificiel du complexe PRC1, Blackledge et ses collaborateurs ont prouvé que la fixation *de novo* de ce complexe et le dépôt de la marque H2AK119Ub permettent le

recrutement du complexe PRC2 et la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (Blackledge et al. 2014). L'implication du complexe PRC1 dans le recrutement du complexe PRC2 a été confirmée par d'autres travaux qui ont aussi démontré le rôle de JARID2 et AEBP2 dans la reconnaissance de la marque H2AK119Ub (**Figure 11E**) (Cooper et al. 2014, 2016; Kalb et al. 2014).

#### 4. Partenaires d'interaction :

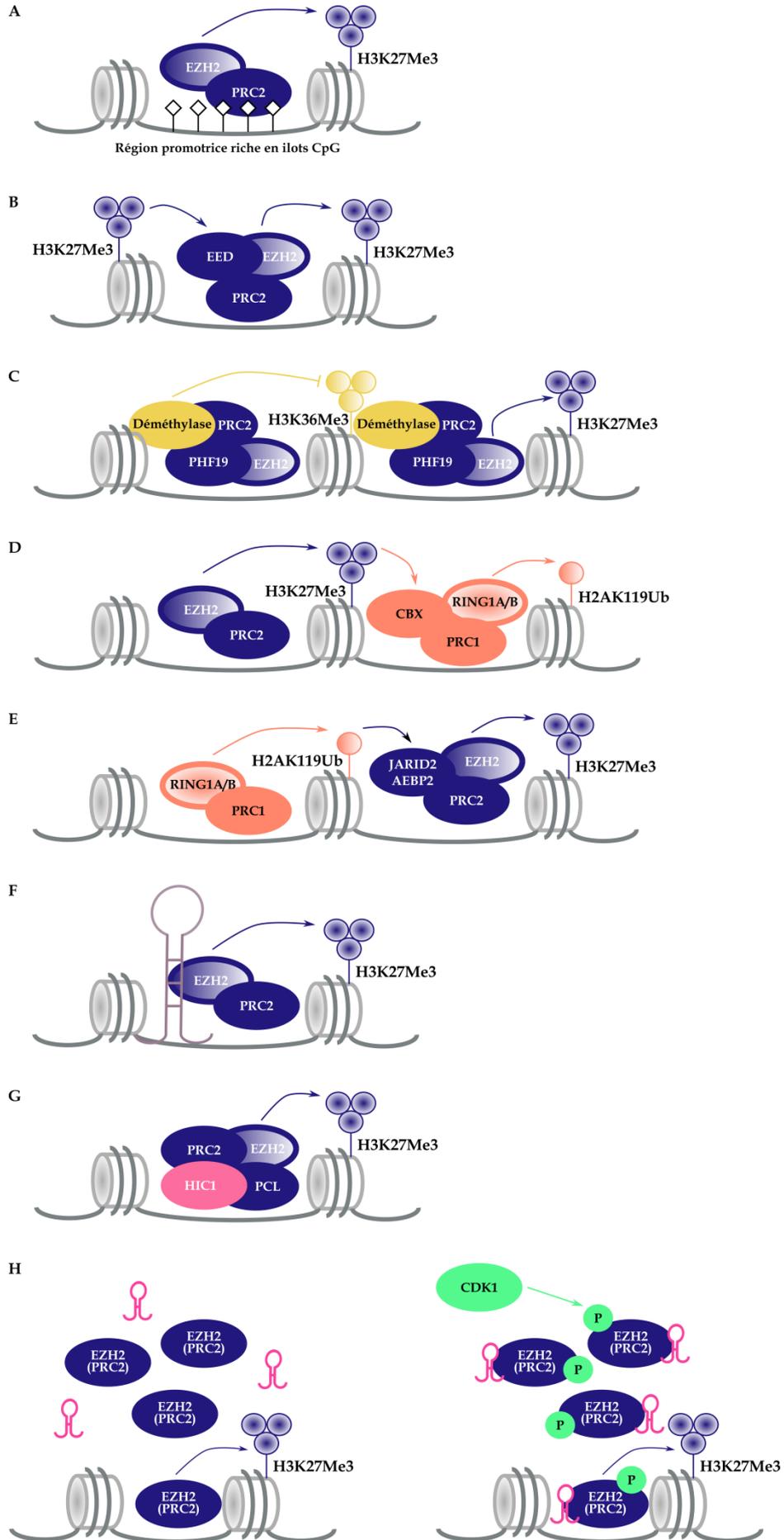
Les longs ARN non codants (lncRNA) peuvent être impliqués dans le ciblage du complexe PRC2 à des loci spécifiques (**Figure 11F**). Ces longs ARN non codants semblent présenter des caractéristiques communes de séquence (Tu et al. 2017). Parmi les lncRNA les plus connus pour interagir avec le complexe PRC2, nous pouvons citer : (1) Xist, il est transcrit à partir du centre d'inactivation du chromosome X (XIC) et est retenu dans le noyau pour agir en *cis*. Il permet l'inactivation d'un des deux chromosomes X de la femelle mammifère. Il a été montré que le chromosome inactivé est enrichi en marques H3K27Me3 et que celui-ci est dû au recrutement du complexe PRC2 par ce lncRNA Xist *via* son domaine RepA (Plath et al. 2003; Zhao et al. 2008; Maenner et al. 2010). (2) HOTAIR (HOX Antisense Intergenic RNA) a également été décrit comme pouvant interagir avec le complexe PRC2 pour le guider à des loci spécifiques. Ce lncRNA est transcrit à partir du locus HOXC et réprime la transcription en *trans* au niveau du locus HOXD grâce notamment au recrutement du complexe PRC2 et à la mise en place de la marque H3K27Me3 (Rinn et al. 2007). Cependant, une étude plus récente a émis des doutes en montrant qu'HOTAIR pourrait causer la répression transcriptionnelle indépendamment du complexe PRC2 (Portoso et al. 2017). Bien que le complexe PRC2 s'associe avec une pléthore de lncRNA, 20% environ selon une étude (Khalil et al. 2009), l'implication de ces longs ARN non codants dans le recrutement et le ciblage du complexe est parfois controversée et certains mécanismes restent à éclaircir.

Le complexe PRC2 peut également être recruté à la chromatine par des protéines. Par exemple, dans un modèle d'adénocarcinome de l'endomètre, le facteur de transcription YY1 (Yin Yang 1) réprime la transcription du gène suppresseur de tumeur *APC* en recrutant dans sa région promotrice le complexe PRC2 qui dépose sa marque H3K27Me3 (Yang et al. 2013). Il a également été montré que HIC1 (Hypermethylated In Cancer 1) interagit avec hPCL3L (longest isoform of human Polycomb-Like 3) et PHF1 (aussi appelée hPCL1 pour human Polycomb-Like 1) et qu'ils forment un complexe stable avec les membres du complexe PRC2

(**Figure 11G**). La présence de PHF1, HIC1, EZH2 et sa marque H3K27Me3 a été retrouvée sur le promoteur d'*ATOH1*. Aussi, l'abolition de l'expression de HIC1 par siRNA conduit à une diminution du recrutement d'EZH2 sur le promoteur d'*ATOH1*. Ces résultats montrent donc que HIC1 est capable de recruter EZH2 au niveau de ses gènes cibles *via* son interaction avec des protéines PCL (Boulay et al. 2012). Enfin, d'autres partenaires d'interaction du cœur protéique permettant de définir les complexes PRC2.1 et PRC2.2 semblent aussi impliqués dans la régulation du recrutement du complexe à des loci spécifiques (Holoch and Margueron 2017).

### 5. Modifications post-traductionnelles d'EZH2 :

Bien que cela soit peu documenté, les modifications post-traductionnelles d'EZH2 semblent également jouer un rôle indirect dans le recrutement du complexe PRC2 à la chromatine. Par exemple, la phosphorylation de la thréonine 372 d'EZH2 par la kinase p38 $\alpha$  activée par le TNF (Tumor Necrosis Factor) améliorerait l'interaction entre YY1 et EZH2 (Palacios et al. 2010). La phosphorylation d'EZH2 sur la thréonine 345 par la CDK1 (Cyclin-Dependent Kinase 1), quant à elle, semble augmenter sa fixation au lncRNA HOTAIR (Kaneko et al. 2010) (**Figure 11H**). EZH2 peut également être acétylée par la protéine PCAF (P300/CBP-Associated Factor) sur sa lysine en position 348. Les auteurs ont montré par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine que la surexpression de PCAF augmente l'occupation d'EZH2 et de sa marque H3K27Me3 sur le promoteur d'*HOXA10*. Ces résultats suggèrent donc que l'acétylation d'EZH2 par PCAF régule également le recrutement du complexe PRC2 sur ses gènes cibles (Wan et al. 2015). L'histone méthyltransférase du complexe PRC2 est également modifiée par ubiquitination. Par exemple, la protéine FBW7 ubiquitinye EZH2 conduisant ainsi à sa dégradation protéasomale (Jin et al. 2017). La SUMOylation semble aussi être une modification post-traductionnelle ciblant EZH2 mais les fonctions de celle-ci ne sont pas connues (Riising et al. 2008). Enfin, la O-GlcNAcylation régule également EZH2, nous reviendrons plus en détail dans la suite de ce manuscrit sur le rôle de cette modification.



### **Figure 11 : Recrutement du complexe PRC2 à la chromatine.**

(A) Le complexe Répresseur Polycomb 2 semble se fixer préférentiellement sur les régions promotrices riches en îlots CpG de ses gènes cibles. (B-C) Le dépôt de la marque répressive du PRC2 dépend de son environnement épigénétique dont de la présence de la marque H3K27Me3 elle-même (B). Celle-ci est reconnue par EED qui s'y fixe provoquant une augmentation de l'activité du complexe et permettant ainsi la propagation de la marque. (C) La protéine PHF19 du complexe PRC2 peut reconnaître les marques activateurs H3K36Me3. Le recrutement d'une déméthylase permettant l'hydrolyse de celles-ci et la mise en place de la marque H3K27Me3 conduisent donc à la répression des gènes cibles. (D) Initialement, le modèle classique de recrutement des complexes PRC1 et PRC2 était le suivant : la sous-unité CBX du complexe PRC1 reconnaît la marque H3K27Me3 mise en place par le complexe PRC2 et il s'ensuit la mise en place de la marque H2AK119Ub par la sous-unité catalytique du complexe PRC1 : RING1A/B. (E) Néanmoins, le Complexe Répresseur Polycomb 1 (PRC1) peut également recruter le complexe PRC2. Les sous-unités AEBP2 et JARID2 du complexe PRC2 sont capables de reconnaître la marque H2AK119Ub déposée par la sous-unité catalytique du PRC1, RING1A/B, permettant ainsi le recrutement du PRC2 et le dépôt de la marque H3K27Me3. (F) Les longs ARN non codants semblent également jouer un rôle dans le recrutement du complexe PRC2 au niveau de ses gènes cibles. (G) Des protéines peuvent aussi être impliquées dans le recrutement du complexe PRC2. C'est le cas de HIC1 qui recrute EZH2 au niveau de ses gènes cibles via son interaction avec des protéines PCL. (H) Les modifications post-traductionnelles régulent également le recrutement du complexe PRC2 au niveau de ses gènes cibles. Par exemple, la phosphorylation d'EZH2 sur sa thréonine en position 345 médiée par CDK1 augmente son interaction avec le lncRNA HOTAIR.

---

## 4) Fonctions physiologiques d'EZH2 :

Les protéines Polycomb sont essentielles pour le développement normal des mammifères dont l'Homme et jouent un rôle dans divers processus cellulaires. Dans ce sens, la mutation homozygote d'EZH2 conduit rapidement à une létalité embryonnaire chez la souris (O'Carroll et al. 2001). Le complexe PRC2 est également impliqué dans la régulation du cycle cellulaire en réprimant par exemple la *Cycline D1* grâce à son recrutement par JARID2 dans des cellules musculaires squelettiques (Adhikari et al. 2019). Le rôle du complexe PRC2 a aussi été mis en évidence lors de la sénescence. En effet, la baisse d'expression d'EZH2 dans les cellules sénescents conduit à la diminution de sa marque répressive et à l'activation de la transcription de certains de ses gènes cibles dont *INK4A* (Bracken et al. 2007). Il a également été montré chez la souris qu'EZH2 était capable de se fixer et de déposer la marque H3K27Me3 sur les promoteurs des gènes *Period 1* et *Period 2* tous deux impliqués dans le rythme circadien (Etchegaray et al. 2006). De même, EZH2 est impliquée dans l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches embryonnaires humaines (Collinson et al. 2016). Enfin, le dernier exemple que nous mentionnerons ici et que nous allons détailler dans les paragraphes suivants est le rôle du complexe PRC2 dans les processus de tumorigenèse en particulier au cours de la carcinogenèse colique.

### III. Implications du complexe PRC2 dans le CCR :

#### 1) Les différentes dérégulations du complexe PRC2 :

Le complexe PRC2 est dérégulé dans de nombreux cancers tels que : le cancer colorectal, de la prostate, du sein, du poumon, gastrique, les lymphomes, les gliomes pédiatriques et les désordres myéloïdes malins. Selon le cancer considéré, les dérégulations retrouvées sont de différents types : (1) surexpression de l'un ou de plusieurs membres du complexe, (2) mutations activatrices ou inhibitrices de certains de ces membres, ou (3) modulation du recrutement du complexe aux gènes cibles (Völkel et al. 2015; Yan et al. 2017). Dans la suite de mon manuscrit, mon propos ne se focalisera que sur les dérégulations du complexe PRC2 dans un contexte de cancer colorectal. Notons tout d'abord que si des mutations d'*EZH2* ont été retrouvées chez les personnes atteintes d'un cancer colorectal, le rôle de celles-ci ne semble pas décrit, nous ne développerons donc pas plus ces mutations (Yan et al. 2017; Kim et al. 2019).

##### 1. Surexpression des membres du complexe PRC2 :

Il existe une augmentation de la quantité de transcrits et de protéines *EZH2*, *EED* et *SUZ12* dans des tumeurs coliques humaines en comparaison aux tissus sains adjacents. Cette hausse est cliniquement associée à la taille et au stade de la tumeur primaire et à la présence de métastases. Les patients présentant une surexpression des membres du complexe PRC2 ont un pronostic plus sombre en matière de survie sans progression et de survie globale (Liu et al. 2015; Carvalho et al. 2018; Chen et al. 2018b). Par ailleurs, l'expression d'*EZH2* augmente durant la progression de la transformation maligne de la muqueuse normale vers l'apparition d'un adénome puis d'un carcinome (Ohuchi et al. 2018). Néanmoins, la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents est encore incomplète et soulève de nombreuses questions. De manière surprenante, certains travaux ont montré qu'une forte expression d'*EZH2* serait associée à un bon pronostic (Vilorio-Marqués et al. 2017; Bremer et al. 2019). Cette observation pourrait s'expliquer par les différents rôles qu'arbore *EZH2* et qui ne se limitent pas à son activité d'histone méthyltransférase comme nous pourrions le voir par la suite.

*EZH2* est impliquée dans la régulation de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses coliques. En effet, l'abolition de l'expression d'*EZH2* dans

différentes lignées cancéreuses coliques (RKO, HCT116, LoVo, DLD1 et SW620) diminue la prolifération et la migration, augmente l'apoptose et provoque un arrêt du cycle cellulaire (Fussbroich et al. 2011; He et al. 2015; Yao et al. 2016). A l'inverse, une augmentation de la viabilité cellulaire et de la capacité à former des colonies est observée dans les cellules LoVo surexprimant EZH2 (Chen et al. 2016). *In vivo*, l'injection de cellules SW480 dans lesquelles l'expression d'EZH2 a été abolie par shRNA conduit au développement de tumeurs d'un volume et d'une taille plus faibles par comparaison au groupe contrôle (Chen et al. 2016).

La surexpression des membres du complexe PRC2 dans le CCR peut s'expliquer par différents mécanismes. Tout d'abord, cette augmentation peut être due à différentes voies de signalisation. Par exemple, il a été montré dans différentes lignées cancéreuses coliques que l'expression d'EZH2 peut être régulée par les voies ERK et AKT *via* la fixation de Fra1 et c-jun sur son promoteur (Ferraro et al. 2013).

Les microRNA sont également à l'origine de la régulation de l'expression d'EZH2. Ces petits ARN non codants régulent l'expression de leurs cibles en se fixant sur leur région 3'UTR (3'UnTranslated Region) conduisant ainsi à la dégradation de leur ARNm ou à l'inhibition de leur traduction. Il a été montré dans des tumeurs coliques humaines une augmentation de l'expression d'EZH2 inversement corrélée à l'expression du miR-506 (**Figure 12A**). La surexpression de ce miRNA diminue la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses coliques SW480 ainsi que l'expression d'EZH2 (**Tableau 1**) (Zhang et al. 2015). Cette diminution d'expression d'EZH2 s'explique par le fait que miR-506 régule directement EZH2 en se fixant sur sa région 3'UTR. Une autre étude a prouvé que le traitement de cellules SW620 avec du jasmonate de méthyle, composant régulant la croissance et le développement des plantes ainsi que leur réponse au stress, conduit à une augmentation de l'expression du miR-101 et à une diminution de l'expression d'EZH2 (**Tableau 1**). Cette dernière est empêchée par le traitement simultané des cellules avec un anti-miR-101 suggérant que ce miRNA cible EZH2 (Peng and Zhang 2017).

De façon plus originale, les lncRNA et les miRNA peuvent être tous deux impliqués dans la régulation de l'expression d'EZH2 (**Figure 12B**). Par exemple, le lncRNA SNHG6 est surexprimé dans les tissus cancéreux coliques en comparaison à des tissus normaux et il s'avère qu'il contribue à la progression du cancer colorectal. Au vu de sa localisation cytoplasmique, les auteurs se sont demandé s'il ne pouvait pas agir en tant qu'éponge en empêchant la liaison des miRNA à ses ARNm cibles. Ils se sont particulièrement intéressés à

trois miRNA : miR-214-3p, miR-26a-5p et miR-26b-5p déjà connus comme ciblant EZH2. La surexpression de SNHG6 dans les cellules HCT116 provoque une augmentation de l'expression d'EZH2 et celle-ci est empêchée par la transfection simultanée avec un des trois miRNA. Finalement, SNHG6 contribue à la progression du cancer colorectal en empêchant la régulation négative d'EZH2 par ces trois miRNA permettant ainsi à la sous-unité catalytique du complexe PRC2 de réprimer certains de ses gènes cibles dont *p14*, *p15*, *p16* et la *E-cadhérine* (**Tableau 1**) (Xu et al. 2019b). Le lncRNA SNHG14 est également impliqué dans le développement et la progression du cancer colorectal. En effet, *in vivo*, les souris injectées avec des cellules LoVo dont l'expression de SNHG14 est abolie par shRNA présentent des tumeurs plus petites et moins de métastases du foie. L'approfondissement des mécanismes moléculaires a permis de mettre en évidence que ce lncRNA régule à la hausse l'expression d'EZH2 de deux façons : (1) il permet le recrutement de la protéine FUS, une protéine de liaison à l'ARN (RBP), conduisant ainsi à la stabilisation de l'ARNm d'EZH2 et (2) il agit comme une éponge pour empêcher la régulation négative d'EZH2 par le miR-186-5p (**Tableau 1**) (Di et al. 2019). De la même manière, le lncRNA Xist est surexprimé dans le cancer colorectal et il pourrait participer à la progression tumorale en régulant l'axe miR-137-EZH2, ce miRNA ciblant l'histone méthyl transférase du complexe PRC2 (**Tableau 1**) (Liu et al. 2018b). Il en est de même pour le lncRNA MALAT1 (Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1) dont l'expression est augmentée dans les tissus cancéreux coliques et qui pourrait contribuer au développement tumoral en régulant le miR-363-3p qui cible EZH2 (**Tableau 1**) (Xie et al. 2019).

Enfin, l'ARN circulaire (circRNA) Hsa\_circ\_0071589 est également surexprimé dans les tissus cancéreux coliques. Il est formé par rétro-épissage de l'ARN pré-messager FAT1. Ceci permet ainsi la jonction d'un site d'épissage à un autre situé en amont et la formation d'un ARN circulaire. Tout comme les lncRNA, ces ARN d'un nouveau genre peuvent réguler la transcription ou séquestrer des miRNA ou des protéines dans le cytoplasme. L'extinction de Hsa\_circ\_0071589 diminue l'expression d'EZH2 et cette baisse est empêchée par l'application d'un anti-miR-600 suggérant que l'axe Hsa\_circ\_0071589/miR-600/EZH2 puisse jouer un rôle dans le développement du cancer colorectal (**Tableau 1**) (Yong et al. 2018).

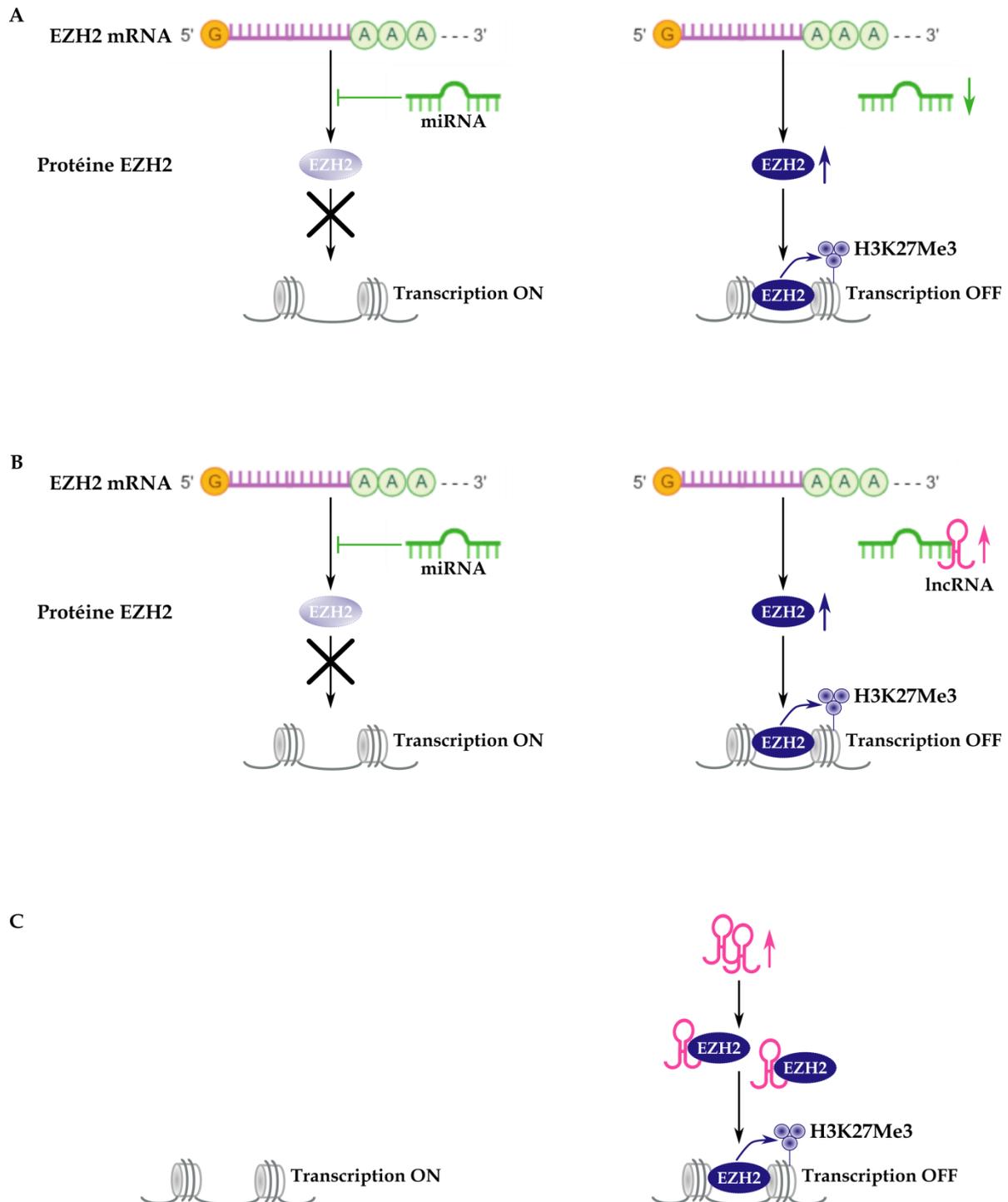
| lncRNA | miRNA                                  | ARN circulaire   | Effets biologiques<br>Modèle d'étude  |
|--------|--|------------------|---|
|        | miR-506                                |                  | Surexpression miR-506 → diminution de la prolifération, invasion, migration SW480 et diminution d'EZH2.   |
|        | miR-101                                |                  | Traitement de SW620 avec du jasmonate de méthyle → augmentation de miR-101 et diminution d'EZH2.  |
| SNHG6  | miR-214-3p<br>miR-26a-5p<br>miR-26a-5p |                  | Surexpression SNHG6 → augmentation d'EZH2 normalement régulée négativement par les 3 miRNAs. EZH2 réprime <i>p14</i> , <i>p15</i> , <i>p16</i> et <i>E-cadhérine</i>  |
| SNHG14 | miR-186-5p                             |                  | Régulation d'EZH2 par deux mécanismes : (1) recrutement de FUS → stabilisation ARNm d'EZH2 et (2) éponge pour empêcher régulation négative d'EZH2 par miR-186-5p.   |
| Xist   | miR-137                                |                  | Régulation de l'axe miR-137/EZH2, ce miRNA ciblant l'histone méthyltransférase.   |
| MALAT1 | miR-363-3p                             |                  | Régulation de l'axe miR-363-3p/EZH2, ce miRNA ciblant l'histone méthyltransférase   |
|        | miR-600                                | Hsa_circ_0071589 | Abolition de l'expression de Hsa_circ_0071589 → diminution d'EZH2. Cette baisse est empêchée par l'application anti-miR-600 → implication de l'axe Hsa_circ_0071589/miR-600/EZH2 dans progression tumorale colique. |

**Tableau 1 :** Les lncRNA, miRNA et les ARN circulaires régulent l'expression d'EZH2 et sont impliqués dans la progression tumorale colique.

## 2. Augmentation du recrutement du complexe PRC2 à la chromatine :

L'augmentation du dépôt de la marque H3K27Me3 dans le cancer colorectal peut également être causée par une hausse du recrutement du complexe PRC2 à la chromatine (**Figure 12C**). Comme mentionné précédemment, les lncRNA sont considérés comme des facteurs potentiellement impliqués dans le recrutement du complexe PRC2 au niveau de ses gènes cibles et peuvent également être dérégulés. C'est le cas notamment de HOTAIR pour qui il a été montré une augmentation de l'expression dans des tumeurs coliques humaines en comparaison aux tissus sains adjacents. Cette hausse de HOTAIR est signe de mauvais pronostic et est notamment associée à la présence de métastases du foie (Kogo et al. 2011). Dans les cellules SW620 et HCT116, l'abolition de l'expression de HOTAIR par siRNA conduit à une diminution de la prolifération de ces cellules. Par ailleurs, les auteurs ont mis en évidence par des expériences d'immunoprécipitation de l'ARN que HOTAIR interagit

directement avec EZH2 suggérant son rôle dans le recrutement de l'histone méthyl transférase sur ses gènes cibles (Huang et al. 2019). De la même manière, une hausse de l'expression du long ARN non codant BLACAT1 est associée à un mauvais pronostic clinique. *In vivo*, les souris injectées avec des cellules HCT116 dont l'expression de BLACAT1 est abolie par shRNA présentent des tumeurs plus petites. Des expériences d'immunoprécipitation de l'ARN ont permis de montrer la liaison entre BLACAT1 et EZH2 et des immunoprécipitations de la chromatine ont révélé que l'extinction de BLACAT1 diminue l'enrichissement d'EZH2 et de sa marque H3K27Me3 sur le promoteur de *p15*. Ces résultats suggèrent donc que BLACAT1 participe au développement tumoral *via* la régulation du cycle cellulaire en recrutant EZH2 sur le promoteur de *p15*. Aussi, CACNA1G-AS1 est impliqué dans le développement cancéreux et son expression est augmentée dans des tissus tumoraux coliques en comparaison aux tissus sains adjacents. Par des techniques semblables à celles décrites dans l'étude de Su et ses collaborateurs (Su et al. 2017), les auteurs ont ici montré le recrutement d'EZH2 sur le promoteur de *p53* par le lncRNA CACNA1G-AS1 entraînant ainsi la répression du gène suite au dépôt de la marque H3K27Me3 par l'histone méthyl transférase (Lj et al. 2020).



**Figure 12 :** Les miRNA et les lncRNA participent à la dérégulation de l'expression d'EZH2 dans le cancer colorectal.

(A) En condition normale (gauche), certains miRNA se fixent dans la région 3'UTR d'EZH2 permettant ainsi de réguler négativement son expression. Il a été retrouvé dans les tumeurs coliques humaines (droite) une diminution de l'expression de ces miRNA conduisant à une augmentation de l'expression d'EZH2. (B) Certains lncRNA sont capables de réguler les miRNA notamment en agissant en tant qu'éponge. L'expression de ces lncRNA est augmentée dans le cancer colorectal conduisant ainsi à une diminution de la régulation négative d'EZH2 par les miRNA. (C) L'augmentation de l'expression de certains autres lncRNA dans les tumeurs coliques humaines conduit également à une hausse du recrutement du complexe PRC2 sur ses gènes cibles.

### 3. Fonctions d'EZH2 indépendantes du complexe PRC2 :

Bien que la fonction principale d'EZH2 soit la répression de gènes cibles *via* la mise en place de la marque H3K27Me3, cette protéine pourrait également agir indépendamment du complexe PRC2 dans différents modèles de cancer dont le cancer colorectal. EZH2 peut notamment agir en tant qu'activateur transcriptionnel. Par exemple, il a été montré dans des cellules cancéreuses coliques que la protéine PAF (PCNA Associated Factor), connue pour son rôle dans la réparation de l'ADN lors de la réplication, est également impliquée dans la prolifération *via* la régulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. L'étude des mécanismes sous-jacents a permis de mettre en évidence que PAF interagit avec la  $\beta$ -caténine et EZH2. Ces trois protéines sont retrouvées sur le promoteur de gènes cibles de la  $\beta$ -caténine suite à l'activation de la voie Wnt. De plus, l'abolition de l'expression d'EZH2 par shRNA diminue la quantité de transcrits Axin2 et Cycline D1, 2 gènes cibles de la  $\beta$ -caténine. EZH2 serait donc nécessaire pour renforcer l'activation des gènes cibles de la  $\beta$ -caténine médiée par la protéine PAF. Cette activation est indépendante de l'activité d'histone méthyltransférase d'EZH2 et les autres sous-unités du cœur protéique du PRC2, SUZ12 et EED, ne sont pas retrouvées dans ce complexe (Jung et al. 2013). Une autre étude a montré que l'expression du lncRNA PCAT6 (Prostate cancer-associated ncRNA transcript 6) est augmentée dans les tissus cancéreux coliques et que cette hausse est corrélée à un mauvais pronostic. L'analyse des mécanismes moléculaires a permis de mettre en évidence la régulation de la protéine anti-apoptotique ARC (Apoptosis Repressor with Caspase recruitment domain) par ce lncRNA. L'abolition de l'expression de PCAT6 par shRNA dans les cellules HCT116 conduit à une diminution de l'enrichissement d'EZH2 et de la marque activatrice H3K4Me3 sur le locus génomique d'ARC. De plus, l'extinction d'EZH2 provoque une baisse de l'expression d'ARC et une augmentation de l'expression de la caspase-3 clivée. Ces résultats suggèrent donc que PCAT6 intervient dans le développement tumoral en augmentant l'enrichissement d'EZH2 et de la marque H3K4Me3 sur la région génomique d'ARC promouvant ainsi son activité transcriptionnelle (Huang et al. 2018).

## 2) EZH2 comme cible thérapeutique :

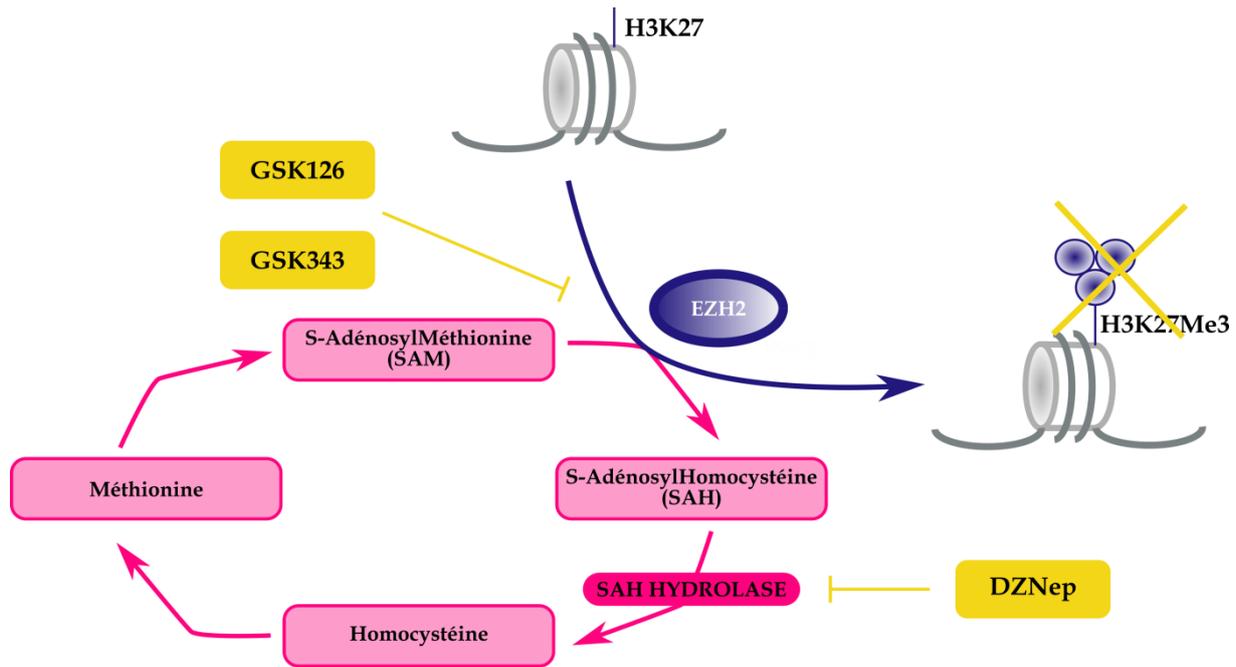
### 1. Inhibiteurs pharmacologiques :

Comme nous venons de le voir, de nombreuses études mettent en avant l'implication d'EZH2 dans le développement et la progression du cancer colorectal faisant de cette histone

méthyl transférase une potentielle cible thérapeutique. Au cours de ces dernières années de nombreux inhibiteurs se sont donc développés.

Le DZNep (3-déazaneplanocine A) est un inhibiteur de la S-AdénosylHomocystéine (SAH) hydrolase (**Figure 13**) ayant montré des propriétés anticancéreuses dans différents types de cancers et qui est utilisé pour inhiber non spécifiquement EZH2. Le traitement des cellules HCT116 avec cet inhibiteur conduit à une diminution de leur prolifération, à un arrêt du cycle cellulaire et à une augmentation de l'apoptose ainsi qu'à une diminution de la croissance cellulaire des cellules HT29 et SW480 (Benoit et al. 2013a; Sha et al. 2015). Le DZNep provoque également une baisse de l'expression protéique d'EZH2, SUZ12 et/ou EED dans différentes lignées cancéreuses coliques : HCT116, RKO et SW620 (Ferraro et al. 2014; Sha et al. 2015). Une baisse de la marque épigénétique répressive H3K27Me3 est aussi retrouvée dans plusieurs lignées : HCT116, RKO, SW620, HT29, SW480 et dans des cellules souches cancéreuses coliques (Benoit et al. 2013b, 2013a; Ferraro et al. 2014). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont mis en évidence la diminution de l'enrichissement de la marque H3K27Me3 sur le promoteur de plusieurs gènes dont *PTEN*, *TNFRSF10A* et *TNFRSF10B* respectivement dans des cellules souches cancéreuses coliques ou dans les cellules HT29 traitées avec le DZNep (Benoit et al. 2013b, 2013a). *In vivo*, l'injection de cellules cancéreuses coliques HT29 traitées au DZNep conduit à la formation de tumeurs plus petites par rapport au groupe contrôle (Benoit et al. 2013b).

Le GSK343 est un inhibiteur compétitif de la SAM (S-AdénosylMéthionine) (**Figure 13**) qui est, rappelons-le, le donneur de groupement méthyl. Le traitement des cellules SW480 avec cet inhibiteur diminue la prolifération (Tao et al. 2017). Une inhibition de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules RKO est observée lorsqu'elles sont traitées avec le GSK343. Cet inhibiteur provoque également dans ces cellules une diminution de l'expression d'EZH2 ainsi qu'une baisse de sa marque répressive (Ying et al. 2018). Le GSK126 (**Figure 13**) est une autre petite molécule ayant le même mode d'action que le GSK343. Une baisse de la marque H3K27Me3 a été observée dans les cellules cancéreuses coliques Colo205 et HCT116 traitées avec le GSK126. Plus particulièrement, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont démontré une diminution de cette marque sur le promoteur du gène *CLDN23* (claudin-23) (Maryan et al. 2015).



**Figure 13 : Inhibiteurs d'EZH2.**

Plusieurs molécules ont été développées pour cibler EZH2. Le DZNep est un inhibiteur non spécifique d'EZH2 ciblant la SAH hydrolase. Le GSK343 et le GSK126 sont des inhibiteurs compétitifs de la SAM.

## 2. Composés naturels :

Des agents naturels pourraient également inhiber EZH2, cependant leurs mécanismes d'action sont peu compris. C'est le cas notamment de l'EGCG (EpiGalloCatechin-3-Gallate) qui est la principale catéchine du thé vert. Une diminution de la prolifération, de l'invasion, de la migration ainsi qu'un arrêt du cycle cellulaire ont été montrés dans les cellules RKO traitées avec ce composant. De plus, cette molécule diminue les niveaux de H3K27Me3 (Ying et al. 2018). Par ailleurs, l'EGCG provoque une baisse de l'expression d'EZH2 dans des lignées HCT116 et SW480 résistantes au 5-FU. *In vivo*, le traitement de souris, ayant reçu une xélogreffe de sphéroïdes de cellules souches cancéreuses, avec l'EGCG conduit à la formation de tumeurs de taille plus faible en comparaison au groupe contrôle (Toden et al. 2016). D'autres travaux se sont intéressés à l'effet d'extraits de graines d'*Alcea rosea*, une plante vivace plus connue sous le nom de rose trémière. *In vivo*, l'injection de ces extraits à des souris ayant reçu une xélogreffe de cellules HCT116 inhibe la croissance tumorale définie par un poids et un volume tumoral plus faibles. Ces extraits de graines de plante sont aussi capables de diminuer l'expression d'EZH2 (Ahmed et al. 2016). Une étude a également

montré les propriétés anti-tumorales du curcumin *in vivo*. Le traitement de souris, ayant reçu une xenogreffe de cellules HCT116 résistantes au 5-FU, avec ce composant ralentit le développement tumoral avec la formation de tumeurs d'un poids et d'un volume tumoral plus faibles. *In vitro*, le traitement de cellules HCT116 et SW480 résistantes au 5FU réduit l'expression d'EZH2 et les niveaux H3K27Me3 (Toden et al. 2015).

Comme nous venons de le voir, de nombreuses expériences ont montré le rôle clé d'EZH2 dans le développement du cancer colorectal. Cependant, les processus de dérégulations de cette protéine sont variés tout comme ses rôles qui ne se limitent finalement pas à son statut d'histone méthyltransférase. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents permettra à terme de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant EZH2.

## **Partie III :**

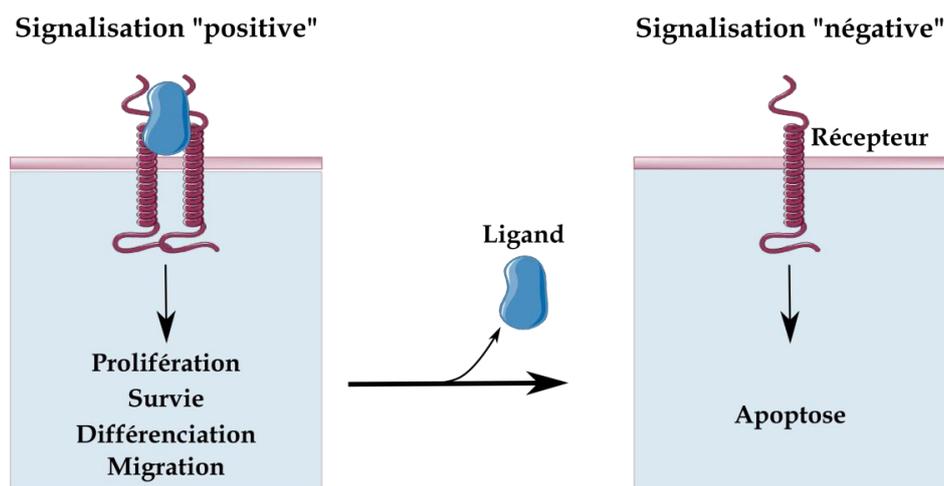
# **Les récepteurs à dépendance de la famille UNC5H**

## Partie III : Les récepteurs à dépendance de la famille

### UNC5H

#### I. Généralités sur les récepteurs à dépendance :

Les récepteurs membranaires ont longtemps été considérés comme inactifs en absence de leur ligand. Cependant, un nouveau concept a émergé il y a une vingtaine d'années avec la découverte de récepteurs capables d'induire deux signalisations opposées (Mehlen et al. 1998; Mehlen and Bredesen 2004). En présence de leur ligand, ces récepteurs activent une signalisation « positive » (prolifération, survie, différenciation et migration) alors qu'en l'absence de leur ligand, ils déclenchent une signalisation « négative » : l'apoptose (**Figure 14**). Les cellules exprimant ces récepteurs sont donc dépendantes à la présence de ligand dans leur environnement pour survivre. C'est pourquoi, ces récepteurs sont nommés « récepteurs à dépendance ».



**Figure 14 :** Notion de récepteur à dépendance.

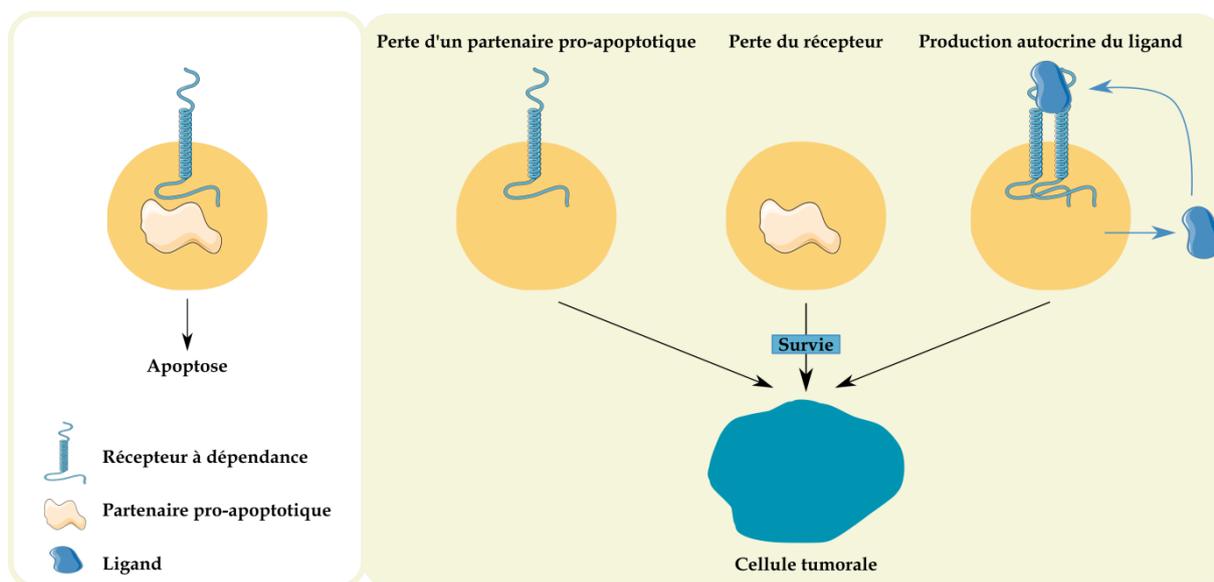
Les récepteurs à dépendance peuvent induire une double signalisation. En présence de leur ligand, ils se dimérisent et déclenchent un signal « positif » en activant plusieurs voies de signalisation. Ces dernières sont impliquées dans la prolifération, la survie, la différenciation et la migration. En absence de leur ligand, les récepteurs à dépendance, sous forme de monomère, déclenchent un signal « négatif » en induisant l'apoptose.

A ce jour, une vingtaine de récepteurs à dépendance ont été découverts, parmi lesquels : DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma), la Néogenine, p75NTR (p75 NeuroTrophin Receptor), Patched-1, CDON (cell-adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes), Plexine-D1, RET, TrkA et TrkC (Tropomyosin Receptor kinase A and C), EphA4 (Ephrin type A receptor 4), MET, IR (Insulin Receptor) et IGF-1R (Insulin-like Growth Factor 1 Receptor), ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase), les Intégrines  $\alpha 5\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$ , Kremen-1, Notch3, Latrophilin et les 4 récepteurs de la famille UNC5H (Uncoordinated 5 Homolog) : UNC5H1, UNC5H2, UNC5H3 et UNC5H4 aussi connus sous le nom de UNC5A, UNC5B, UNC5C, et UNC5D respectivement (Negulescu and Mehlen 2018).

Bien qu'ils partagent la propriété de pouvoir induire deux signalisations opposées, ces récepteurs ne présentent pas d'homologie structurale. D'un point de vue fonctionnel, ils sont tous impliqués dans le développement de l'organisme ainsi que dans la tumorigenèse. La perte des récepteurs à dépendance représente un avantage sélectif pour les cellules tumorales qui échappent ainsi à l'apoptose. Il a par exemple été montré une perte de l'expression de DCC dans plusieurs cancers (Fang et al. 1998; Ho et al. 1999; Meimei et al. 2011) dont le cancer colorectal pour lequel cette baisse est corrélée à un mauvais pronostic (Shibata et al. 1996; Saito et al. 1999). Cette diminution est en partie due à une perte d'hétérozygotie et à des dérégulations épigénétiques (Šturlan et al. 1999; Shin et al. 2007; Hibi et al. 2009b). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont également permis de mettre en évidence un enrichissement de la marque répressive H3K27Me3 sur le promoteur de *DCC* dans plusieurs lignées cancéreuses coliques (Derks et al. 2009). Par ailleurs, les cellules tumorales possèdent d'autres alternatives pour éviter la mort cellulaire : la dérégulation des partenaires pro-apoptotiques des récepteurs à dépendance et la production autocrine ou paracrine de ligand (**Figure 15**). Nous reviendrons sur ces différentes dérégulations en se focalisant sur le cas des récepteurs à dépendance de la famille UNC5H dans la suite de ce manuscrit.

En outre, il a été montré dans l'intestin de souris portant une mutation de DCC (D1290N) une diminution de l'apoptose. Cette baisse est cohérente puisque DCC est clivée par les caspases après l'acide aspartique en position 1290. Nous reviendrons ultérieurement sur ce clivage qui est une étape essentielle à l'induction de la mort cellulaire. Par ailleurs, 14,8% des souris mutées développent des tumeurs intestinales spontanées en comparaison aux souris

contrôles qui n'en présentent pas. La perte de DCC est un événement tardif parmi les différentes altérations retrouvées dans le cancer colorectal. C'est pourquoi, les auteurs ont effectué le même type d'analyse sur un fond génétique APC muté. Les souris portant la mutation de DCC présentent toutes des adénocarcinomes contre 50% des souris contrôles. Enfin, l'apoptose est aussi diminuée dans les adénomes de souris portant la mutation de DCC (Castets et al. 2012). Ces résultats montrent donc que les récepteurs à dépendance peuvent limiter la progression tumorale en induisant la mort cellulaire. Cette aptitude a permis de les qualifier de « gènes suppresseurs de tumeurs conditionnels ».



**Figure 15 :** Mécanismes permettant à une cellule tumorale d'échapper à l'activité pro-apoptotique induite par les récepteurs à dépendance.

En absence de ligand, les récepteurs à dépendance déclenchent l'apoptose. La perte du récepteur ou d'un de ses partenaires pro-apoptotiques ou encore la production autocrine ou paracrine du ligand sont donc des avantages sélectifs pour une cellule tumorale. Elles échappent alors à l'apoptose induite par les récepteurs à dépendance.

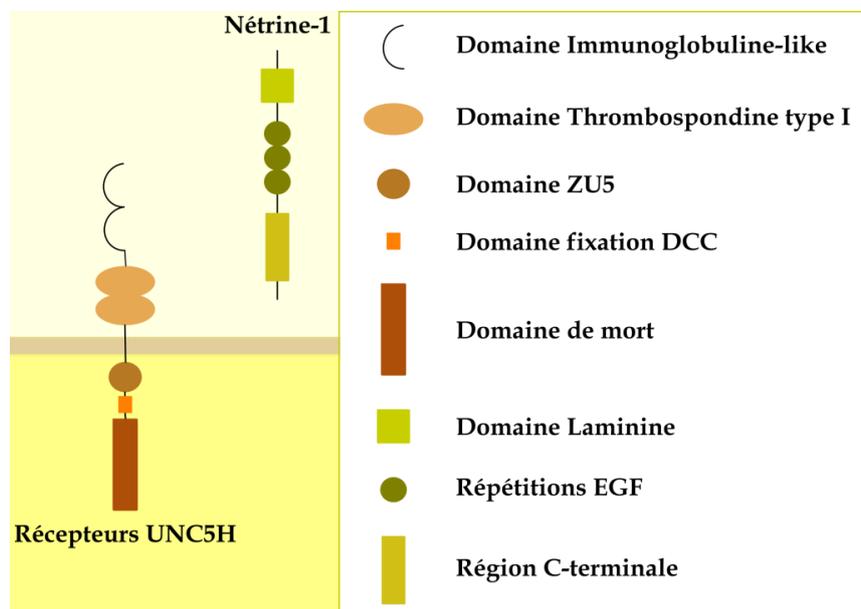
## II. Les récepteurs à dépendance de la famille UNC5H :

### 1) Structure et expression des récepteurs UNC5H :

La famille des récepteurs transmembranaires UNC5H comporte quatre membres : UNC5A, UNC5B, UNC5C et UNC5D codés respectivement par des gènes situés sur les chromosomes 5, 10, 4 et 8. Chez les mammifères, ces protéines s'expriment dans le système

nerveux en développement (Leonardo et al. 1997; Barrett and Guthrie 2001). Elles peuvent également être retrouvées au cours du développement au niveau d'autres structures telles que la glande mammaire, l'œil, les vaisseaux sanguins ou le bourgeon de membre (Engelkamp 2002). Chez l'adulte, leur expression semble ubiquitaire (Thiébaud et al. 2003).

D'un point de vue structural (**Figure 16**), ces récepteurs sont constitués du côté extracellulaire de deux domaines immunoglobuline-like et de deux domaines thrombospondine de type I. Du côté intracellulaire, ils comportent trois domaines : un domaine ZU5 (Zona Occludens 5), un domaine d'interaction avec le récepteur DCC et un domaine de mort homologue à celui des récepteurs de mort de la famille des TNF.



**Figure 16 : Structure de la nétrine-1 et des récepteurs UNC5H.**

Les récepteurs UNC5H sont composés de deux domaines immunoglobuline-like, deux domaines thrombospondine de type I, un domaine transmembranaire, un domaine ZU5, un domaine DB (DCC-Binding) et un domaine de mort. La nétrine-1, leur ligand, est composée d'un domaine laminine N-terminal, d'une région intermédiaire contenant trois répétitions EGF et d'une région C-terminale.

Les récepteurs UNC5H partagent le même ligand que DCC et la néogénine : la nétrine-1. Il s'agit d'une protéine sécrétée ressemblant d'un point de vue structural aux protéines de type laminine. Elle est composée d'un domaine laminine N-terminal, d'une région intermédiaire contenant trois répétitions EGF (Epidermal Growth Factor) et d'un domaine C-terminal riche en acides aminés chargés positivement (**Figure 16**). La nétrine-1 se

fixe aux récepteurs UNC5H *via* leurs domaines immunoglobuline-like (Geisbrecht et al. 2003; Kruger et al. 2004; Grandin et al. 2016) qui induisent dans ce cas une signalisation positive.

## 2) Signalisations induites par les récepteurs UNC5H :

### 1. La signalisation positive :

En présence de nétrine-1, les récepteurs UNC5H sont capables d'activer les voies de signalisation classiques impliquées dans la prolifération, la survie, la différenciation et la migration. A titre d'exemple, il a été montré qu'UNC5A est capable d'activer plusieurs Rho GTPase (RhoA, Rac1 et Cdc42) impliquées dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine (Picard et al. 2009). UNC5B semble interagir avec des protéines kinases appartenant à la famille des Src comme Fyn (Ren et al. 2008). Ce récepteur peut également interagir avec une GTPase, PIKE-L, pour activer la voie de signalisation PI3K (Tang et al. 2008). Par ailleurs, il semble aussi exister une faible interaction entre UNC5C et PIKE-L indépendamment de la présence de nétrine-1 (Tang et al. 2008). Enfin, la nétrine-1 paraît induire *via* sa fixation aux récepteurs UNC5H l'activation la voie p38 MAPK (Lv et al. 2015).

### 2. La signalisation négative :

En absence de nétrine-1, les récepteurs UNC5H déclenchent une signalisation « négative » : l'apoptose. L'induction de ce signal nécessite un ensemble de prérequis ainsi que l'accomplissement de deux événements : le clivage de leur domaine intracellulaire par des caspases et le recrutement de différents partenaires pro-apoptotiques.

#### i. Régulation du switch signal « positif » / signal « négatif » :

La localisation cellulaire des récepteurs à dépendance de la famille UNC5H semble jouer un rôle dans la régulation de l'induction de l'apoptose. En effet, les récepteurs UNC5A, UNC5B et UNC5C sont localisés au niveau des radeaux lipidiques et cette localisation semble indépendante de la présence du ligand (Maisse et al. 2008). Il a été montré que la désorganisation des radeaux lipidiques avec un traitement à la cholestérol oxydase conduit à une diminution de l'apoptose induite par UNC5B (Maisse et al. 2008). Dans cette étude, les auteurs ont par ailleurs mis en évidence que ce récepteur est palmitoylé. Cette modification ne régule pas la localisation du récepteur mais semble cependant importante pour l'induction de l'apoptose. En présence de nétrine-1, les récepteurs UNC5H forment des complexes multimériques. Il a été montré que la dimérisation forcée du récepteur UNC5B diminue son activité apoptotique (Mille et al. 2009) suggérant que la monomérisation des

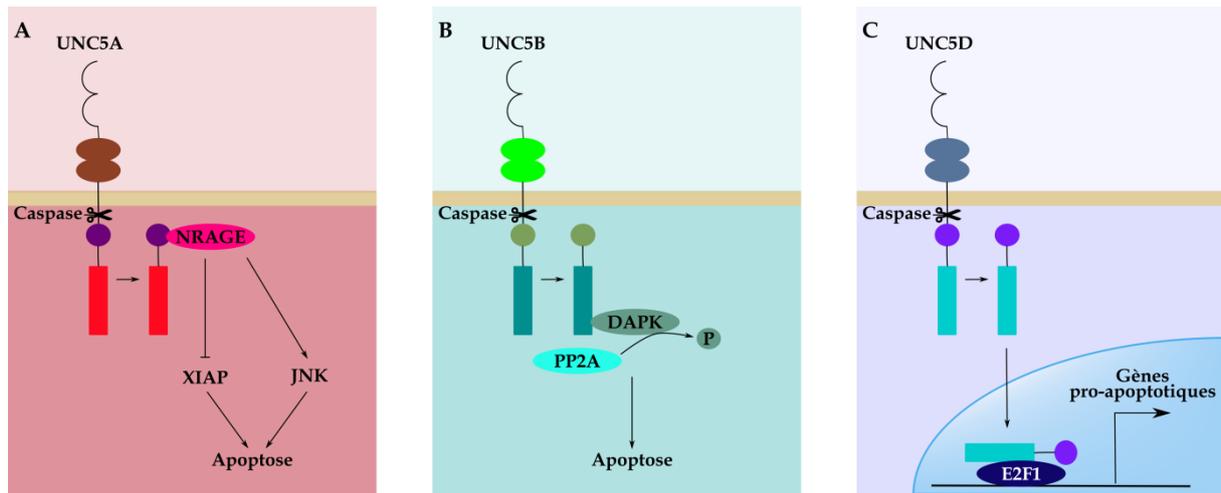
récepteurs UNC5H soit un prérequis pour l'induction de l'apoptose. Par ailleurs, des analyses cristallographiques ont mis en évidence que la partie cytoplasmique du récepteur UNC5B était capable d'adopter deux conformations : (1) une conformation « fermée » dans laquelle son domaine de mort interagit avec son domaine ZU5 et (2) une conformation « ouverte » compatible avec l'induction de l'apoptose. Dans ce sens, la présence de nétrine-1 ne peut empêcher l'activité apoptotique d'un mutant UNC5B constitutivement ouvert (Wang et al. 2009).

### ii. Clivage par les caspases et recrutement de partenaires pro-apoptotiques :

Le clivage de la partie intracellulaire des récepteurs à dépendance est le premier événement indispensable à l'induction de l'apoptose. Les récepteurs UNC5H sont clivés *in vitro* par la caspase 3 et semblent avoir un résidu unique de clivage (Llambi et al. 2001; Zhu et al. 2013). Le résidu d'acide aspartique en position 412 est le site de clivage d'UNC5B. La mutation D412N de ce récepteur conduit à une diminution de l'induction de l'apoptose montrant le rôle crucial du clivage par les caspases dans l'initiation de l'apoptose (Llambi et al. 2001). Le clivage permettrait en effet de libérer et d'exposer les domaines DD et ZU5 des récepteurs UNC5H leur donnant ainsi la possibilité de recruter des partenaires pro-apoptotiques. Ces derniers s'avèrent être différents pour chaque récepteur.

UNC5A interagit avec la protéine NRAGE, appartenant à la famille des protéines MAGE (melanoma antigen), *via* son domaine ZU5 (**Figure 17A**). Plusieurs mécanismes pourraient expliquer que cette interaction puisse mener à l'apoptose : la dégradation des XIAP (X-linked Inhibitor of apoptosis) ou l'activation de la voie JNK (c-Jun N-term Kinase) (Williams et al. 2003). Par ailleurs, UNC5B interagit avec la protéine DAPK (**Figure 17B**) (Death-Associated Protein Kinase) entre autres *via* leur domaine de mort respectif. Il a également été montré que la coexpression d'UNC5B avec un mutant dominant négatif de DAPK conduit à une diminution de l'apoptose induite par ce récepteur. De plus, l'interaction entre UNC5B et DAPK permet d'activer la kinase maintenue jusqu'alors inactive grâce à son autophosphorylation sur son résidu de sérine en position 308. La coexpression du récepteur à dépendance et de DAPK provoque en effet une diminution de cette autophosphorylation inhibitrice alors que la présence de la nétrine-1 la restaure (Llambi et al. 2005). Cette baisse de phosphorylation est médiée par le recrutement de la phosphatase PP2A (Protein Phosphatase 2A) (Guenebeaud et al. 2010). Une fois activée, DAPK peut déclencher l'apoptose par des mécanismes dépendants et indépendants de p53. Concernant UNC5C, peu d'informations sont documentées mais il ne semble pas interagir avec la protéine

NRAGE (Williams et al. 2003). Enfin, le fragment d'UNC5D libéré suite au clivage des caspases peut être directement transloqué dans le noyau où il se fixe au facteur de transcription E2F1 (Figure 17C). Il en résulte la transactivation de gènes pro-apoptotiques tels que les *caspases 3, 7 et 9* (Zhu et al. 2013). Cependant, UNC5D semble également pouvoir interagir avec DAPK1 et l'activer (Dong et al. 2019).



**Figure 17:** Signalisation pro-apoptotique induite par les récepteurs UNC5H en absence de nétrine-1.

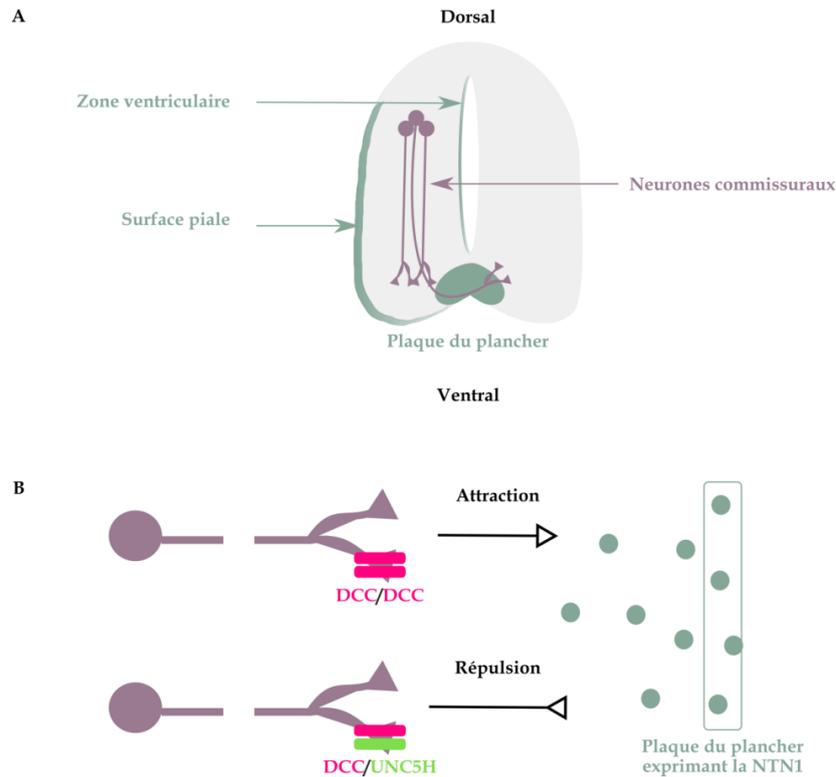
(A) UNC5A est clivé puis il interagit avec la protéine NRAGE via son domaine ZU5. Plusieurs mécanismes peuvent ensuite expliquer l'induction de l'apoptose : l'inhibition des XIAP ou l'activation de la voie JNK. (B) Le fragment clivé de UNC5B interagit avec la protéine DAPK en partie via son domaine de mort. Ce récepteur recrute également la phosphatase PP2A afin d'activer DAPK qui arbore une autophosphorylation inhibitrice sur sa sérine en position 308. Une fois activée, DAPK induit l'apoptose par des mécanismes dépendants et indépendants de p53. (C) UNC5D est clivé, le fragment qui en résulte est ensuite transloqué dans le noyau où il va interagir avec E2F1 pour transactiver des gènes pro-apoptotiques.

### 3) Rôles physiologiques des récepteurs UNC5H :

#### 1. Rôle dans le développement du système nerveux central :

Le rôle de la nétrine-1 et de ses récepteurs au cours du développement du système nerveux a fait l'objet de nombreux travaux. Bien qu'ils soient par exemple impliqués dans le développement du système nerveux entérique (Ko et al. 2012), nous focaliserons ici notre propos sur le développement du système nerveux central. La bonne structuration du cerveau passe par la connexion de neurones à des cellules cibles rendue possible grâce aux axones. Les axones des neurones commissuraux sont projetés ventralement. Ils traversent ensuite la ligne médiane pour se connecter à des neurones cibles situés de l'autre côté du cerveau

(**Figure 18A**). Le guidage axonal est orchestré par la présence de molécules dans l'environnement capables de se fixer sur des récepteurs situés au niveau du cône de croissance des axones. Parmi ces molécules, la nétrine-1 est certainement l'une des plus étudiées. Le modèle de guidage axonal initial propose que la nétrine-1, fortement exprimée au niveau de la plaque du plancher, diffuse selon un gradient ventro-dorsal. Cette molécule peut alors attirer ou repousser les axones. Pour se faire, elle se fixe respectivement à un homodimère de récepteurs DCC ou à un hétérodimère de récepteurs DCC/UNC5H exprimés à la surface du cône de croissance des axones (**Figure 18B**) (Boyer and Gupton 2018). Cependant, les propriétés de chimiotactisme et de diffusion de la nétrine-1 ont récemment été remises en question. Cette molécule est également produite par les progéniteurs neuraux de la zone ventriculaire (**Figure 18A**). En utilisant divers modèles génétiquement modifiés pour la nétrine-1, plusieurs études récentes ont montré que la production de cette molécule par la plaque du plancher n'est pas nécessaire pour le guidage des axones commissuraux. A l'inverse, la nétrine-1 produite par les progéniteurs de la zone ventriculaire et déposée sur la surface piaie semble jouer un rôle important dans le guidage axonal (**Figure 18A**) (Dominici et al. 2017; Varadarajan et al. 2017; Yamauchi et al. 2017). Le nouveau modèle propose donc que la nétrine-1 intervienne dans le guidage axonal de courte durée en se comportant comme une molécule d'adhésion. Finalement, elle se caractériserait comme une molécule haptotactique plutôt que chimiotactique.



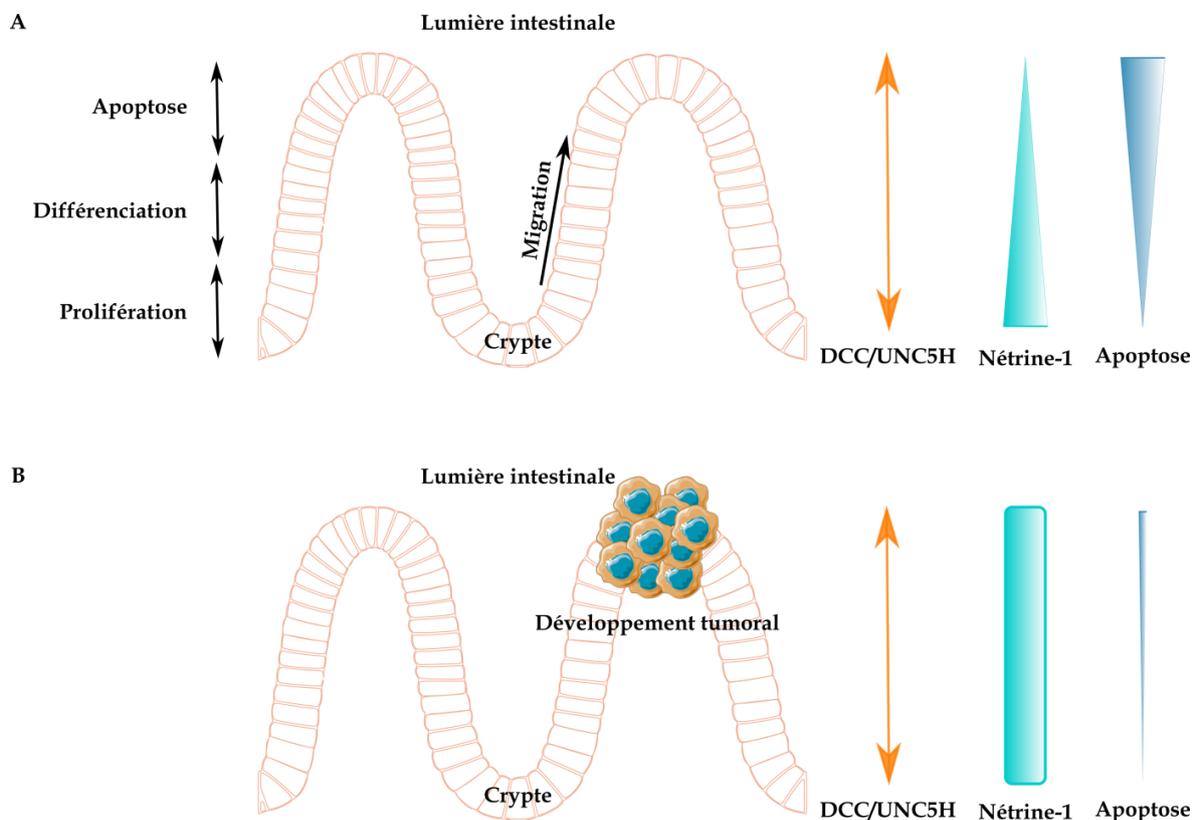
**Figure 18 : La nétrine-1 et les récepteurs à dépendance dans le guidage axonal.**

(A) Plusieurs zones du système nerveux produisent de la nétrine-1 : la plaque du plancher et les progéniteurs neuraux de la zone ventriculaire. Le ligand produit par ces derniers est ensuite déposé sur la surface piaie. Par ailleurs, les axones des neurones commissuraux se projettent ventralement pour franchir la ligne médiane. Cela permet leur connexion à des cellules cibles situés de l'autre côté du cerveau. (B) Le modèle initial propose que ces axones soient guidés par des gradients de molécules diffusibles dont la nétrine-1 (NTN1) produite au niveau de la plaque du plancher. Cette molécule va se fixer sur des récepteurs situés au niveau des cônes de croissance des axones. La fixation de la nétrine à l'homodimère DCC/DCC ou à l'hétérodimère DCC/UNC5H conduit respectivement à un effet attractif ou répulsif. Cependant, le modèle initial tel que nous venons de le décrire a récemment été remis en cause. La nétrine-1, produite par les progéniteurs neuraux de la zone ventriculaire et accumulée au niveau de la surface piaie, jouerait également un rôle crucial dans le guidage axonal.

## 2. Rôle dans le maintien de l'homéostasie intestinale chez l'adulte :

Alors que le rôle de la nétrine-1 et de ses récepteurs au cours du développement a largement été exploré, moins d'études ont décrit leurs implications physiologiques chez l'adulte. Les récepteurs UNC5H et DCC permettraient pourtant le maintien de l'homéostasie intestinal. Il existe une expression différentielle de la nétrine-1 et des récepteurs UNC5H et DCC dans les cryptes intestinales. Alors que le ligand est exprimé à la base de la crypte, les récepteurs sont présents tout le long de l'épithélium. Les cellules en bas de la crypte exprimant les récepteurs et étant dans un environnement riche en ligand sont donc préservées de l'apoptose. A l'inverse, les cellules migrant vers le haut de la crypte se retrouvent progressivement dans un milieu pauvre en nétrine-1 conduisant finalement à leur

mort (**Figure 19A**) (Bernet and Mehlen 2005; Mehlen and Llambi 2005; Mehlen and Guenebeaud 2010; Mehlen and Tauszig-Delamasure 2014). Le gradient de nétrine-1 constituerait donc un mécanisme de surveillance qui permet notamment l'élimination de cellules retrouvées dans un environnement inadapté ou soumises à diverses agressions. Dans ce sens, il a été montré que la surexpression de nétrine-1 dans l'intestin de souris conduit à une diminution de l'apoptose. Cela provoque également la formation spontanée de lésions hyperplasiques et d'adénomes (Mazelin et al. 2004). Ces résultats soutiennent donc l'hypothèse que la nétrine-1 et ses récepteurs soient impliqués dans le contrôle de la progression tumorale (**Figure 19B**).



**Figure 19 : DCC/UNC5H et la nétrine-1 contrôlent l'homéostasie intestinale.**

(A) Il existe un gradient de nétrine-1 dans la crypte intestinale alors que les récepteurs DCC/UNC5H sont exprimés uniformément. Les cellules à la base de la crypte prolifèrent dans un environnement riche en nétrine-1. A l'inverse, les cellules migrant vers le haut de la crypte se retrouvent progressivement dans un environnement pauvre en ligand. Elles finissent donc par mourir par apoptose. (B) La surexpression de nétrine-1 dérégule l'homéostasie intestinale et représente un avantage sélectif pour le développement tumoral.

### III. Les récepteurs UNC5H et la nétrine-1 dans le cancer :

#### 1) Dérégulations des récepteurs UNC5H :

##### 1. UNC5A et cancer :

Plusieurs études ont rapporté une baisse de l'expression d'UNC5A dans les cancers tels que : la vessie (Zhu et al. 2014), le sein (Padua et al. 2018), le poumon non à petites cellules (Ding et al. 2018), l'ovaire, l'utérus, l'estomac, le rein et le cancer colorectal (Thiébaud et al. 2003; Paradisi et al. 2008). Cette diminution d'expression a été corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers du sein (Padua et al. 2018) et du poumon non à petites cellules (Ding et al. 2018). Une perte d'hétérozygotie semble pouvoir en partie expliquer cette dérégulation de l'expression d'UNC5A dans le cancer colorectal. Néanmoins, le traitement des cellules cancéreuses coliques HT29 avec un inhibiteur spécifique d'histone déacétylase, la trichostatine A, conduit à une augmentation de l'expression d'UNC5H suggérant également l'existence d'une régulation épigénétique de ces récepteurs (Thiébaud et al. 2003).

Par ailleurs, le rôle d'UNC5A dans la régulation de la croissance cellulaire a été étudié *in vitro*. La surexpression d'UNC5A conduit à une diminution de la formation de colonies dans des lignées cancéreuses de la vessie (Zhu et al. 2014) et de glioblastome (Miyamoto et al. 2010). UNC5A est également capable d'induire l'apoptose dans des lignées cancéreuses de glioblastome, de neuroblastome et colique (Miyamoto et al. 2010). *In vivo*, l'injection de cellules cancéreuses mammaires TMCF7 dans lesquelles l'expression d'UNC5A a été abolie par shRNA conduit au développement de tumeurs alors que les souris contrôles n'en présentent pas (Padua et al. 2018). Ces résultats prouvent donc bien l'implication d'UNC5A dans le contrôle de la progression tumorale.

De manière intéressante, il a été montré que le récepteur UNC5A joue un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN. En effet, il a été mis en évidence une augmentation d'UNC5A dans des cellules cancéreuses de la vessie traitées à la cisplatine (Zhu et al. 2014). Cette hausse a également été retrouvée dans trois organes de souris soumises à des irradiations  $\gamma$  : le colon, le thymus et la rate (Miyamoto et al. 2010). Ces différentes augmentations n'ont pas été observées ni dans des lignées cancéreuses de la vessie « p53 muté ou nul » ni dans des souris p53<sup>-/-</sup> (Miyamoto et al. 2010; Zhu et al. 2014) suggérant un rôle de p53 dans la régulation de l'expression de UNC5A en réponse à des dommages à

l'ADN. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis de confirmer qu'UNC5A est une cible directe de p53 (Miyamoto et al. 2010). Enfin, l'abolition de l'expression d'UNC5A par siRNA dans des cellules traitées à la cisplatine conduit à une hausse de la viabilité cellulaire suggérant un rôle de ce récepteur dans l'apoptose induite par la cisplatine (Zhu et al. 2014).

### 2. UNC5B et cancer :

Une perte d'expression d'UNC5B est aussi retrouvée dans divers cancers tels que : la vessie (Liu et al. 2013), l'ovaire, le sein, l'utérus, l'estomac, le poumon, le rein et le cancer colorectal (Thiébaud et al. 2003; Okazaki et al. 2012). Il a été montré dans le cancer de la vessie que cette diminution est de plus en plus importante au fur et à mesure que le stade tumoral augmente (Liu et al. 2013). De plus, cette diminution d'expression a été corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers de la vessie et colorectal (Paradisi et al. 2008; Okazaki et al. 2012; Liu et al. 2013). Une perte d'hétérozygotie et des altérations épigénétiques pourraient expliquer la perte d'expression d'UNC5B dans le cancer colorectal (Thiébaud et al. 2003).

L'implication d'UNC5B dans la régulation de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses a été mise en évidence *in vitro* et *in vivo*. En effet, la surexpression de ce récepteur dans une lignée cancéreuse de vessie conduit à une diminution de la prolifération, de la migration et à un arrêt du cycle cellulaire. Les auteurs ont également montré que l'injection de cellules 5637 surexprimant UNC5B conduit à un ralentissement de la progression tumorale. Les tumeurs formées sont plus petites que celles retrouvées dans le groupe contrôle (Kong et al. 2016).

Tout comme UNC5A, UNC5B joue un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN. En effet, une augmentation de l'expression d'UNC5B est retrouvée dans des cellules cancéreuses coliques traitées à l'adriamycine (également appelée doxorubicine) (Tanikawa et al. 2003). L'expression d'UNC5B est aussi induite dans la rate, le thymus et le colon de souris soumises à des irradiations  $\gamma$  (Miyamoto et al. 2010). Ces augmentations ne sont pas retrouvées dans des lignées cancéreuses ou des souris p53<sup>-/-</sup> (Tanikawa et al. 2003; Miyamoto et al. 2010) suggérant une fois de plus l'implication de p53 dans la régulation d'un récepteur UNC5H. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont révélé la fixation de p53 sur UNC5B dans des cellules cancéreuses traitées à l'adriamycine (Tanikawa et al. 2003). Enfin, UNC5B semble pouvoir réguler la résistance des cellules cancéreuses de la

vessie à une autre chimiothérapie : la cisplatine. En effet, l'abolition de l'expression de ce récepteur par siRNA diminue l'apoptose induite par la cisplatine et augmente la survie cellulaire (Liu and Li 2020).

### 3. UNC5C et cancer :

Il a été rapporté une baisse de l'expression d'UNC5C dans plusieurs cancers tels que : l'ovaire, le sein, l'utérus, l'estomac, le rein, le poumon et le cancer colorectal (Thiébaud et al. 2003; Bernet et al. 2007; Paradisi et al. 2008). En outre, la faible expression d'UNC5C dans les tumeurs coliques humaines a été corrélée à un mauvais pronostic (Wu et al. 2017b). La perte d'hétérozygotie semble être une des altérations à l'origine de la baisse d'expression d'UNC5C (Thiébaud et al. 2003; Lv et al. 2011). Par ailleurs, elle peut également s'expliquer par des altérations épigénétiques et notamment une hyperméthylation du promoteur dans différents types de cancers (Bernet et al. 2007; Hibi et al. 2009a, 2009b, 2009c, 2012; Lv et al. 2011; Toda et al. 2015; Guroo et al. 2018).

De plus, la surexpression d'UNC5C dans une lignée cancéreuse de rein diminue la prolifération, la formation de colonies et la migration (Lv et al. 2011). *In vivo*, il a été montré qu'une mutation perte de fonction d'UNC5C chez des souris présentant un fond génétique APC altéré conduit à une augmentation du nombre de tumeurs de haut grade en comparaison aux tumeurs des souris contrôles (Bernet et al. 2007). L'inactivation d'UNC5C semble donc provoquer *in vivo* une augmentation de la progression tumorale. Enfin, de manière intéressante, la surexpression d'UNC5C couplée à des drogues telles que la cisplatine ou l'étoposide permet d'améliorer la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques. En effet, ces cellules présentent une baisse de leur viabilité en comparaison aux cellules contrôles. Ces résultats suggèrent donc qu'UNC5C participe à l'apoptose induite par les chimiothérapies (Lv et al. 2011).

### 4. UNC5D et cancer :

L'expression du récepteur UNC5D est également en baisse dans de nombreux cancers tels que : le rein (Lu et al. 2013), la thyroïde (Zhang et al. 2017a), la vessie (Zhu et al. 2014c) et la prostate (Dong et al. 2019). Une fois de plus, la perte d'hétérozygotie et des altérations épigénétiques semblent être à l'origine de cette diminution d'expression dans divers cancers (Lu et al. 2013; Dong et al. 2019).

Par ailleurs, le rôle d'UNC5D dans la régulation de la prolifération, de la migration et de l'invasion des cellules cancéreuses a été étudié *in vitro* et *in vivo*. Il a été montré dans plusieurs lignées cancéreuses que la surexpression d'UNC5D diminue la prolifération, la formation de colonies, la migration, l'invasion et induit l'apoptose (Lu et al. 2013; Wang et al. 2014a; Zhu et al. 2014c; Zhang et al. 2017a; Dong et al. 2019). *In vivo*, l'injection de cellules cancéreuses de la thyroïde surexprimant UNC5D limite la progression tumorale. En effet, ces souris présentent des tumeurs caractérisées par un volume et un poids plus faibles en comparaison aux tumeurs des souris contrôles (Zhang et al. 2017a). De plus, des souris ayant reçu une injection de cellules cancéreuses de la prostate surexprimant UNC5D présentent moins de métastases pulmonaires en comparaison aux souris contrôles (Dong et al. 2019).

Les dommages à l'ADN conduisent également à une augmentation de l'expression d'UNC5D. En effet, une hausse est observée dans des cellules cancéreuses traitées à l'adriamycine ainsi que dans la rate, le thymus et le colon de souris soumises à des irradiations  $\gamma$  (Wang et al. 2008; Miyamoto et al. 2010). Ces augmentations ne sont pas retrouvées dans des cellules cancéreuses déficientes en p53 ou dans les organes de souris p53<sup>-/-</sup>. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis de mettre en évidence qu'UNC5D est une cible directe de p53 (Wang et al. 2008). Il a également été montré qu'UNC5D contribue à l'apoptose médiée par l'adriamycine. En effet, la transfection d'un siUNC5D couplée à un traitement avec cette chimiothérapie diminue la proportion de cellules en Sub-G0/G1 en comparaison aux cellules transfectées avec un siRNA contrôle (Wang et al. 2008). De la même manière, la surexpression d'UNC5D améliore la sensibilité de cellules cancéreuses de la vessie à la cisplatine. En effet, l'abolition de l'expression de ce récepteur par siRNA limite l'apoptose induite par cette chimiothérapie (Zhu et al. 2014c).

## 2) Dérégulations des partenaires pro-apoptotiques :

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la perte d'UNC5H n'est pas le seul moyen pour la cellule cancéreuse d'échapper à l'apoptose induite par ces récepteurs. La dérégulation des partenaires pro-apoptotiques est en effet une autre manière pour éviter la mort cellulaire. A titre d'exemple, l'expression de la protéine DAPK semble altérée dans le cancer colorectal. Cette diminution d'expression est corrélée à un mauvais pronostic en terme de survie globale (Chen et al. 2012) et peut s'expliquer par une hyperméthylation de son promoteur (Yamaguchi et al. 2003; Mittag et al. 2006). Cette altération épigénétique de

DAPK paraît aussi corrélée à un risque de cancer du sein (Qi and Xiong 2018), du poumon (Zhang et al. 2018b), de la tête et du cou (Cai et al. 2017) et de l'estomac (Jia et al. 2016). Enfin, une étude a montré dans des cellules cancéreuses coliques que le partenaire pro-apoptotique d'UNC5H pourrait être régulé par mir-103/107 dont l'expression est inversement corrélée à celle de DAPK (Chen et al. 2012).

### 3) Dérégulations de la nétrine-1 :

Enfin, la production autocrine ou paracrine de ligand est aussi un moyen pour la cellule d'échapper à l'apoptose. Dans ce sens, il a été montré une augmentation de l'expression de la nétrine-1 dans divers cancers tels que : l'ovaire (Papanastasiou et al. 2011), le gliome (Chen et al. 2017a) et le cancer du sein métastatique (Fitamant et al. 2008) par exemple. Une étude a par ailleurs mis en évidence une augmentation de la nétrine-1 dans 10% des tumeurs coliques analysées (Paradisi et al. 2008). En outre, des travaux ont montré que le taux de nétrine-1 plasmatique augmente chez des patients atteints de divers types de cancers. Ces résultats suggèrent donc que cette protéine puisse être utilisée comme un biomarqueur diagnostique (Ramesh et al. 2011).

Alors que nous avons vu précédemment que l'expression des récepteurs UNC5H peut être régulée par les chimiothérapies, celle de la nétrine-1 semble aussi l'être. En effet, l'expression de la nétrine-1 augmente dans plusieurs lignées cancéreuses traitées avec diverses drogues telles que la cisplatine, le 5-fluorouracile, la doxorubicine et le taxol. Cette hausse est également retrouvée chez des patients ayant reçu une chimiothérapie. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont révélé que p53 se fixe sur le promoteur de la *nétrine-1* suite à l'induction de dommages à l'ADN par une chimiothérapie (Paradisi et al. 2013).

### 4) UNC5H et la nétrine-1 comme cibles thérapeutiques :

Au vu de la hausse d'expression de la nétrine-1 dans les cellules cancéreuses, consécutivement ou non à une chimiothérapie, bloquant ainsi la réponse pro-apoptotique médiée par ses récepteurs, des stratégies empêchant la fixation de la nétrine-1 à ses récepteurs ont été envisagées dans le but de booster l'apoptose des cellules tumorales. Dans ce sens, il a été montré que l'application d'une drogue empêchant la liaison nétrine-

1/UNC5A (dénommée TRAP-netrin<sup>UNC5A</sup>) ou de doxorubicine ralentit légèrement le développement tumoral de souris injectées avec des cellules cancéreuses de poumon résistantes à la chimiothérapie. En revanche, la combinaison de la TRAP-netrin<sup>UNC5A</sup> et de la doxorubicine provoque une inhibition du développement tumoral. Cette dernière est corrélée à une augmentation de l'apoptose (Paradisi et al. 2013). Dans la même optique, une étude a montré dans un modèle murin de cancérogenèse colique induite par l'AOM et le DSS que l'injection de l'anticorps net1-mAb bloquant l'interaction nétrine-1/UNC5B diminue le développement tumoral colique. En effet, 66,7% des souris contrôles développent des adénocarcinomes coliques contre 14,3% de celles injectées avec l'anticorps net1-mAb (Grandin et al. 2016). Les auteurs ont également mis en évidence dans différents modèles murins de xenogreffe que cet anticorps inhibe la croissance tumorale (Grandin et al. 2016). De plus, la combinaison de dacarbazine (agent chimiothérapeutique) avec cet anticorps bloquant augmente significativement la survie de souris injectées avec des cellules de mélanome (Boussouar et al. 2020). Cet anticorps bloquant fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase I dont les résultats intermédiaires ont été publiés récemment. Il semble être bien toléré par les patients et son activité clinique paraît encourageante (Cassier et al. 2019).

Enfin, une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la perte des récepteurs UNC5H ou de leurs partenaires permettrait la poursuite du développement de stratégies thérapeutiques pour prévenir ces diminutions. Leurs altérations semblent en partie épigénétiques, c'est pourquoi, l'utilisation d'épidrogues pourrait être envisagée.

**Partie IV :**  
**La *O*-GlcNAcylation**

## **Partie IV : La O-GlcNAcylation**

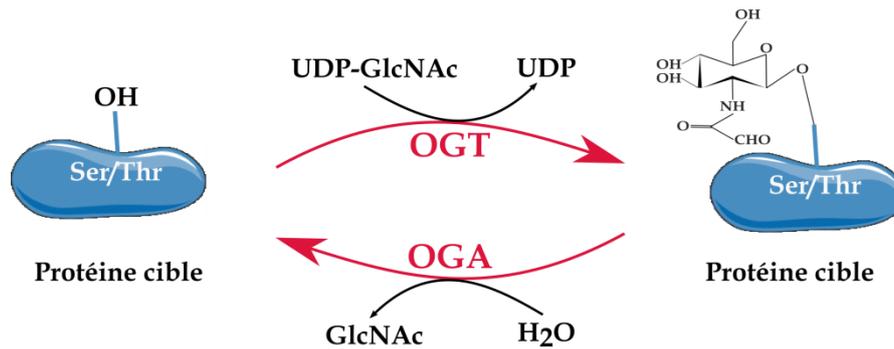
---

---

### **I. Histoire et généralités :**

#### **1) La O-GlcNAcylation : une modification post-traductionnelle conservée et abondante :**

Alors qu'ils s'intéressaient à la distribution des résidus de N-AcetylGlucosamine terminaux à la surface des lymphocytes, Torres et Hart ont découvert en 1984 une nouvelle forme de glycosylation : la  $\beta$ -N-AcetylGlucosaminylation également appelée O-GlcNAcylation (Torres and Hart 1984). Cette modification post-traductionnelle diffère des glycosylations complexes. En effet, la O-GlcNAcylation consiste en l'ajout d'un résidu unique de N-AcetylGlucosamine (GlcNAc) sur les groupements hydroxyles de sérine ou thréonine de protéines cytoplasmiques, nucléaires et mitochondriales (**Figure 20**) (Bond and Hanover 2015; Joiner et al. 2019b). Cette glycosylation est réversible et sa dynamique est régulée par un couple unique d'enzymes : (1) l'O-linked  $\beta$ -N-acetyl-D-GlucosaminylTransférase (OGT ou O-GlcNAc Transférase) catalyse le transfert du résidu de GlcNAc à partir du nucléotide sucre donneur : l'Uridine-DiPhosphate-N-AcetylGlucosamine (UDP-GlcNAc) et (2) de manière antagoniste, l'O-linked  $\beta$ -N-acetyl-D-Glucosaminidase (OGA ou O-GlcNAcase) hydrolyse ces mêmes résidus (**Figure 20**). L'UDP-GlcNAc est synthétisé *via* la voie de biosynthèse des hexosamines (voie HBP) qui intègre différents métabolites: glucose, acides aminés, acides gras et nucléotides faisant de la O-GlcNAcylation une modification dépendante du statut nutritionnel de l'organisme (Hart 2019). Cet aspect sera développé ultérieurement dans le manuscrit. De nombreux autres stress perturbent le dynamisme de O-GlcNAcylation comme par exemple : le stress oxydatif, les chocs thermiques ou encore le stress du réticulum endoplasmique (Groves et al. 2013; Chen et al. 2018a).



**Figure 20:** La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle réversible des protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales.

L'OGT catalyse l'ajout d'un résidu unique de N-AcétylGlucosamine (GlcNAc) sur la protéine cible à partir de l'UDP-GlcNAc. L'OGA est responsable de l'hydrolyse du résidu de GlcNAc.

A ce jour, la O-GlcNAcylation est considérée comme une modification post-traductionnelle abondante avec plusieurs milliers de protéines cibles (Ma and Hart 2014). Les nucléoporines, protéines intervenant dans la formation du pore nucléaire, ont été parmi les premières protéines O-GlcNAcylées identifiées (Hanover et al. 1987; Holt et al. 1987; Snow et al. 1987). Plus récemment, il a été montré l'importance de cette modification dans le maintien de l'intégrité du pore nucléaire *via* notamment une régulation de la stabilité et des interactions des nucléoporines (Mizuguchi-Hata et al. 2013; Zhu et al. 2016b). De manière plus globale, la O-GlcNAcylation modifie des protéines appartenant à différentes classes fonctionnelles mais la majorité d'entre-elles sont impliquées dans la transcription et la traduction (Zachara et al. 2015). Nous reviendrons dans la suite de ce manuscrit sur la régulation des propriétés protéiques et des principaux mécanismes cellulaires fondamentaux par O-GlcNAcylation. Cette glycosylation est donc une modification sensible à divers stress et capable de réguler différents processus cellulaires. De plus, la dérégulation de l'homéostasie de cette dernière est associée à différentes pathologies telles que : le diabète, les maladies neurodégénératives, la déficience intellectuelle liée au chromosome X, les maladies cardiovasculaires mais aussi les cancers (Banerjee et al. 2016; Vaidyanathan et al. 2017; Nie and Yi 2019).

Chez l'Homme, la O-GlcNAcylation est retrouvée dans de nombreux types cellulaires et tissus (Shafi et al. 2000; Yang and Qian 2017). Elle est également très conservée entre les espèces (Aquino-Gil et al. 2017) hormis chez la levure où elle n'est pas retrouvée. En effet, cette modification est aussi présente chez de nombreux autres organismes dont les

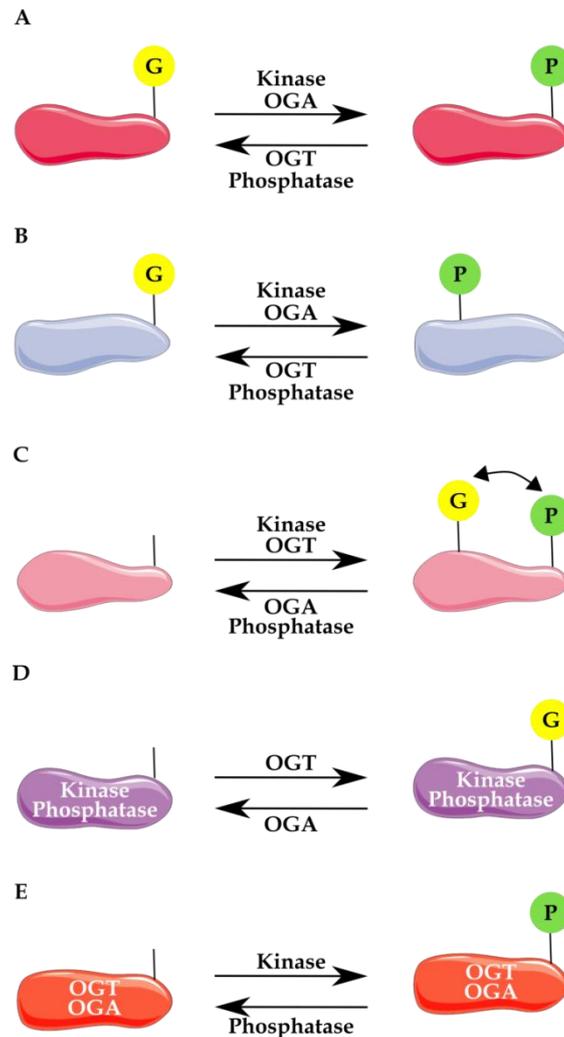
nématodes (*Caenorhabditis elegans*) (Qin et al. 2019), les parasites (*Plasmodium falciparum*) (Kupferschmid et al. 2017), les bactéries (*Listeria monocytogenes*) (Schirm et al. 2004) et les virus (Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus) (Jochmann et al. 2013). En revanche, son existence chez les plantes reste un sujet de controverse. En effet, même si deux homologues de l'OGT ont été décrits chez les plantes : SPY (SPINDLY) et SEC (SECRET AGENT) et que plusieurs protéines *O*-GlcNAcylées ont pu être identifiées, des travaux récents ont suggéré que SPY serait plutôt une *O*-fucosyltransférase (Zentella et al. 2016, 2017; Wang et al. 2020). Par ailleurs, aucune étude n'a à ce jour prouvé l'existence de l'OGA chez les plantes.

## 2) Interaction entre la *O*-GlcNAcylation et les autres modifications post-traductionnelles :

### 1. Relation entre la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation :

La *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation sont deux modifications post-traductionnelles partageant des caractéristiques communes : (1) leur substrat donneur est un produit de synthèse du métabolisme cellulaire, (2) elles modifient des résidus de sérine ou thréonine et (3) leurs protéines cibles peuvent être communes (Bond and Hanover 2015). Il n'est donc pas insignifiant que de nombreuses études montrent une interaction entre ces deux modifications. Cette relation peut se retrouver au niveau de leurs substrats où elles sont capables de coopérer ou d'entrer en compétition au niveau de sites voisins ou identiques (**Figure 21**) (van der Laarse et al. 2018). Par exemple, le facteur de transcription c-myc peut être phosphorylé ou *O*-GlcNAcylé sur la thréonine 58 située dans son domaine de transactivation (Chou et al. 1995b, 1995a; Kamemura et al. 2002). La phosphorylation de la thréonine 62 de c-myc assure sa stabilité alors que la déphosphorylation de ce résidu permet son ubiquitination et sa dégradation protéasomale. Or la déphosphorylation du résidu thréonine 62 de c-myc requiert la phosphorylation préalable du résidu thréonine 58. En entrant en compétition avec la phosphorylation de la thréonine 58, la *O*-GlcNAcylation protège ainsi c-myc de la dégradation protéasomale (**Figure 21A**) (Makwana et al. 2019). La  $\beta$ -caténine est également sujette à la *O*-GlcNAcylation et à la phosphorylation sur un site identique. Comme nous le détaillerons ultérieurement dans le manuscrit, Olivier-Van Stichelen et ses collaborateurs ont montré que la *O*-GlcNAcylation entre en compétition avec la phosphorylation de la thréonine 41 de la  $\beta$ -caténine pour empêcher sa dégradation protéasomale et ainsi la stabiliser (**Figure 21A**) (Olivier-Van Stichelen et al. 2014b). De la

même manière, il a été montré que la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation de p53 sur des sites voisins contrôlent sa stabilité. En effet, nous reverrons plus tard que la *O*-GlcNAcylation de la sérine 149 de p53 permettrait sa stabilisation en entrant en compétition avec une phosphorylation voisine (Phospho-Thr155) impliquée dans la dégradation de cette protéine (**Figure 21B**) (Yang et al. 2006). Sur d'autres protéines, les deux modifications post-traductionnelles peuvent être retrouvées simultanément suggérant une coopération entre elles (**Figure 21C**). Par exemple, les acides aminés Ser150 et Ser23/24 de la troponine I (TnI) sont respectivement des sites modifiés par *O*-GlcNAcylation ou phosphorylation et l'exposition de trabécules cardiaques à de la GlcNAc ne modifie pas les niveaux de Phospho-Ser23/24-TnI (Ramirez-Correa et al. 2008). Cependant, la relation intrinsèque existant entre la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation ne se limite pas à une compétition ou à une coopération au niveau de leurs substrats. En effet, les kinases/phosphatases peuvent également être régulées par *O*-GlcNAcylation et *vice versa* (**Figure 21 D-E**). C'est le cas notamment de la CAMK IV dont la *O*-GlcNAcylation sur la sérine 189 inhibe la phosphorylation sur la thréonine 200 nécessaire à son activité (Dias et al. 2009). La régulation du couple OGT/OGA par phosphorylation sera traitée ultérieurement dans le manuscrit.



**Figure 21 : Relations entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation.**

Les deux modifications post-traductionnelles peuvent entrer en compétition pour (A) un site identique ou (B) un site voisin. (C) La O-GlcNAcylation et la phosphorylation peuvent coopérer pour la régulation de leur protéine cible commune. La relation entre ces deux modifications post-traductionnelles passe aussi par la régulation des kinases/phosphatases par O-GlcNAcylation (D) et vice versa (E).

## 2. Relation entre la O-GlcNAcylation et les autres modifications post-traductionnelles :

Bien que la relation entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation soit la plus étudiée, la O-GlcNAcylation interagit également avec d'autres modifications post-traductionnelles. Comme nous l'avons déjà évoqué dans le paragraphe précédent, la O-GlcNAcylation peut indirectement réguler l'ubiquitination et la stabilité des protéines *via* la phosphorylation. Cependant, il existe aussi des liens plus directs entre la O-GlcNAcylation et l'ubiquitination. Par exemple, PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) est O-

GlcNAcylée sur la sérine 333 et il a été montré dans des cellules HEK293T que l'inhibition de l'OGA augmente la demi-vie de ce co-activateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme. De plus, la mutation S333A de PGC-1 $\alpha$  conduit à une hausse de son ubiquitination. La O-GlcNAcylation de cette protéine assurerait donc sa stabilité en empêchant sa dégradation protéasomale (Ruan et al. 2012). D'autre part, la O-GlcNAcylation peut aussi favoriser la monoubiquitination, en particulier des histones. Bien que la O-GlcNAcylation de ces protéines reste sujette à la controverse, nous pouvons citer l'exemple de l'histone H2B. La O-GlcNAcylation de la sérine 112 de cette dernière semble promouvoir la monoubiquitination de la lysine 120 qui est une marque associée à une transcription active (Fujiki et al. 2011). Par ailleurs, la O-GlcNAcylation peut également interagir avec l'acétylation et à titre d'exemple, nous pouvons citer le cas de la sous-unité RelA de NF- $\kappa$ B. En effet, l'abolition de l'expression de l'OGT par ARN interférence dans des cellules HEK293T diminue l'acétylation du résidu K310 de RelA (Allison et al. 2012). Dans cette étude, les auteurs ont plus particulièrement mis en évidence le rôle de la O-GlcNAcylation de la thréonine 305 de RelA dans la promotion de l'acétylation de la lysine 310 impliquée dans l'activité du facteur de transcription.

### 3) L'EOGT : une nouvelle O-GlcNAc Transférase :

Plus récemment, une nouvelle forme de O-GlcNAcylation, catalysée par l'EOGT (EGF domain-specific O-GlcNAc Transferase), a été retrouvée sur un fragment extracellulaire du récepteur Notch de la drosophile (Matsuura et al. 2008) et des mammifères (Sakaidani et al. 2012). L'EOGT, résidente du réticulum endoplasmique, catalyse le transfert de GlcNAc à partir d'UDP-GlcNAc sur les résidus de sérine et thréonine de répétitions EGF-like (Epidermal Growth Factor like) de protéines membranaires ou sécrétées (Matsuura et al. 2008; Sakaidani et al. 2011; Alfaro et al. 2012). Cette enzyme est conservée entre les différentes espèces mais présente peu d'homologies avec l'OGT (Varshney and Stanley 2017). Des mutations de cette enzyme ont été retrouvées chez des patients atteints du syndrome d'Adam-Olivers (AOS) (Shaheen et al. 2013; Cohen et al. 2014; Schröder et al. 2019). Cette nouvelle forme de O-GlcNAcylation n'ayant pas fait pas l'objet de mes travaux de thèse, elle ne sera pas plus développée dans la suite de ce manuscrit.

## II. La O-GlcNAc Transférase :

L'utilisation de peptides de synthèse a initialement permis à Haltiwanger et ses collaborateurs de mettre en évidence dans les réticulocytes de lapin l'enzyme responsable de l'ajout des résidus de GlcNAc sur les protéines cibles : la O-GlcNAc Transférase (Haltiwanger et al. 1990). Deux ans plus tard, cette enzyme a été purifiée et caractérisée dans le foie de rat (Haltiwanger et al. 1992).

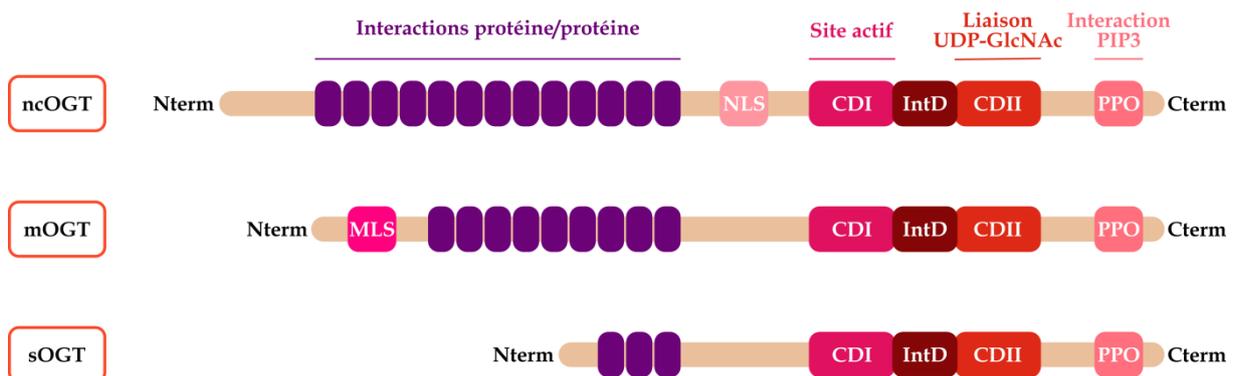
L'OGT est une enzyme de Leloir qui utilise un nucléotide sucre donneur comme substrat de réaction : l'UDP-GlcNAc, produit final de la voie de biosynthèse des hexosamines (voie HBP). Elle catalyse la liaison covalente de type  $\beta$ -glycosidique entre le résidu de GlcNAc et les groupements hydroxyles de sérine ou thréonine de la protéine cible *via* un mécanisme bi-bi ordonné. En outre, cette enzyme est indépendante des ions métalliques (Lazarus et al. 2011; Janetzko and Walker 2014).

Bien que les glycosyltransférases catalysent des réactions similaires, leurs différentes spécificités ont été prises en compte pour l'établissement de la classification CAZy (Carbohydrate-Active enZymes) (Coutinho et al. 2003). Cette dernière compte aujourd'hui 110 familles et classe l'OGT dans la famille GT41. Par ailleurs, il a également été montré par des expériences de cristallographie par rayons X et de mutagenèse que l'OGT adopte une structure GT-B (Clarke et al. 2008) consistant en deux domaines de type Rossmann avec le site actif se trouvant dans la fente (Lairson et al. 2008).

### 1) Structure de l'OGT :

L'OGT est très conservée (Hart et al. 2007; Aquino-Gil et al. 2017). Elle est codée chez l'Humain par un gène unique composé de 23 exons et 21 introns. Ce dernier est situé sur le bras long du chromosome X au locus Xq13.1 à proximité du locus Xist (X inactive specific transcripts) impliqué dans l'inactivation d'un des deux chromosomes X de la femelle mammifère (Shafi et al. 2000; Hanover et al. 2003; Olivier-Van Stichelen et al. 2014a). Trois isoformes de l'OGT sont produites par épissage alternatif : (1) une forme longue nucléocytoplasmique (ncOGT) de 110 kDa codée par tous les exons (Hanover et al. 2003), (2) une forme courte (sOGT) de 75 kDa codée par les exons 10 à 23 (Shafi et al. 2000; Nolte and Müller 2002; Hanover et al. 2003) et (3) une forme mitochondriale (mOGT) de 103 kDa codée

par les exons 5 à 23 (Love et al. 2003) (**Figure 22**). La présence d'une séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence), composée de trois acides aminés (DFP – résidus 451 à 453) et capable de se fixer à l'importine  $\alpha 5$ , permet les localisations cytoplasmique et nucléaire de la forme longue de l'OGT (**Figure 22**). Par ailleurs, il a également été décrit que la O-GlcNAcylation de l'OGT sur la sérine 389, site se trouvant à proximité de la séquence NLS, joue un rôle dans cette localisation (Seo et al. 2016). Bien que les fonctions de la mOGT soient controversées (Trapannone et al. 2016a; Sacoman et al. 2017), elle possède une séquence putative de ciblage à la mitochondrie (**Figure 22**) (Love et al. 2003). Ces trois isoformes diffèrent de par leur localisation subcellulaire et leurs fonctions. Aussi, elles se distinguent par un nombre de répétitions tétratricopeptides (TPR) variable dans leur domaine N-terminal : les ncOGT, mOGT et sOGT contiennent respectivement 13, 9 et 3 TPR (**Figure 22**) (Hanover et al. 2010). Elles possèdent toutes la même région C-terminale comportant le domaine catalytique (**Figure 22**).



**Figure 22 : Structure des trois isoformes de l'OGT.**

Trois isoformes sont produites par épissage alternatif à partir du gène de l'OGT : une forme nucléocytoplasmique : la ncOGT qui contient une séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence), une forme mitochondriale : la mOGT qui comporte une séquence putative de ciblage à la mitochondrie (MLS) et une forme courte : la sOGT. Ces trois isoformes partagent le même domaine C-terminal. Celui-ci est composé d'un domaine CDI comportant le site actif, d'un domaine Int-D et d'un domaine CDII contenant une poche dans laquelle vient se fixer l'UDP du nucléotide sucre donneur. Elles comportent également un domaine PPO de fixation aux  $PI(3,4,5)P_3$ . En revanche, les trois isoformes diffèrent de par leur nombre de répétitions tétratricopeptides (TPR) présentes dans leur région N-terminale. Les ncOGT, mOGT et sOGT possèdent respectivement 13, 9 et 3 TPR.

## 1. Le domaine N-terminal :

Le domaine N-terminal de l'OGT est composé de répétitions tétratricopeptides (**Figure 22**). Elles représentent des motifs structuraux retrouvés dans plus de 5000 protéines identifiées dans différents organismes de la bactérie à l'Homme et servant de module

d'interaction. Une répétition tétratricopeptide consiste en une séquence consensus de 34 acides aminés faiblement conservés à l'exception de certains résidus : position 4 (Tryptophane), position 7 (Leucine), position 8 (Glycine), position 11 (Tyrosine), position 20 (Alanine), position 24 (Phénylalanine), position 27 (Alanine) et position 32 (Proline). Les répétitions tétratricopeptides s'organisent en hélices  $\alpha$  antiparallèles résultant finalement en une super-hélice (Das et al. 1998; Jínek et al. 2004; Allan and Ratajczak 2011; Zeytuni and Zarivach 2012).

Des études princeps ont montré que l'OGT pouvait entre autres être retrouvée sous forme d'homo- ou d'hétéro-trimère (Haltiwanger et al. 1992; Kreppel and Hart 1999). Comme mentionné ci-dessus, les domaines tétratricopeptides étant impliqués dans les interactions protéine-protéine, Kreppel et Hart ont construit différents mutants délétés de répétitions TPR afin de vérifier leur implication dans la multimérisation et l'activité de l'OGT (Kreppel and Hart 1999). Ils ont ainsi pu mettre en évidence que la délétion de trois répétitions ne change pas l'activité de l'OGT et qu'elle peut être retrouvée en trimère. En revanche, la délétion de six répétitions empêche l'OGT de se multimériser bien que son activité reste identique suggérant ainsi que la multimérisation n'est pas essentielle à l'activité de l'enzyme. Seule la délétion de neuf répétitions TPR conduit à une perte d'activité de l'OGT. Lubas et Hanover ont également travaillé sur le rôle des répétitions tétratricopeptides de l'OGT en utilisant différents mutants de la partie N-terminale (Lubas and Hanover 2000). Ils ont ainsi pu mettre en évidence une diminution et une perte totale de la *O*-GlcNAcylation respectivement de Nup62 et de la Caséine Kinase 2 (CK2) lors de la délétion des trois premiers motifs TPR. Ils ont aussi remarqué une augmentation de l'auto-*O*-GlcNAcylation de l'OGT lors de la suppression des six premières répétitions tétratricopeptides. Ces résultats suggèrent donc le rôle primordial de ces répétitions dans la reconnaissance optimale de la protéine cible et excluent leur implication dans l'activité de l'enzyme. Enfin, la délétion d'environ la moitié des répétitions TPR empêche la fixation de la protéine OIP106 (OGT-interacting protein) à l'OGT prouvant une fois de plus le rôle clé de ces motifs dans l'interaction de l'OGT avec ses partenaires (Iyer and Hart 2003). Des travaux plus récents ont montré le rôle de plusieurs résidus asparagines conservés et situés dans le domaine N-terminal de l'OGT à la limite du domaine catalytique dans la reconnaissance et la fixation de ses protéines cibles (Rafie et al. 2017; Levine et al. 2018; Joiner et al. 2019a).

Plusieurs mutations ont été reportées sur le gène de l'OGT chez des patients atteints de déficience intellectuelle liée au chromosome X. Ces résidus mutés codent des acides

aminés retrouvés dans les motifs TPR de l'OGT. La première mutation décrite (955G>A) entraîne la substitution d'une alanine en thréonine en position 319, cependant les auteurs n'ont pas décrit les conséquences de cette mutation (Bouazzi et al. 2015). La seconde, 759G>T, conduit à la substitution d'une leucine en phénylalanine en position 254. Enfin, la dernière (851G>C) amène à la substitution d'une arginine en proline en position 284. Il a été montré que les lignées lymphoblastoïdes dérivées de patients porteurs de la mutation 759G>T (Vaidyanathan et al. 2017) et les fibroblastes de patients présentant la mutation 851G>C (Willems et al. 2017) ont des niveaux globaux de O-GlcNAcylation inchangés. Cette observation s'explique par des diminutions concomitantes des niveaux protéiques de l'OGT et de l'OGA. De manière contradictoire, une étude plus récente montre que la mutation 759G>T conduit à une diminution de l'activité de l'enzyme mais aussi un changement de conformation des répétitions tétratricopeptides (Gundogdu et al. 2018).

### 2. Le domaine C-terminal :

Lubas et Hanover ont montré que la délétion du domaine C-terminal de l'OGT conduisait à une perte de son activité enzymatique confirmant la présence de sa fonction de glycosyltransférase au niveau de cette région (Lubas and Hanover 2000). La région C-terminale est reliée aux répétitions TPR par une hélice de transition H3 (Lazarus et al. 2011). Elle est constituée de plusieurs domaines : (1) le domaine CDI (ou N-Cat) comportant le site actif, (2) le domaine Int-D qui représente une séquence d'environ cent vingt acides aminés et dont la fonction reste inconnue et (3) le domaine CDII (ou C-Cat) contenant une poche dans laquelle vient se fixer l'UDP du nucléotide sucre donneur (**Figure 22**) (Vocadlo 2012; Janetzko and Walker 2014). Par mutagenèse dirigée, Lazarus et ses collaborateurs ont construit différents mutants de l'OGT mitochondriale dans les domaines N-Cat et C-Cat. Ils ont ainsi pu mettre en évidence une diminution plus ou moins importante de la modification par O-GlcNAcylation de Nup62 prouvant le rôle crucial de certains acides aminés dans l'activité enzymatique (Lazarus et al. 2005). Une étude récente a permis de mettre en évidence le rôle important de plusieurs acides aminés : Lys634, Asn838, Gln839, Lys842, His901 et Asp925 dans la stabilisation de l'UDP sur l'enzyme (She et al. 2019). La région C-terminale de l'OGT peut également être impliquée dans l'interaction avec certaines protéines. Par exemple, le récepteur nucléaire TR $\alpha$  (Thyroid hormone receptor  $\alpha$ ) semble préférentiellement se fixer au domaine CDI de l'OGT. Bien que le rôle de cette interaction soit peu décrite, la surexpression de l'OGT provoquerait une faible inhibition de l'activité de ce récepteur suggérant une régulation des fonctions de TR $\alpha$  par O-GlcNAcylation (Li et al.

2012). La protéine kinase p38 est aussi capable de se fixer au domaine C-terminal de l'OGT et cette interaction permettrait de réguler le recrutement de la O-GlcNAc transférase au niveau de certaines de ses cibles (Cheung and Hart 2008).

De manière intéressante, un autre domaine de l'OGT retrouvé également dans sa région C-terminale a été mis en évidence en 2008 : le domaine de fixation au phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) appelé domaine PPO (**Figure 22**). En réponse à l'insuline, l'OGT est recrutée à la membrane plasmique par les PI(3,4,5)P<sub>3</sub> *via* ce domaine. Elle peut alors modifier par O-GlcNAcylation des protéines impliquées dans les voies de signalisation de l'insuline (Yang et al. 2008).

Des mutations de l'OGT ont également été reportées au niveau de sa région C-terminale chez des patients atteints de déficience intellectuelle liée au chromosome X. La première mutation décrite provoque la substitution d'une asparagine en lysine en position 567 (Pravata et al. 2019). La seconde mutation (1942A>T) conduit à la substitution d'une asparagine en tyrosine en position 648 (Pravata et al. 2020). Ces mutations provoquent des changements structuraux du domaine catalytique ainsi qu'une diminution de l'activité catalytique de l'enzyme.

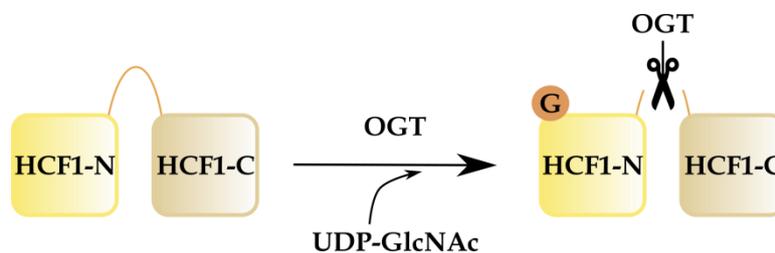
## 2) Activités enzymatiques de l'OGT :

### 1. Activité glycosyltransférase : mécanismes de reconnaissance du substrat :

Bien qu'aucune séquence consensus stricte n'ait été décrite à ce jour, des préférences de séquence guident l'OGT dans le choix de ses substrats. Plusieurs équipes ont montré que la présence de la séquence peptidique suivante était favorable à une modification par O-GlcNAcylation : P/V-P/V-V-gS/T-S/T (Chalkley et al. 2009; Wang et al. 2010; Alfaro et al. 2012). Le motif TTA a également été retrouvé dans une autre étude (Vosseller et al. 2006). L'OGT semble aussi modifier préférentiellement des acides aminés sérine ou thréonine se trouvant dans des régions désordonnées ou très flexibles d'un point de vue structural (Trinidad et al. 2012; Britto-Borges and Barton 2017). Enfin, la présence d'une proline en position +1 semble empêcher la modification par O-GlcNAcylation (Leney et al. 2017).

## 2. Activité protéolytique :

Outre son activité glycosyltransférase, l'OGT présente également une seconde fonction inattendue : la protéolyse de HCF-1 (Host Cell Factor-1). HCF-1 est un régulateur du cycle cellulaire dont le clivage est nécessaire pour assurer ses fonctions. Sa protéolyse a lieu au niveau de répétitions composées de vingt-six acides aminés appelées HCF-1PRO et produit deux sous-unités : HCF1-N et HCF1-C. Il a été montré que la fixation de l'OGT *via* ses motifs TPR au niveau des répétitions HCF-1PRO conduit à la modification par glycosylation de la sous-unité HCF1-N et au clivage de ce régulateur (**Figure 23**) (Capotosti et al. 2011; Lazarus et al. 2013). Néanmoins et à ce jour, HCF-1 est le seul substrat que l'OGT est capable de cliver.



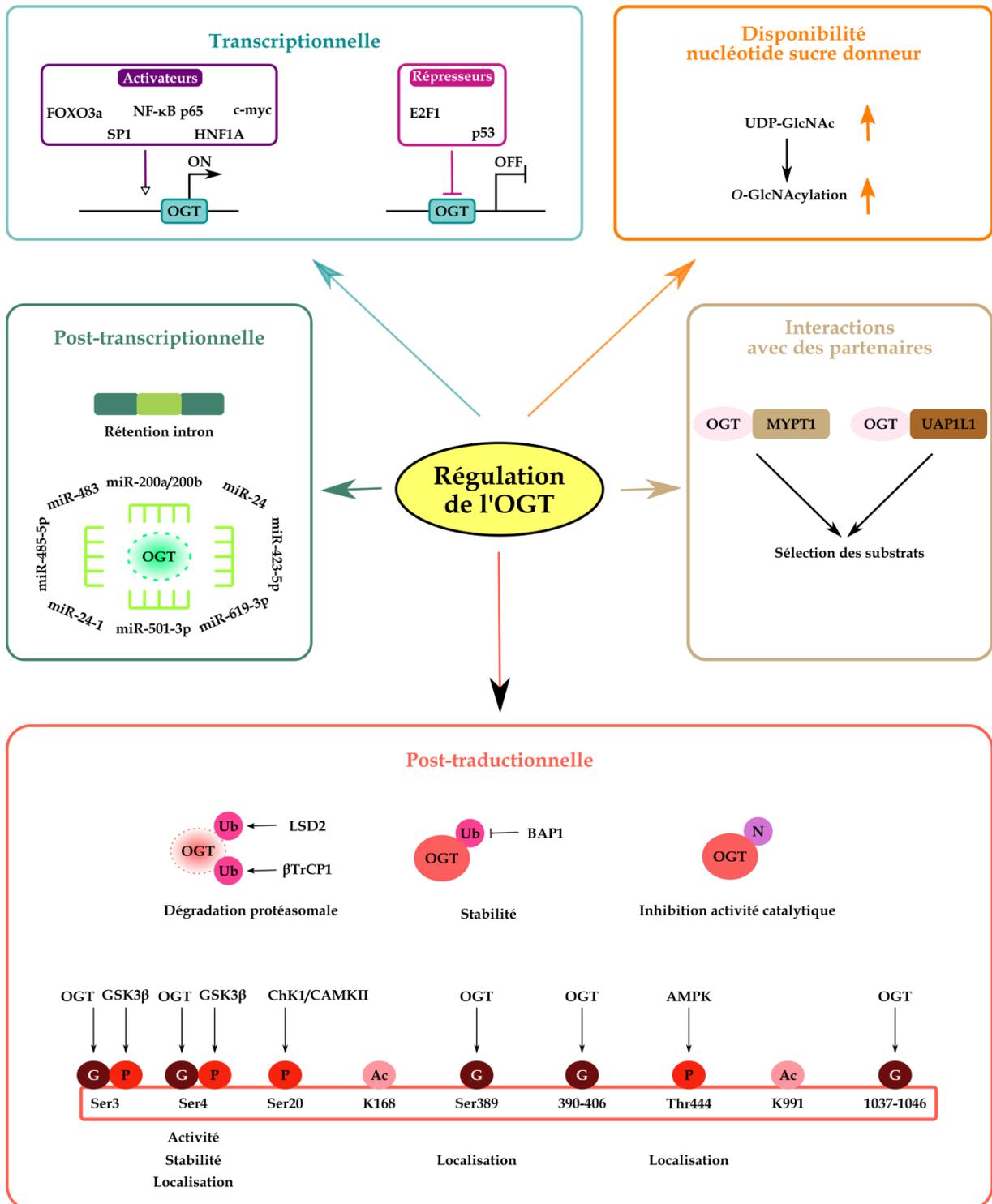
**Figure 23 :** L'OGT O-GlcNAcyle et clive sa protéine cible HCF-1.

*La protéolyse de HCF-1 est nécessaire pour assurer ses fonctions durant le cycle cellulaire. L'OGT se fixe au niveau des répétitions HCF-1PRO puis O-GlcNAcyle HCF1-N et clive cette protéine. Il en résulte alors deux sous-unités : HCF1-N et HCF1-C.*

## 3) Régulation de l'OGT :

L'expression de l'OGT n'est pas constitutive : elle diffère selon les tissus de l'organisme, fluctue au cours du cycle cellulaire ou en réponse à divers stress et peut également changer en conditions pathologiques. Différents mécanismes existent donc pour réguler l'expression de cette enzyme, ils incluent : (1) une régulation transcriptionnelle par différents activateurs et répresseurs, (2) une régulation post-transcriptionnelle par les miRNA et la rétention d'intron ou (3) une régulation post-traductionnelle par différentes modifications (**Figure 24**).

Par ailleurs, dans le cas où l'expression de l'OGT est inchangée, divers processus permettent également de moduler son activité et sa localisation cellulaire. La régulation de l'activité de l'OGT est assurée par : (1) la disponibilité en substrat donneur, (2) les interactions avec différents partenaires ou (3) des modifications post-traductionnelles. Enfin, la localisation cellulaire de l'enzyme peut être modulée par des modifications post-traductionnelles (**Figure 24**).



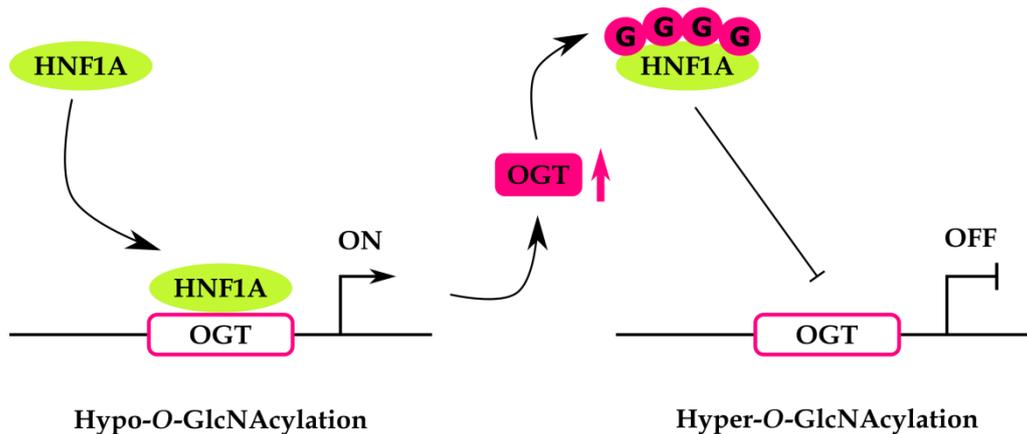
**Figure 24 : Régulation de l'OGT.**

L'expression de l'OGT est régulée de manière transcriptionnelle par différents activateurs et répresseurs. La rétention d'intron et les miRNA permettent le contrôle de l'expression de la O-GlcNAc transférase de manière post-transcriptionnelle. La disponibilité en nucléotide sucre donneur ainsi que l'interaction avec différents partenaires sont également deux facteurs pouvant réguler cette enzyme. Enfin, l'OGT est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles conduisant à moduler son activité, sa stabilité et sa localisation cellulaire. G : O-GlcNAcylation – P : Phosphorylation – Ac : Acétylation – N : S-nitrosylation – Ub : Ubiquitination.

### 1. Régulation transcriptionnelle :

Une étude *in silico* visant à identifier des sites de fixation à divers facteurs de transcription a permis de mettre en évidence des sites de liaison à E2F1 sur le promoteur de l'OGT (Muthusamy et al. 2015). Il a été montré dans les cellules HEK293T par des tests d'activité promotrice que la surexpression concomitante de la luciférase sous contrôle du promoteur de l'OGT et d'un plasmide codant E2F1 diminue l'activité luciférase. Cette baisse est empêchée par la mutation des sites de fixation à E2F1 sur le promoteur de l'OGT. Les auteurs ont par ailleurs montré que cette répression de l'OGT par E2F1 est dépendante de la protéine Rb1. De plus, l'activation du promoteur de l'OGT semble diminuer lors de la surexpression de p53 dans la lignée cancéreuse du col de l'utérus C33A (**Figure 24**) (Zeng et al. 2016).

Au contraire, l'activation du promoteur de l'OGT augmenterait suite à la surexpression des facteurs de transcription FOXO3a, SP1, NF- $\kappa$ B (p65) et c-myc dans les cellules C33A (**Figure 24**) (Zeng et al. 2016). Par ailleurs, une équipe a montré par des tests d'activité promotrice la régulation de la transcription de l'OGT par le facteur HNF1A (Hepatocyte Nuclear Factor 1 homologue A). La surexpression de HNF1A augmente l'activité promotrice (**Figure 24**). Par ailleurs, quatorze sites de O-GlcNAcylation dont six majoritaires ont été mis en évidence sur ce facteur de transcription. La surexpression des mutants S303A/S304A et T563A/T564A mène à une hausse de la quantité de transcrits OGT. Ces résultats illustrent un mécanisme original pouvant en partie expliquer le maintien de l'homéostasie de O-GlcNAcylation. En conditions d'hyper-O-GlcNAcylation, l'OGT modifie le facteur de transcription HNF1A sur les résidus S303/S304 et/ou T563/T564 dans son domaine de transactivation le rendant inactif et diminuant ainsi l'expression de la O-GlcNAc transférase. A l'inverse, en conditions d'hypo-O-GlcNAcylation, HNF1A se fixe sur le promoteur de l'OGT et active sa transcription (**Figure 25**) (Zhang et al. 2019).



**Figure 25:** HNF1A régule la transcription de l'OGT et semble participer au maintien de l'homéostasie de O-GlcNAcylation.

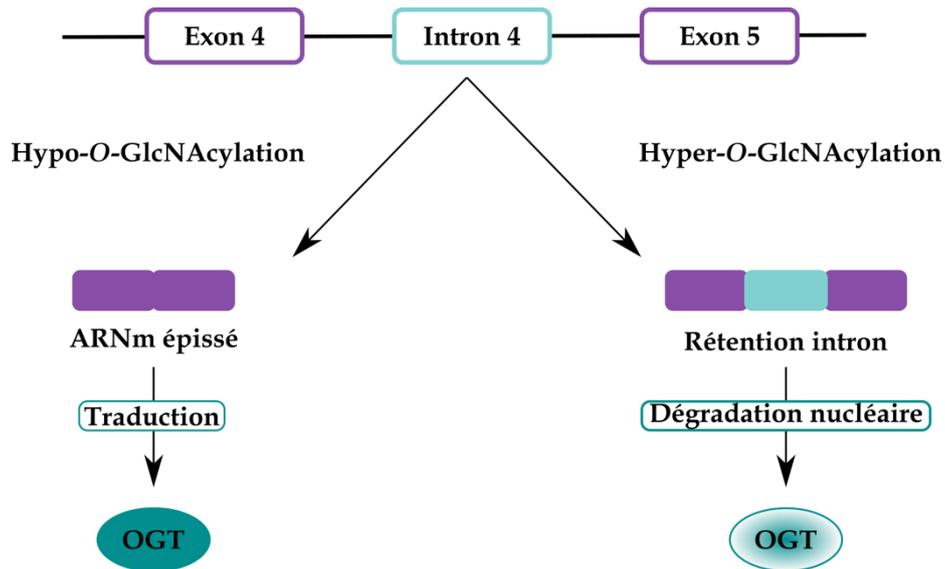
En conditions d'hypo-O-GlcNAcylation, HNF1A se fixe sur le promoteur de l'OGT et active sa transcription. En conditions d'hyper-O-GlcNAcylation, l'OGT O-GlcNAcyle HNF1A dans son domaine de transactivation. Ce facteur de transcription est ainsi inactif. Il en résulte la diminution de l'expression de l'OGT.

## 2. Régulation post-transcriptionnelle :

De plus en plus de travaux montrent une régulation de l'OGT par les miRNA (Figure 24). Luo et ses collaborateurs ont mis en évidence que l'OGT est une cible directe du miR-423-5p. Une baisse de l'expression de l'OGT a en effet été observée dans des cardiomyocytes transfectés avec ce miRNA (Luo et al. 2015). Une telle diminution de l'expression de l'OGT a également été observée suite à la surexpression de miR-24 dans des cellules cancéreuses mammaires (Liu et al. 2017b). miR-24-1 se lie aussi à la région 3'UTR de l'OGT. Le traitement d'une lignée cellulaire murine d'hépatocarcinome avec un inhibiteur de ce miRNA augmente l'expression de l'OGT et les niveaux globaux de O-GlcNAcylation (Liu et al. 2017c). Des tests de tumorigénicité chez des souris nude ont montré que l'injection de cellules cancéreuses coliques (SW480) transfectées avec un mimétique de miR-485-5p inhibe la croissance tumorale. *In vitro* et d'un point de vue mécanistique, les auteurs ont démontré que la surexpression de miR-485-5p dans les cellules SW480 diminue l'OGT et la O-GlcNAcylation de l'oncogène BMI-1 (Chai et al. 2018). La O-GlcNAc transférase est aussi une cible directe de miR-485-5p dans les cellules cancéreuses de l'œsophage (Han et al. 2019). Par ailleurs, Lo et ses collaborateurs ont mis en évidence que la stimulation de cellules endothéliales aortiques humaines (HAECs) avec de fortes concentrations de glucose provoque une augmentation de l'expression de l'OGT et des niveaux globaux de O-GlcNAcylation. Ces hausses sont inversement corrélées à une diminution des miR-200a/200b. Ces miRNA sont capables de se lier à l'ARNm de l'OGT. La surexpression de mimétiques de ces miRNA inhibe les

augmentations précédemment décrites induites par le glucose (Lo et al. 2018b). miR-501-3p, miR-619-3p (Herzog et al. 2020) et miR-483 (Yu et al. 2018) sont également capables de se fixer à la région 3'UTR de la O-GlcNAc transférase pour réguler son expression. Enfin, des travaux ont mis en évidence dans des cellules cancéreuses coliques une boucle de régulation impliquant l'inhibition post-transcriptionnelle de l'OGT et d'EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) par le miR-101 (Jiang et al. 2018).

L'expression de l'OGT peut également être régulée de manière post-transcriptionnelle par un processus de rétention de l'intron 4 suite à des modulations des niveaux de O-GlcNAcylation (**Figures 24 et 26**). Il a été montré que le traitement de cellules cancéreuses coliques avec un inhibiteur de l'OGT conduit à une augmentation des transcrits et de protéines OGT concomitante à une diminution des ARN retenants l'intron. A l'inverse, l'inhibition de l'OGA provoque une baisse de la quantité de transcrits et de protéines OGT simultanée à une hausse des ARN retenant l'intron. Ces derniers restent alors dans le noyau et ne peuvent être traduits. Les auteurs ont mis en évidence une séquence de 526 nucléotides appelée ISS (Intronic Splicing Silencer) nécessaire à la rétention du quatrième intron. Ces mécanismes peuvent également en partie expliquer le maintien de l'homéostasie de O-GlcNAcylation (Park et al. 2017).



**Figure 26 :** L'expression de l'OGT est régulée par un processus de rétention d'intron en réponse à des modulations des niveaux de O-GlcNAcylation.

En conditions d'hypo-O-GlcNAcylation, les ARN retenants l'intron diminuent alors que la quantité de transcrits et de protéines de l'OGT augmente. A l'inverse, en conditions d'hyper-O-GlcNAcylation, il y a une hausse de la quantité d'ARN retenants l'intron. Ces derniers restent alors dans le noyau et sont dégradés. Par conséquent, l'expression de l'OGT diminue.

### 3. Régulation post-traductionnelle :

L'OGT est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles régulant notamment sa localisation, la sélectivité de ses substrats et sa dégradation (Figure 24). Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'OGT est capable de s'auto-O-GlcNAcyler (Kreppel et al. 1997). La O-GlcNAcylation de l'OGT joue un rôle dans sa localisation nucléaire. En effet, Seo et ses collaborateurs ont montré par fractionnement cellulaire et immunomarquage que la mutation de la sérine 389 en alanine empêche la localisation nucléaire de l'OGT. La modification de ce site par O-GlcNAcylation semble permettre le démasquage de la séquence NLS indispensable à la fixation de l'importine  $\alpha 5$  qui est en charge du transfert vers le noyau (Seo et al. 2016). Les séquences peptidiques contenant les acides aminés 390 à 406 et 1037 à 1046 retrouvées respectivement dans les régions N- et C-terminales de l'OGT sont également modifiées par O-GlcNAcylation (Tai et al. 2004). Bien que les auteurs n'aient pas démontré le rôle de cette modification, nous pouvons imaginer que l'OGT puisse réguler sa propre activité. Les résidus Ser3 et Ser4 sont aussi sujets à la O-GlcNAcylation qui entre en compétition avec la phosphorylation médiée par la GSK3 $\beta$  sur ces mêmes sites (Kaasik et al. 2013). La phosphorylation de ces résidus permet la régulation de l'activité de l'OGT.

D'autres études ont également montré une régulation de l'OGT par phosphorylation. Par exemple, la localisation nucléaire de l'OGT est aussi régulée dans les myotubes par sa phosphorylation médiée par l'AMPK sur la thréonine 444 (Bullen et al. 2014). Par ailleurs, la surexpression d'un mutant constitutivement actif de la CAMKII (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) dans des foies de souris permet à la fois l'augmentation de pS20-OGT et des niveaux globaux de *O*-GlcNAcylation (Ruan et al. 2017). La kinase Chk1 (Checkpoint kinase 1) est aussi capable de phosphoryler l'OGT sur la sérine 20. Le traitement de cellules HeLa avec un inhibiteur de synthèse protéique a permis de montrer que la mutation S20A de l'OGT (substitution sérine en alanine sur le résidu 20) provoque une diminution de la demi-vie de l'enzyme. Par ailleurs, la co-transfection de l'OGT (WT ou mutée) et de l'ubiquitine augmente l'ubiquitination de l'OGT S20A en comparaison à l'OGT WT. Ces résultats suggèrent donc le rôle de pSer-20 dans la stabilisation de la *O*-GlcNAc transférase. Cette modification joue également un rôle dans la localisation de l'OGT au niveau du « mid-body » lors de la mitose (Li et al. 2017d).

L'OGT semble également régulée par ubiquitination. En effet, des travaux ont montré une diminution de l'expression protéique de l'OGT, non corrélée à un changement du niveau d'ARNm, dans des cellules endothéliales traitées avec le cobalt. L'hypoxie induite par cet agent augmente l'activité du protéasome 26S et l'abolition de l'expression de l'E3 ubiquitine ligase  $\beta$ TrCP1 par siRNA empêche la dégradation de l'OGT (**Figure 24**) (Liu et al. 2014). La stabilité de l'OGT est aussi régulée par l'histone H3K4Me1/Me2 déméthylase LSD2 qui étonnamment présente une activité d'E3 ubiquitine ligase (**Figure 24**). Il a en effet été mis en évidence que cette protéine ubiquitinye directement l'OGT conduisant ainsi à sa dégradation protéasomale (Yang et al. 2015). A l'inverse, il a été prouvé que l'enzyme de déubiquitination BAP1 protège la *O*-GlcNAc transférase de sa dégradation par le protéasome (**Figure 24**) (Dey et al. 2012).

L'OGT est également la cible d'une modification post-traductionnelle moins commune : la *S*-nitrosylation. Cette dernière consiste en l'ajout de monoxyde d'azote sur un groupement thiol d'un résidu cystéine de la protéine cible. Il a été montré que l'OGT est *S*-dénitrosylée dans des macrophages suite à une stimulation au LPS. Dans ces conditions, l'expression de la *O*-GlcNAc transférase ne varie pas mais une hausse de son activité, nécessaire à la régulation de l'immunité innée *via* NF- $\kappa$ B, a été démontrée (**Figure 24**) (Ryu and Do 2011). Enfin, l'OGT présenterait également deux sites d'acétylation (K168 et K991) (**Figure 24**) (data base phosphosite plus) dont les fonctions ne sont pas connues.

#### 4. Disponibilité du substrat donneur :

L'activité de l'OGT peut être régulée par la disponibilité de son nucléotide sucre donneur. En effet, en utilisant le peptide CKII et des concentrations croissantes d'UDP-GlcNAc (0,05 $\mu$ M à 4,8mM), Kreppel et Hart ont montré que l'OGT possède *in vitro* trois valeurs de Km (6, 35 et 217  $\mu$ M) pour le nucléotide sucre donneur (Kreppel and Hart 1999). Ils ont également mis en évidence que l'augmentation de la concentration en UDP-GlcNAc (20 $\mu$ M à 500 $\mu$ M) accroît de manière dose-dépendante l'incorporation de GlcNAc (**Figure 24**) dans différents peptides dont CKII (Kreppel and Hart 1999).

#### 5. Protéines modulatrices et interactions avec des partenaires :

Le recrutement de l'OGT à ses cibles *via* des protéines adaptatrices est également un mécanisme de régulation de cette enzyme (**Figure 24**). Par exemple, la O-GlcNAc transférase interagit avec MYPT1 (Myosin Phosphatase Targeting protein 1) et la modifie. L'abolition de MYPT1 n'altère ni l'expression ni l'activité de l'OGT mais diminue les niveaux globaux de O-GlcNAcylation suggérant que MYPT1 participe au ciblage de la O-GlcNAc transférase sur certains substrats (Cheung et al. 2008). UAP1L1 (UDP-N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylase-1-Like-1) semble également intervenir dans la régulation de l'OGT. Cette protéine présente 59% d'homologies avec UAP1 (UDP-N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylase-1), une enzyme de la voie HBP (**Figure 28**). Alors que l'abolition de son expression ne modifie pas la quantité d'UDP-hexosamines, une diminution des niveaux globaux de O-GlcNAcylation est observée. Les auteurs ont aussi mis en évidence que le shUAP1L1 diminue notamment la O-GlcNAcylation de la protéine c-myc. En outre, il a été montré qu'UAP1L1 interagit avec le domaine C-terminal de l'OGT. La protéine UAP1L1 fixerait donc l'OGT pour réguler son activité ou la sélection de ses substrats (Lai et al. 2019).

### III. La O-GlcNAcase :

La O-GlcNAcase a initialement été purifiée dans la rate de rat (Dong and Hart 1994). Cette enzyme est responsable de l'hydrolyse des résidus de GlcNAc préalablement attachés par une liaison de type  $\beta$ -glycosidique par l'OGT aux protéines cibles. L'OGA appartient à la famille des glycosides hydrolases 84 (GH84) selon la classification CAZy. Cette enzyme diffère des autres hexosaminidases notamment de par son activité qui est optimale à un pH proche de la neutralité (Dong and Hart 1994; Gao et al. 2001; Wells et al. 2002). La O-GlcNAcase est exprimée de manière ubiquitaire mais est retrouvée de façon plus abondante

dans certains tissus tels que le cerveau, le placenta et le pancréas (Dong and Hart 1994; Comtesse et al. 2001; Gao et al. 2001).

### 1) Structure de l'OGA :

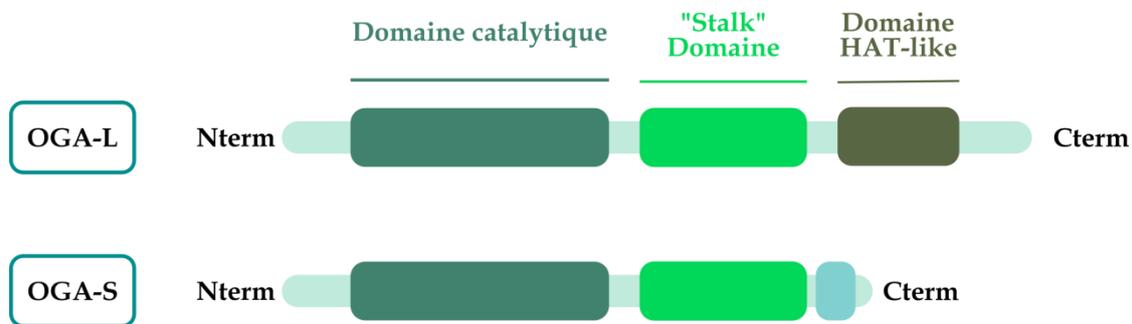
L'OGA est codée par le gène *Mge5a* (meningioma expressed antigen 5) situé sur le bras long du chromosome 10 au locus 10q24.1-q24.3 (Heckel et al. 1998). Deux isoformes sont produites par épissage alternatif : (1) une forme longue (OGA-L) de 130 kDa (916 acides aminés) retrouvée dans le noyau et le cytoplasme (Comtesse et al. 2001; Gao et al. 2001; Wells et al. 2002) et (2) une forme courte (OGA-S) de 75kDa (677 acides aminés) localisée dans le noyau et les gouttelettes lipidiques (**Figure 27**) (Comtesse et al. 2001; Keembiyehetty et al. 2011).

Les deux isoformes partagent le même domaine N-acétyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase N-terminal (**Figure 27**). Deux acides aminés retrouvés dans cette région sont nécessaires pour l'activité catalytique de l'enzyme : les résidus d'acides aspartiques en position 174 et 175. En effet, la substitution de ces acides aminés en alanine diminue l'activité catalytique de l'OGA (Cetinbaş et al. 2006). Ces deux acides aspartiques constituent le motif catalytique DD.

Les extrémités N- et C-terminales des deux isoformes sont séparées par une région intermédiaire comportant un « stalk » domaine (**Figure 27**). Cette région intermédiaire de l'OGA contient une séquence, constituée des acides aminés 404 à 548, nécessaire à l'interaction avec l'OGT (Whisenhunt et al. 2006). Elle possède également un site de clivage pour la caspase 3 (Wells et al. 2002; Butkinaree et al. 2008). Dans ce sens, il a été montré que l'induction de l'apoptose par la protéine de mort Fas provoque le clivage de l'OGA. Ce dernier est empêché lors d'un traitement avec un inhibiteur de caspase 3. Dans le but de déterminer le site de clivage, les auteurs ont aussi construit un mutant de l'OGA. La mutation D413A abolit le clivage de la O-GlcNAcase suite à l'induction de l'apoptose. La caspase 3 clive donc l'OGA sur le résidu d'acide aspartique en position 413. Enfin, il a été mis en évidence que le clivage de l'OGA n'altère pas son activité enzymatique. Ceci peut s'expliquer par le maintien de l'association des deux fragments obtenus à la suite du clivage ou par leur réassociation (Butkinaree et al. 2008).

Enfin, la région C-terminale diffère entre les deux isoformes (**Figure 27**). Le domaine C-terminal de l'OGA-L partage des similarités avec des domaines histones acétyltransférases.

En effet, Toleman et ses collaborateurs ont décrit que l'OGA-L possédait une activité d'histone acétyltransférase *in vitro* (Toleman et al. 2004) et ont rebaptisé l'enzyme NCOAT pour « Nuclear and Cytoplasmic O-GlcNAcase and AcetylTransferase » (Toleman et al. 2006b). L'enzyme OGA/NCOAT s'associerait avec l'OGT, le co-répresseur mSin3a et HDAC1 pour former un complexe appelé « O-GlcNAczyme » retrouvé sur le promoteur de gènes réprimés (Whisenhunt et al. 2006). Cependant, d'autres travaux ne sont pas parvenus à mettre en évidence la potentielle propriété d'histone acétyltransférase de l'OGA (Butkinaree et al. 2008). De plus, la O-GlcNAcase ne semble pas pouvoir se fixer au métabolite donneur d'acétyl : l'acétyl-CoA (Rao et al. 2013). C'est pourquoi, ce domaine de l'OGA est désormais nommé « HAT-like ». Celui-ci n'est pas retrouvé chez l'OGA-S qui possède à la place une région d'une quinzaine d'acides aminés dont les fonctions n'ont pas été décrites.



**Figure 27 : Structure des deux isoformes de l'OGA.**

Deux isoformes sont produites par épissage alternatif à partir du gène de l'OGA : une forme longue (OGA-L) et une forme courte (OGA-S). Les deux isoformes partagent le même domaine catalytique N-terminal. Ce dernier est séparé de la région C-terminale par un « stalk » domaine. La région C-terminale diffère entre les deux isoformes. Alors que l'OGA-L présente un domaine HAT-like, l'OGA-S comporte une séquence de quinze acides aminés.

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

L'OGA hydrolyse les résidus de GlcNAc *via* un mécanisme se déroulant en deux étapes comprenant la formation d'un intermédiaire bicyclique oxazolinium. L'hydrolyse de celui-ci permet finalement la libération de l'OGA et du résidu de GlcNAc (Cetinbaş et al. 2006; Toleman et al. 2006a). Les mécanismes de reconnaissance du substrat par l'OGA sont encore peu compris. Une étude a d'abord montré que l'hydrolyse de résidus de GlcNAc s'exécuterait avec une efficacité presque comparable quel que soit le substrat. Ces résultats suggèrent donc que le résidu de GlcNAc est reconnu indépendamment de la protéine par la O-GlcNAcase (Shen et al. 2012). Cependant, une étude récente a mis en évidence que la

phosphorylation de la tyrosine 364 d'un peptide dérivé de la protéine ZO3 diminue l'hydrolyse du résidu de GlcNAc situé sur la sérine 369 de ce peptide (Sharif et al. 2019). Ces résultats laissent donc sous-entendre que la O-GlcNAcase aurait quand même des préférences de séquences peptidiques. D'autre part, des analyses cristallographiques récentes ont rapporté que l'OGA est présente sous forme d'homodimère (Li et al. 2017b, 2017a; Roth et al. 2017; Males and Davies 2019). Une poche à l'interface du domaine catalytique du premier monomère et du « stalk » domaine du second serait alors formée pour la fixation du substrat. Les acides aminés de cette poche joueraient aussi un rôle dans la reconnaissance de la protéine cible. Par exemple, la substitution des acides aminés phénylalanine ou tryptophane trouvés respectivement en position 223 et 679 à la surface de la poche conduirait à une diminution de l'affinité de liaison de l'OGA pour le glycopeptide donné (Li et al. 2017b).

### 3) Régulation de l'OGA :

La régulation de l'OGA n'est pas aussi bien comprise que celle de l'OGT. D'un point de vue transcriptionnel, il a été mis en évidence par des tests d'activité promotrice que la surexpression simultanée de la luciférase sous contrôle du promoteur de l'OGA et d'un plasmide codant E2F1 provoque une diminution de l'activité luciférase dans les cellules HEK293. Cette baisse est empêchée par la mutation des sites de fixation à E2F1 sur le promoteur de l'OGA. De plus, la surexpression du facteur de transcription E2F1 diminue l'expression de la O-GlcNAcase. Enfin, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont permis de montrer la fixation d'E2F1 sur le promoteur de l'OGA. Ces résultats confirment donc le rôle de ce facteur de transcription dans la répression de l'enzyme (Muthusamy et al. 2015). La O-GlcNAcase semble également régulée de manière post-transcriptionnelle par le miR-539 (Muthusamy et al. 2014). En effet, la surexpression de miR-539 dans les cellules HEK293 entraîne une diminution de l'expression de l'OGA. De plus, la surexpression simultanée de miR-539 et d'un vecteur codant la luciférase couplée à la région 3'UTR de l'OGA conduit à une diminution de l'activité luciférase dans ces cellules. En revanche, la mutation des sites de fixation du miRNA dans la région 3'UTR de la O-GlcNAcase ne provoque aucun changement de l'activité luciférase. Par ailleurs, l'OGA est porteuse de différentes modifications post-traductionnelles. Les résidus de sérines en position 364 et 405 de la O-GlcNAcase sont respectivement des sites de phosphorylation

(Beausoleil et al. 2004) et de O-GlcNAcylation (Khidekel et al. 2007). Cependant, le rôle de ces modifications post-traductionnelles n'a pas été décrit.

### IV. La O-GlcNAcylation : un senseur nutritionnel :

Comme nous venons de le mentionner dans les parties précédentes, l'OGT catalyse l'ajout des résidus de GlcNAc à partir d'un nucléotide sucre donneur : l'UDP-GlcNAc alors que l'OGA les hydrolyse. L'UDP-GlcNAc est synthétisé *via* la voie de biosynthèse des hexosamines (ou voie HBP pour Hexosamine Biosynthesis Pathway) qui intègre différents métabolites : glucose, acides aminés, acides gras et nucléotides. Les niveaux globaux de O-GlcNAcylation dépendent étroitement de la concentration en ce nucléotide sucre donneur qui lui-même dépend du statut nutritionnel de l'organisme. C'est pourquoi, la O-GlcNAcylation est considérée comme un senseur nutritionnel.

#### 1) La voie de biosynthèse des hexosamines, source de l'UDP-GlcNAc :

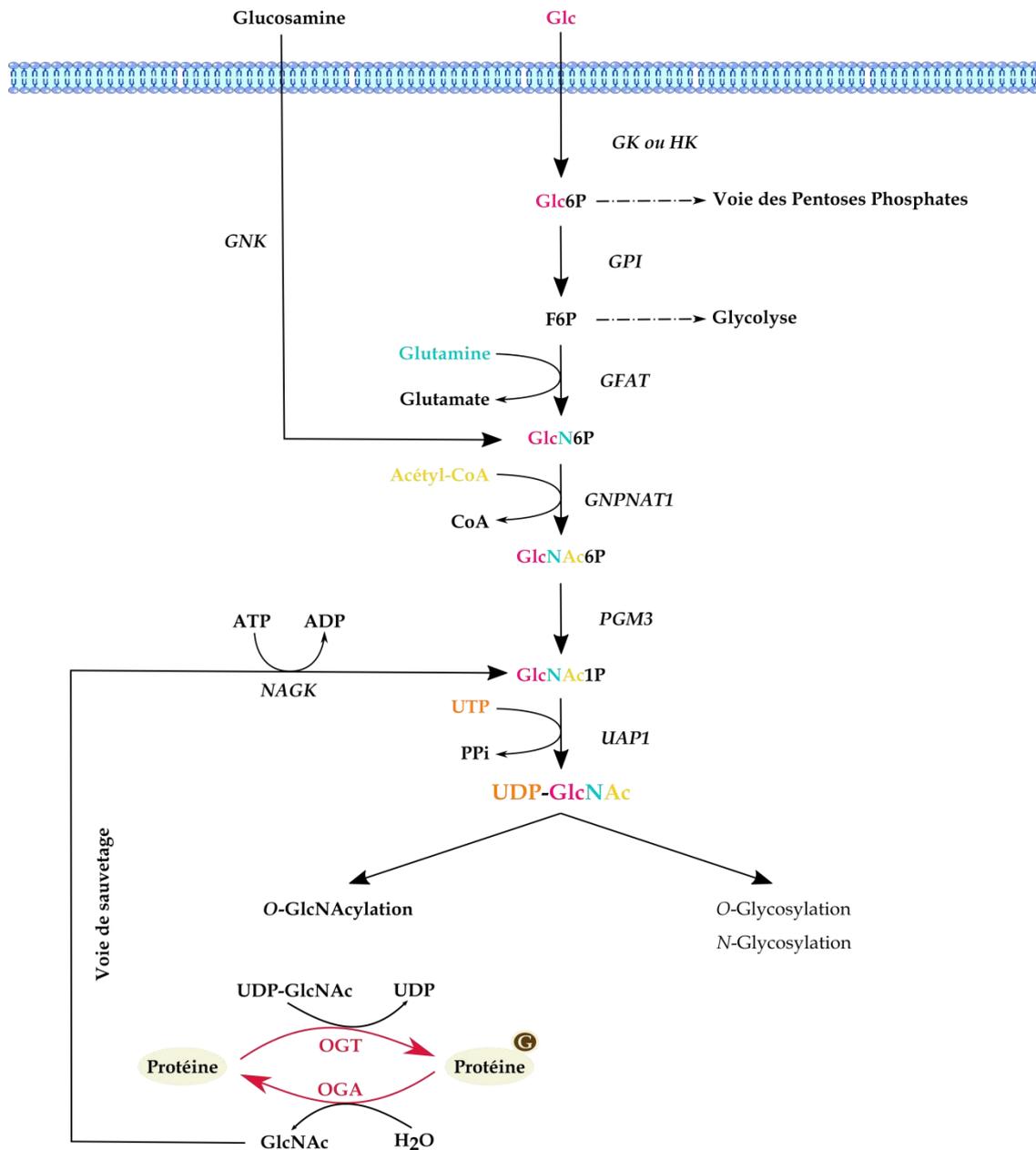
Une fois entré dans la cellule par les transporteurs membranaires GLUT, le glucose (Glc) est phosphorylé par la glucokinase (GK) dans les cellules hépatiques ou l'hexokinase (HK) dans les autres types cellulaires. Le glucose-6-phosphate (Glc6P) ainsi formé peut être dirigé vers la voie des pentoses phosphates ou métabolisé en fructose-6-P (F6P) par la glucose-6-phosphate isomérase (GPI). Le fructose-6-P a alors la possibilité d'entrer dans la voie de la glycolyse (**Figure 28**).

Cependant, 2 à 5% du glucose entrant dans la cellule intègre la voie de biosynthèse des hexosamines *via* l'action de la glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT). Cette protéine, enzyme limitante de la voie HBP, est présente sous deux isoformes chez les mammifères (GFAT1 et GFAT2). Elle convertit le F6P et la glutamine en glucosamine-6-phosphate (GlcN6P) et glutamate. Il est à noter que la glucosamine entrant dans la cellule est également capable d'être transformée en GlcN6P par la GlcNAc Kinase (GNK). Il s'ensuit la conversion de l'Acétyl-CoA et de la GlcN6P en N-Acetylglucosamine-6-P (GlcNAc6P) par la glucosamine-phosphate N-Acetyltransférase 1 (GNPNAT1). Dans l'étape suivante, la phosphoglucomutase-3 (PGM3) catalyse l'isomérisation de la GlcNAc6P en N-Acetylglucosamine-1-P (GlcNAc1P). Enfin, l'UTP et la GlcNAc1P permettent la formation de pyrophosphates et d'UDP-GlcNAc *via* l'enzyme UAP1 (UDP-N-Acetylglucosamine

Pyrophosphorylase 1) (**Figure 28**). Le nucléotide sucre donneur ainsi formé peut être utilisé à la fois pour la *O*-GlcNAcylation mais aussi pour les processus de *N*- et *O*-Glycosylations complexes.

Il est également intéressant de souligner que les résidus de GlcNAc libres peuvent être recyclés par une voie de sauvetage. En effet, la GlcNAc peut être phosphorylée par l'enzyme NAGK (N-Acetyl-D-Glucosamine Kinase) permettant ainsi la formation directe de GlcNAc1P (**Figure 28**) (Aquino-Gil et al. 2017; Yang and Qian 2017; Akella et al. 2019).

Comme nous venons de le voir, la voie de biosynthèse des hexosamines intègre différents métabolites afin de produire l'UDP-GlcNAc. Cette voie est donc sensible à l'activité de ses différentes enzymes mais également à l'accès aux divers métabolites requis et donc au flux nutritionnel. Néanmoins, nous allons voir à présent que cette relation entre les flux nutritionnels et la *O*-GlcNAcylation n'est pas si évidente.



**Figure 28 : La voie de biosynthèse des hexosamines (voie HBP).**

Le glucose (Glc) est phosphorylé par la glucokinase (GK) ou l'hexokinase (HK). Le glucose-6-phosphate (Glc6P) ainsi formé est converti en fructose-6-P (F6P) par la glucose-6-phosphate isomérase (GPI). Dans l'étape suivante, la glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase (GFAT) métabolise le F6P et la glutamine en glucosamine-6-phosphate (GlcN6P) et glutamate. La glucosamine entrant dans la cellule est également capable d'être transformée en GlcN6P par la GlcNAc Kinase (GNK). L'Acétyl-CoA et la GlcN6P sont ensuite convertis en N-Acetylglucosamine-6-P (GlcNAc6P) par la glucosamine-phosphate N-Acetyltransférase 1 (GNPNAT1). Il s'ensuit l'isomérisation de la GlcNAc6P en N-Acetylglucosamine-1-P (GlcNAc1P) par la phosphoglucomutase-3 (PGM3). Finalement, l'UTP et la GlcNAc1P permettent la formation de pyrophosphates et d'UDP-GlcNAc via l'enzyme UAP1 (UDP-N-Acetylglucosamine Pyrophosphorylase). L'UDP-GlcNAc ainsi formé peut être utilisé comme nucléotide sucre donneur pour la O-GlcNAcylation mais aussi pour les processus de N- et O-Glycosylations complexes. Une voie de sauvetage permet de recycler les résidus de GlcNAc libres. Ils sont phosphorylés par l'enzyme NAGK (N-Acetyl-D-Glucosamine Kinase) permettant par conséquent la formation de GlcNAc1P.

### 2) Régulation nutritionnelle des mécanismes de O-GlcNAcylation :

#### 1. La disponibilité en glucose module les niveaux de O-GlcNAcylation :

Comme nous aurions pu l'imaginer, plusieurs études ont rapporté une diminution des niveaux de O-GlcNAcylation en réponse à une privation en glucose et *vice versa*. Par exemple, la déplétion en glucose provoque la baisse des niveaux de O-GlcNAcylation dans les cellules cancéreuses coliques HT29 et HCT116 (Steenackers et al. 2016). A l'inverse, les cellules cancéreuses coliques de souris MC38 cultivées en milieu « high » glucose (25mM) présentent une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation corrélée à une hausse du pool d'UDP-GlcNAc en comparaison aux cellules contrôles (milieu contenant 5mM de glc) (Vasconcelos-Dos-Santos et al. 2017). De tels résultats ont aussi été retrouvés *in vivo* chez des rats Sprague-Dawley soumis par voie intraveineuse à l'injection de glucose (Liu et al. 2000). Des expériences d'immunohistochimie ont révélé que les cellules  $\beta$  pancréatiques de ces rats présentent une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation. Cette hausse est réversible puisque l'injection d'insuline permet le retour des niveaux de O-GlcNAcylation à un niveau comparable à celui des rats contrôles. De la même manière, il existe une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation dans le colon de souris gavées au glucose comparativement à des souris maintenues à jeun (Olivier-Van Stichelen et al. 2012b). Enfin, une étude a démontré une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation dans le colon de souris soumises à un régime riche en sucres par rapport à un régime normal (Olivier-Van Stichelen et al. 2014b).

Cependant, d'autres études montrent que la relation entre la disponibilité de nutriments dont le glucose et la O-GlcNAcylation n'est pas une simple corrélation positive. De manière surprenante, plusieurs études ont rapporté que la réduction de glucose peut induire une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation (Cheung and Hart 2008; Taylor et al. 2008, 2009; Kang et al. 2009; Zou et al. 2012). Cette hausse est liée à une augmentation de l'expression de l'OGT et/ou à une diminution de l'expression de l'OGA dans les cellules cancéreuses du foie HepG2 (Taylor et al. 2008), les cellules de neuroblastome Neuro-2a (Cheung and Hart 2008) et dans les myocytes ventriculaires néonataux de rats (Zou et al. 2012). Dans les cellules cancéreuses de poumon A549, une hausse de l'activité de l'OGT et de la GFAT ainsi qu'une baisse de l'activité de l'OGA seraient à l'origine de l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation induite par la déplétion en glucose (Kang et al. 2009).

Il a étonnamment été montré que l'apport d'un autre nutriment essentiel à la voie HBP, la glucosamine, permet de contrer les effets induits par la déplétion en glucose. En effet, le traitement de cellules HepG2, privées de glucose, avec 1mM de glucosamine permet d'empêcher la hausse des niveaux de O-GlcNAcylation et de transcrits OGT (Taylor et al. 2009). Des résultats similaires ont aussi été obtenus dans les myocytes ventriculaires néonataux de rats traités avec différentes concentrations de glucosamine (Zou et al. 2012).

### 2. La disponibilité en glucosamine, glutamine et en acides gras module les niveaux de O-GlcNAcylation :

La culture de cellules HepG2 et MCF7 en milieu enrichi en glucosamine permet d'induire une hausse des niveaux de O-GlcNAcylation (Guinez et al. 2006; Olivier-Van Stichelen et al. 2012b). Une telle augmentation a également été retrouvée *in vivo* dans le colon et le foie de souris gavées avec de la glucosamine en comparaison à des souris à jeun (Guinez et al. 2011; Olivier-Van Stichelen et al. 2012b).

Steenackers et ses collaborateurs ont quant à eux rapporté que la déplétion en glutamine provoque une diminution des niveaux de O-GlcNAcylation dans les cellules HT29 et HCT116 (Steenackers et al. 2016).

La sensibilité de la voie HBP aux acides gras est peu décrite. Toutefois, le traitement des cellules cancéreuses gastriques MKN-45 et SGC-7901 avec de l'acide palmitique augmente les niveaux de O-GlcNAcylation. Cette hausse est corrélée à une élévation de l'expression de l'OGT et de la GFAT (Jiang et al. 2019). *In vivo*, il a été montré une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation dans la rétine de souris soumises à un régime HFD (High Fat Diet). Le palmitate représente l'acide gras saturé le plus courant de ce régime. Une hausse des transcrits GFAT2 pourrait expliquer l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation dans ce modèle d'étude (Dai et al. 2018).

En réponse à un stress nutritionnel, la cellule semble donc capable de moduler ses niveaux de O-GlcNAcylation. Néanmoins, des mécanismes peuvent se mettre en place pour compenser ses fluctuations et permettre le maintien de l'homéostasie de O-GlcNAcylation. Cette conservation est essentielle pour assurer au mieux les fonctions cellulaires. Une partie de mes travaux de thèse s'est intéressée à la régulation de l'expression de l'OGT et de l'OGA en réponse à des modulations des niveaux de O-GlcNAcylation (Decourcelle et al. 2020). La publication émanant de ces travaux sera abordée ultérieurement dans ce manuscrit.

### V. Les outils d'étude de la O-GlcNAcylation :

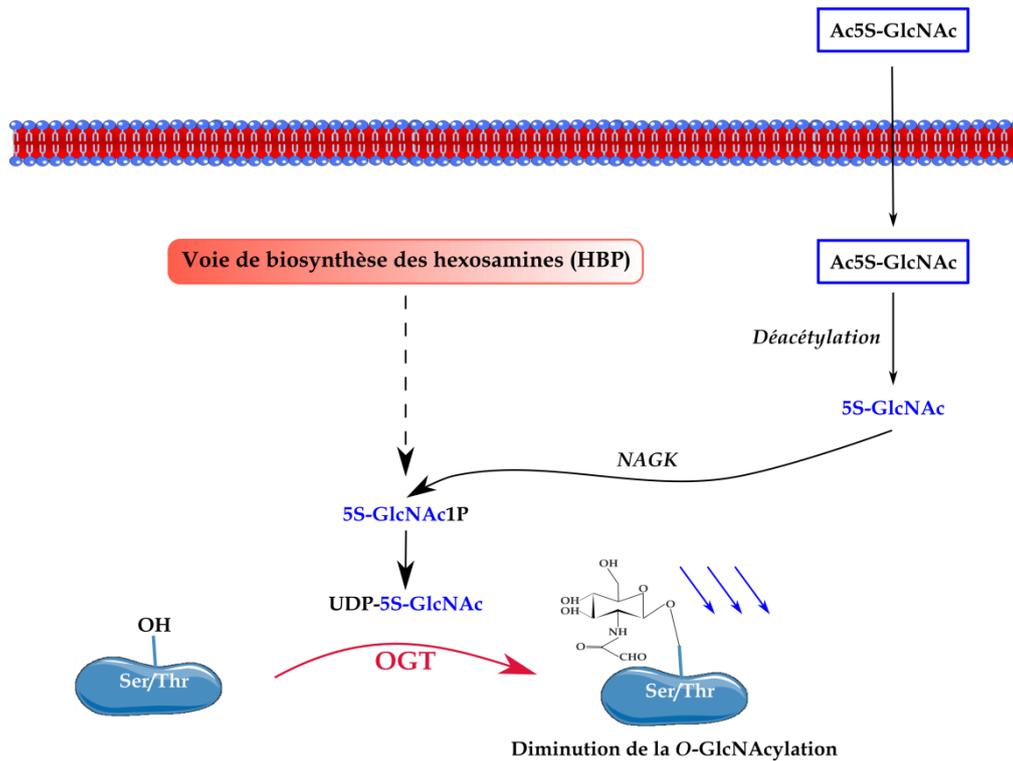
Différents outils ont été développés afin de comprendre les mécanismes régulés par O-GlcNAcylation. Ils permettent de moduler les niveaux de O-GlcNAcylation, de marquer et d'identifier les protéines O-GlcNAcylées ainsi que les résidus de sérine et de thréonine concernés. La liste de ces outils ne sera pas traitée de manière exhaustive. Quelques-uns d'entre eux seront présentés, notamment ceux utilisés durant ma thèse.

#### 1) Les inhibiteurs pharmacologiques :

##### 1. Les inhibiteurs de l'OGT :

L'alloxane (2,4,5,6-tétraoxypyrimidine) a été le premier inhibiteur de l'OGT décrit (Konrad et al. 2002). Cependant, il génère des espèces réactives de l'oxygène (Zhang et al. 1992) et il serait aussi capable d'inhiber l'OGA (Lee et al. 2006). Sa toxicité et son manque de spécificité limitent donc aujourd'hui l'utilisation de cet inhibiteur.

D'autres inhibiteurs ont été développés en modifiant l'UDP-GlcNAc qui, rappelons-le, peut être issu de la voie de biosynthèse des hexosamines ou de la voie de sauvetage de la GlcNAc. Parmi les inhibiteurs dérivés de l'UDP-GlcNAc, nous pouvons citer l'Ac5S-GlcNAc. Une fois entré dans la cellule, cet inhibiteur est déacétylé par des estérases cellulaires puis phosphorylé par l'enzyme NAGK impliquée dans la voie de sauvetage de la GlcNAc. Son intégration dans la voie de biosynthèse des hexosamines permet ensuite la génération d'UDP-5S-GlcNAc (**Figure 29**) (Gloster et al. 2011). Ce donneur de substrat très peu efficace entre alors en compétition avec l'UDP-GlcNAc. Il en résulte par conséquent une diminution des niveaux globaux de O-GlcNAcylation. Bien que ce puissant inhibiteur de l'OGT soit largement employé *in vitro*, sa faible solubilité en milieu aqueux rend son utilisation *in vivo* impossible. Pour palier à ce problème, différents analogues, solubles dans l'eau, du 5S-GlcNAc ont été développés dont le 5SGlcNHex (Liu et al. 2018a). L'injection intra-péritonéale de cet inhibiteur chez la souris diminue les niveaux de O-GlcNAcylation dans divers tissus.



**Figure 29 : L'Ac5S-GlcNAc inhibe l'OGT.**

Une fois entré dans la cellule, l'Ac5S-GlcNAc est déacétylé par des estérases cellulaires. Il est ensuite phosphorylé par la NAGK. Le 5S-GlcNAc1P ainsi formé intègre la voie de biosynthèse des hexosamines. Il en résulte la formation d'UDP-5S-GlcNAc qui entre en compétition avec l'UDP-GlcNAc. Finalement, les niveaux globaux de O-GlcNAcylation diminuent.

Les inhibiteurs globin1 (OGT bisubstrate-linked inhibitor 1) et globin2 ont été élaborés en associant un peptide accepteur avec l'UDP *via* un « linker » (Borodkin et al. 2014). Bien que ces molécules diminuent la O-GlcNAcylation *in vitro*, le manque de perméabilité cellulaire de cette classe de composés est un problème majeur (Trapanone et al. 2016b). Enfin, le criblage à haut débit de banques de molécules a permis de mettre en évidence le ST045849 (Trapanone et al. 2016b) et l'OSMI-1 (Ortiz-Meoz et al. 2015) comme inhibiteurs de l'OGT. L'OSMI-1 n'est pas un analogue de substrat et bien que cette petite molécule réduise les niveaux de O-GlcNAcylation, une meilleure compréhension de son mode d'action permettrait de l'améliorer pour augmenter son efficacité (Ortiz-Meoz et al. 2015).

## 2. Les inhibiteurs de l'OGA :

Initialement utilisée comme agent diabétogène, la streptozotocine a été le premier inhibiteur de l'OGA décrit. Le traitement de rats avec cet analogue de la N-Acetylglucosamine augmente les niveaux de O-GlcNAcylation dans les cellules  $\beta$  du pancréas (Roos et al. 1998). Le PUGNAc (O-(2-acétamido-2-deoxy-D-

glucopyranosylidène)amino-N-phénylcarbamate), également analogue de la N-AcetylGlucosamine, est un autre inhibiteur de l'OGA capable d'induire une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation (Haltiwanger et al. 1998). Cependant, la toxicité de la streptozotocine (Gao et al. 2000; Pathak et al. 2008) et le manque de spécificité du PUGNAc qui inhiberait également la  $\beta$ -hexosaminidase lysosomale (Mehdy et al. 2012) font que ces inhibiteurs sont peu utilisés aujourd'hui.

La GlcNAcstatine représente un autre inhibiteur compétitif de l'OGA provoquant une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation *in vitro*. Bien que cet inhibiteur semble également inhiber les hexosaminidases A et B, sa sélectivité vis-à-vis de l'OGA serait supérieure (Dorfmueller et al. 2006).

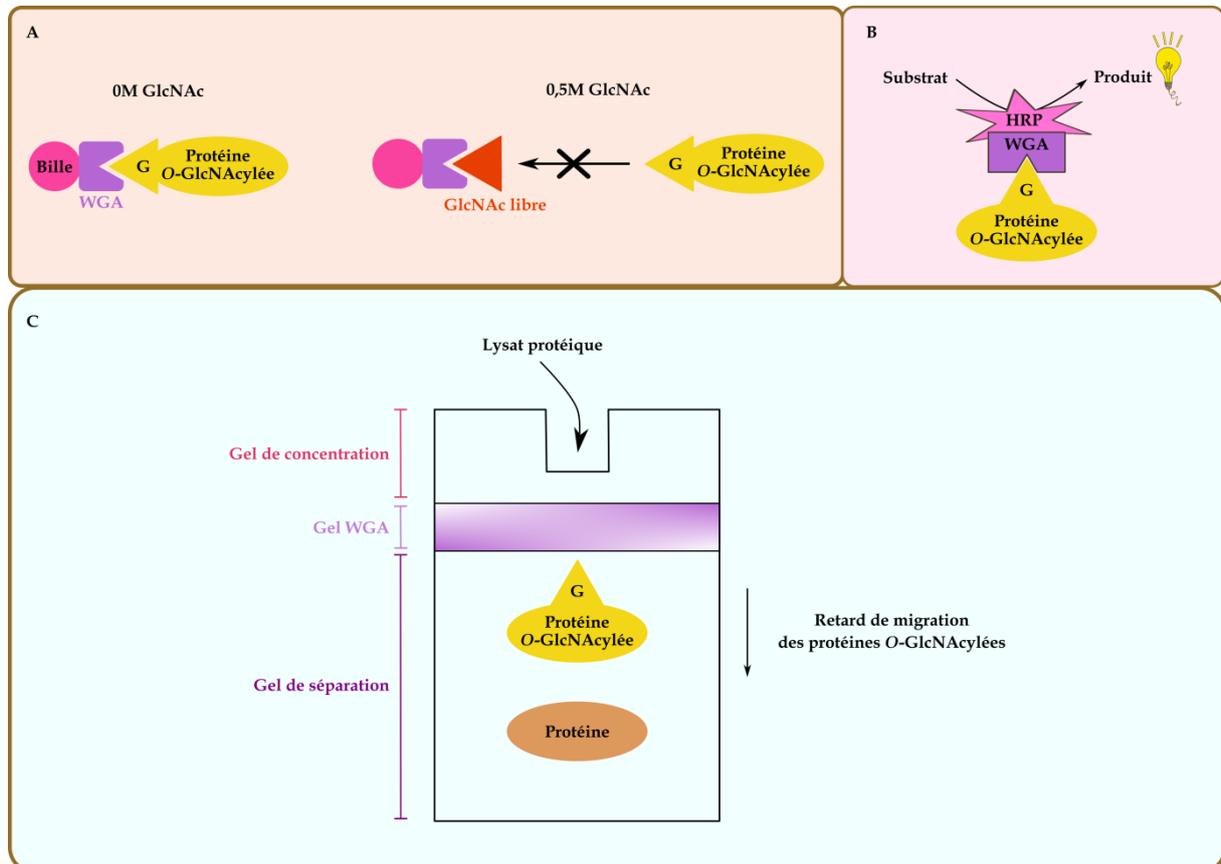
Enfin, le Thiamet-G (thiazoline amino ethyl gluco-configured) est un puissant inhibiteur de l'OGA bloquant le site actif de l'enzyme. Ce dérivé de thiazoline peut être utilisé *in vitro* pour induire une hausse des niveaux de O-GlcNAcylation (Yuzwa et al. 2008). De plus, il a la capacité de passer la barrière hématoencéphalique et est soluble en milieu aqueux rendant possible son utilisation *in vivo*. Il peut ainsi être administré aux animaux directement dans leur eau de boisson (Yuzwa et al. 2008) ou être injecté de manière intrapéritonéale (Olivier-Van Stichelen et al. 2014b). Avec ses différents atouts, le Thiamet-G est aujourd'hui l'inhibiteur de l'OGA le plus fréquemment utilisé en laboratoire.

## 2) Les méthodes de détection et d'enrichissement des protéines O-GlcNAcylées :

### 1. Les lectines :

La WGA (Wheat Germ Agglutinin) est une lectine isolée de *triticum vulgare* utilisée pour l'étude de la O-GlcNAcylation. Cependant, en se fixant aussi aux acides sialiques, cette lectine manque de spécificité. L'utilisation de la forme succinylée de cette dernière, la sWGA, permet de pallier à ce problème (Monsigny et al. 1979, 1980). Les applications avec la WGA et la sWGA sont diverses. Cette lectine peut être utilisée en chromatographie d'affinité. L'élution se fait alors par compétition avec la GlcNAc libre (Zachara et al. 2011). L'enrichissement de protéines O-GlcNAcylées peut également se faire directement avec la lectine couplée à des billes d'agarose (**Figure 30A**). Un western blot permettra ensuite de déterminer si la protéine d'intérêt est modifiée par O-GlcNAcylation. D'autre part, le

couplage de la lectine à la peroxydase permet de l'employer tel un anticorps (**Figure 30B**). Enfin, la détection des protéines O-GlcNAcylées peut également être réalisée en effectuant une électrophorèse WGA-SDS-PAGE. La présence d'un gel renfermant de la WGA entre les gels de concentration et de séparation permet de retarder la migration des protéines modifiées par O-GlcNAcylation (**Figure 30C**) (Kubota et al. 2017).



**Figure 30 :** Utilisations de la lectine (s)WGA pour l'enrichissement et la détection des protéines O-GlcNAcylées.

(A) L'enrichissement des protéines O-GlcNAcylées peut se faire en mettant en présence les extraits protéiques avec la lectine couplée aux billes d'agarose. Un contrôle négatif est effectué en plaçant les extraits protéiques en présence de lectine couplée aux billes d'agarose préalablement incubées avec 0,5M de GlcNAc libre. Cette dernière permet ainsi de saturer les billes et empêche les protéines O-GlcNAcylées de s'y fixer. (B) La détection des protéines O-GlcNAcylées peut être réalisée en couplant la lectine à la peroxydase et en l'utilisant tel un anticorps. (C) Enfin, l'électrophorèse WGA-SDS-PAGE permet de séparer les protéines O-GlcNAcylées de celles qui ne le sont pas. Cette électrophorèse retarde la migration des protéines modifiées par O-GlcNAcylation grâce à la présence d'un gel refermant la WGA entre les gels de concentration et de séparation.

La lectine fongique PVL (Psathyrella Velutina Lectin) est aussi utilisée pour l'étude de la O-GlcNAcylation. Mais tout comme la WGA, cette lectine reconnaît les acides sialiques (Cioci et al. 2006). La mise au point et la production chez *Escherichia coli* de la lectine

recombinante rPVL a permis de remédier à ce problème. En effet, la rPVL a une affinité beaucoup plus importante pour les résidus de GlcNAc que pour les acides sialiques (Machon et al. 2017; Machon and Varrot 2020). De la même manière que la WGA, la rPVL peut par exemple être couplée à la peroxydase afin d'être utilisée comme un anticorps. Le couplage de cette lectine recombinante à la biotine permet également l'enrichissement de protéines O-GlcNAcylées.

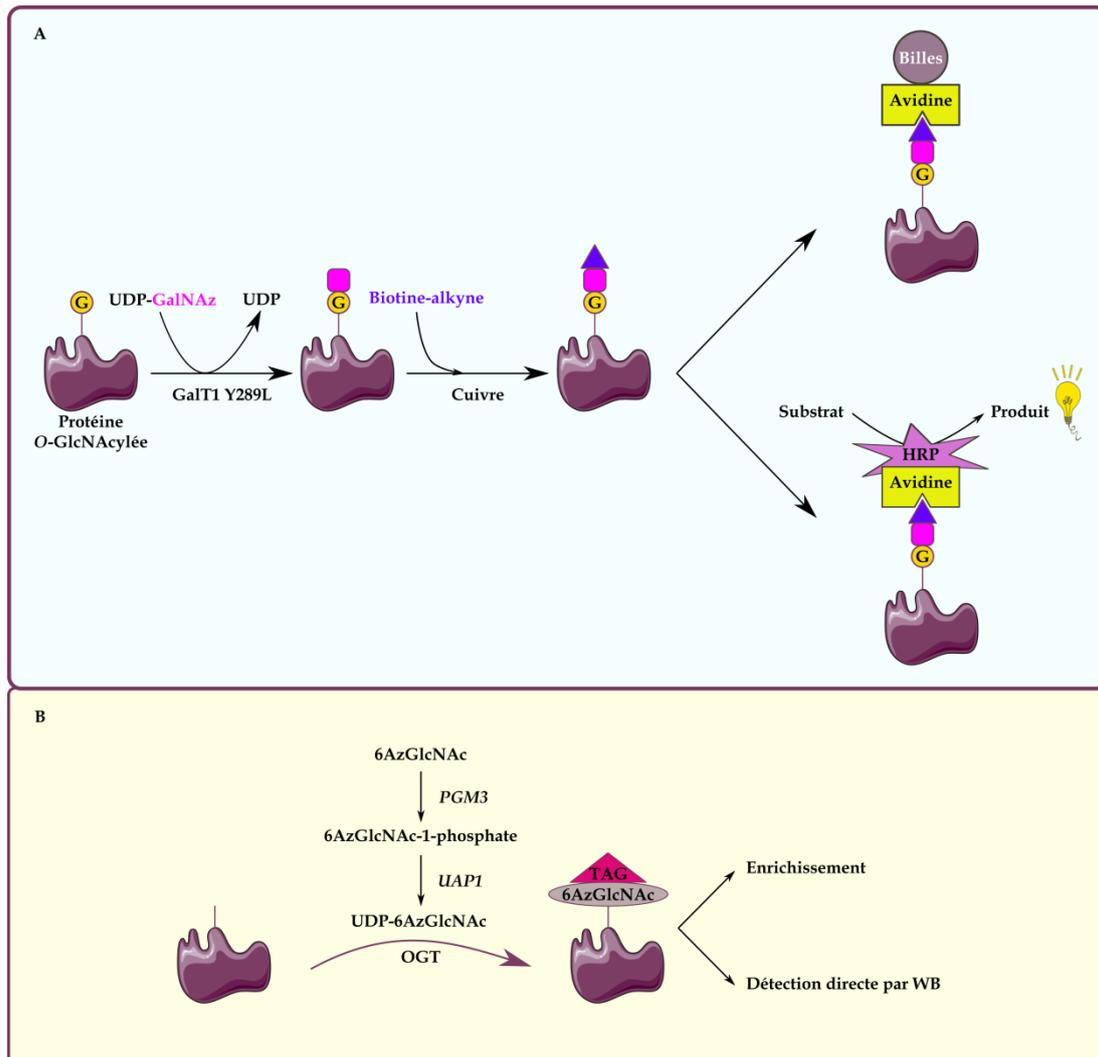
### 2. Les anticorps anti-O-GlcNAc :

Les anticorps sont utilisés pour mettre en évidence la O-GlcNAcylation par Western Blot ou par immunofluorescence ou pour enrichir les protéines O-GlcNAcylées par immunoprécipitation. Le CTD110.6, anticorps monoclonal (Comer et al. 2001) initialement dirigé contre le domaine C-terminal de l'ARN polymérase II, est aujourd'hui fréquemment utilisé pour la détection de la O-GlcNAcylation. Néanmoins, en reconnaissant entre autres les GlcNAc terminaux des N-glycanes et les glycoprotéines N-GlcNAc2-modifiées, cet anticorps manque quelque peu de spécificité (Isono 2011; Tashima and Stanley 2014). Le RL2 est un anticorps monoclonal produit initialement pour reconnaître des protéines du pore nucléaire (Snow et al. 1987). Il s'avère en fait que ce dernier détecte les résidus de GlcNAc de ces protéines et d'une pléthore d'autres protéines O-GlcNAcylées (Holt et al. 1987). Le RL2 est certainement aujourd'hui l'anticorps le plus fréquemment utilisé dans l'étude de la O-GlcNAcylation.

### 3. La « Click-Chemistry » :

La méthode de « click-chemistry » est utilisée pour marquer les protéines O-GlcNAcylées en leur ajoutant une petite molécule spécifique servant de tag. *In vitro*, elle consiste dans un premier temps en l'ajout d'un dérivé de galactosamine azido-modifié (GalNAz, N-Azidoacétylgalactosamine) sur les résidus de GlcNAc. Une galactosyltransférase modifiée, la GalT1 Y289L, se charge en effet du transfert de GalNAz à partir de l'UDP-GalNAz. Il s'ensuit l'addition d'une biotine-alkyne *via* la réaction chimique appelée cycloaddition entre les groupements azido du GalNAz et l'alkyne de la biotine (**Figure 31A**) (Vercoutter- Edouart et al. 2015). Ainsi, les protéines O-GlcNAcylées marquées par la biotine peuvent par exemple être enrichies sur de la streptavidine/avidine couplée à des billes d'agarose ou révélées directement par western blot avec de l'avidine couplée à la peroxydase.

Une méthode alternative peut être utilisée *in cellulo*. Elle consiste dans un premier temps à traiter les cellules en culture avec un reporteur chimique qui va être intégré par le métabolisme cellulaire (MCR pour Metabolic Chemical Reporters). Parmi ceux-ci, nous pouvons citer l'exemple du 6AzGlcNAc (6-azido-6-deoxy-N-acetyl-glucosamine) dont l'incorporation est très spécifique dans les protéines O-GlcNAcylées. Une fois entré dans la cellule, le 6AzGlcNAc est pris en charge par l'enzyme PGM3, une des enzymes de la voie HBP (**Figures 28 et 31B**), pour être transformé en 6AzGlcNAc-1-phosphate. Ce dernier est finalement métabolisé en UDP-6AzGlcNAc par UAP1. Ce nucléotide sucre donneur pourra ensuite permettre l'incorporation de 6AzGlcNAc dans les glycoprotéines (**Figure 31B**) (Chuh et al. 2014). Après la lyse cellulaire, un tag-alkyne fluorescent ou biotinylé peut être ajouté grâce à la réaction de cycloaddition, catalysée par le cuivre, entre les groupements azido du 6AzGlcNAc et l'alkyne du tag. Les protéines marquées peuvent finalement être enrichies ou directement détectées par western blot.



**Figure 31 : Principe de la Click-Chemistry.**

(A) *In vitro*, à partir de l'UDP-GalNAz, la GalT1 Y289L ajoute la GalNAz sur les résidus de GlcNAc des protéines O-GlcNAcylées. Une biotine-alkyne est ensuite ajoutée par réaction chimique entre les groupements azido du GalNAz et l'alkyne de la biotine. Les protéines O-GlcNAcylées marquées peuvent ensuite être enrichies sur billes d'agarose couplées à l'avidine ou directement détectées par western blot en utilisant l'avidine couplée à la HRP. (B) *In cellulo*, l'AzGlcNAc peut entrer dans la cellule et être pris en charge par le métabolisme cellulaire. En effet, l'enzyme PGM3 le transforme en 6AzGlcNAc-1-phosphate. L'UDP-AzGlcNAc sera ensuite formé par l'enzyme UAP1. Ce nucléotide sucre sera utilisé par l'OGT conduisant à l'incorporation de 6AzGlcNAc par les glycoprotéines. Une fois les cellules lysées, un tag est ajouté grâce à la réaction de cycloaddition. Les protéines marquées peuvent finalement être enrichies ou directement détectées par Western Blot (WB).

### 3) La spectrométrie de masse :

L'identification des sites O-GlcNAcylés aide à la meilleure compréhension du rôle de cette modification dans la fonction de la protéine. Cette localisation est possible grâce à

l'utilisation de la spectrométrie de masse mais reste toutefois un challenge. En effet, les résidus de GlcNAc peuvent être retrouvés en faible quantité au niveau de la séquence peptidique d'intérêt. De plus, la forme *O*-GlcNAcylée de la protéine cible est potentiellement peu abondante en comparaison à celle qui ne l'est pas. Pour palier à ce problème, l'enrichissement des protéines *O*-GlcNAcylées, à l'aide par exemple des anticorps ou des lectines que nous avons décrits dans les paragraphes précédents, peut être appliqué préalablement à l'analyse en spectrométrie de masse. Par ailleurs, la liaison  $\beta$ -glycosidique entre le résidu de GlcNAc et les groupements hydroxyles de sérine ou thréonine de la protéine cible est labile lors de l'usage de la dissociation induite par collision (CID pour Collision Induced Dissociation). Dans cette méthode de fragmentation couramment utilisée, l'ion parent d'intérêt est soumis à des collisions avec un gaz neutre. Au vu de la potentielle perte d'informations, la CID ne semble pas adaptée à l'étude des modifications post-traductionnelles comme la *O*-GlcNAcylation. Toutefois, de nombreuses avancées technologiques ont eu lieu dans le domaine de la spectrométrie de masse ces dernières années. Elles comprennent le développement de nouvelles techniques de fragmentation comme la dissociation par capture d'électrons (ECD pour Electron-Capture Dissociation) et la dissociation par transfert d'électrons (ETD pour Electron-Transfer Dissociation). Dans la technique d'ECD, des électrons de faible énergie sont envoyés sur l'ion parent provoquant ainsi sa fragmentation. Concernant l'ETD, son principe repose sur la réaction entre un réactif chimique donneur d'électrons et l'ion parent et conduit à la fragmentation de ce dernier. Ces deux techniques de fragmentation, ECD et ETD, préservent la liaison  $\beta$ -glycosidique entre le résidu de GlcNAc et la protéine cible et semblent donc plus adaptées pour l'identification des sites de *O*-GlcNAcylation (Ma and Hart 2014; Vercoutter- Edouart et al. 2015). Une fois identifiés, les sites *O*-GlcNAcylés peuvent être mutés. Généralement, les résidus de sérine et thréonine *O*-GlcNAcylés sont substitués en alanine. L'analyse du mutant permet : d'une part, de confirmer la modification et d'autre part, d'appréhender le rôle de cette modification.

Les différentes techniques que nous venons de décrire ont largement contribué à la compréhension des nombreux processus cellulaires fondamentaux régulés par *O*-GlcNAcylation. Quelques exemples de ces mécanismes, notamment ceux dont la dérégulation est impliquée dans la tumorigenèse, vont être décrits dans le paragraphe suivant.

## VI. Régulation des processus cellulaires fondamentaux par

### O-GlcNAcylation :

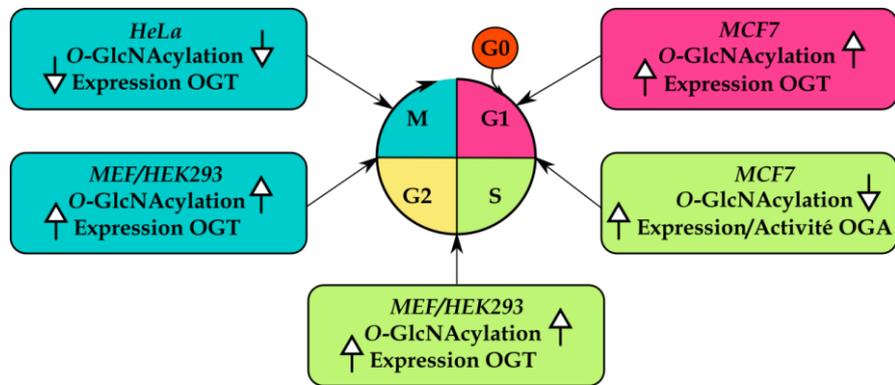
#### 1) O-GlcNAcylation et cycle cellulaire :

Le cycle cellulaire permet, à partir d'une cellule mère, de produire deux cellules filles génétiquement identiques entre elles mais aussi à la cellule mère dont elles sont issues. Les cellules de l'organisme ne se divisent pas constamment et sont dans ce cas dans un état appelé quiescent (phase G0). C'est sous l'impulsion de signaux mitogènes que les cellules peuvent intégrer le cycle cellulaire composé de quatre phases. La phase G1 correspond à une étape de croissance qui permet aux cellules de se préparer à la phase S : étape au cours de laquelle a lieu la réplication de l'ADN. Cette étape est suivie de la phase G2 qui prépare les cellules à la phase de mitose (phase M). Le cycle cellulaire est un processus très régulé notamment par différents points de contrôle (checkpoints) retrouvés aux transitions G1/S, G2/M et métaphase/anaphase. Au cours de la carcinogenèse, la perte de contrôle du cycle cellulaire permet aux cellules cancéreuses de proliférer de manière anarchique. Cette dérégulation a également pour conséquence l'accumulation de mutations conduisant ainsi à leur instabilité génétique.

#### 1. Les niveaux de O-GlcNAcylation fluctuent au cours du cycle cellulaire :

Plusieurs études ont montré des fluctuations des niveaux de O-GlcNAcylation et/ou de l'expression de l'OGT ou de l'OGA au cours des différentes phases du cycle cellulaire (**Figure 32**) suggérant un rôle de la O-GlcNAcylation dans le contrôle et la progression de ce cycle. Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7, synchronisées par privation de sérum, les niveaux globaux de O-GlcNAcylation (Drougat et al. 2012) et l'expression de l'OGT (Olivier-Van Stichelen et al. 2012a) augmentent en phase G1. A l'entrée en phase S, la hausse d'expression et d'activité de l'OGA conduit à une diminution des niveaux de O-GlcNAcylation dans ces mêmes cellules (Drougat et al. 2012). Il a été montré, dans des fibroblastes embryonnaires de souris et dans des cellules HEK293 synchronisés par privation de sérum, une hausse de l'expression de l'OGT et des niveaux de O-GlcNAcylation en fin de phase S. Cette élévation se poursuit jusqu'au début de la phase M (Yang et al. 2012). Enfin,

une autre étude a mis en évidence que les niveaux d'OGT et de O-GlcNAcylation diminuent durant la mitose dans des cellules HeLa synchronisées chimiquement avec le nocodazole, puis augmentent à nouveau en phase G1 (Sakabe and Hart 2010).



**Figure 32 :** Les niveaux de O-GlcNAcylation fluctuent au cours du cycle cellulaire.

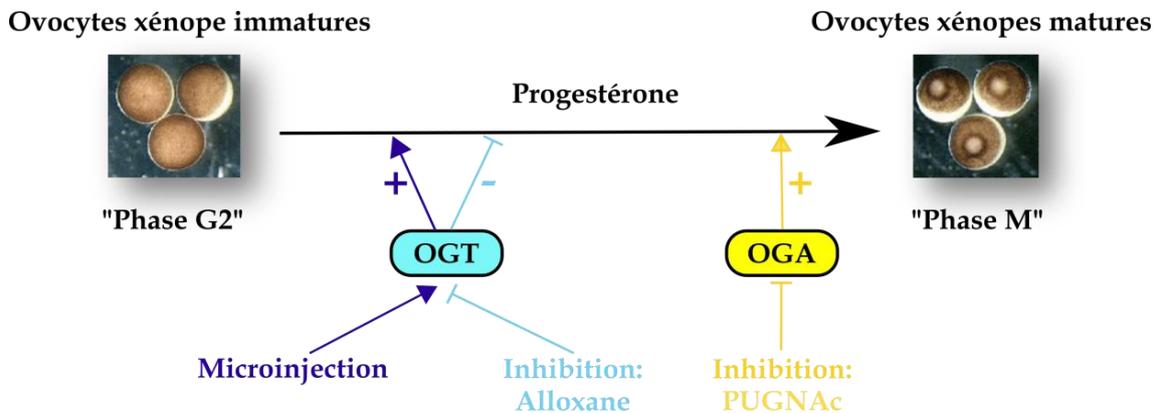
Il existe une hausse de l'expression de l'OGT corrélée à une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation dans les cellules MCF7 en phase G1. Dans ces mêmes cellules, l'activité et l'expression de l'OGA augmentent à l'entrée en phase S provoquant ainsi une baisse de O-GlcNAcylation. Dans les MEF et les cellules HEK293, l'expression de l'OGT et les niveaux de O-GlcNAcylation s'élèvent en fin de phase S. Cette hausse est maximale en début de phase M. Enfin, les niveaux d'OGT et de O-GlcNAcylation diminuent durant la mitose dans les cellules HeLa.

## 2. La modulation des niveaux de O-GlcNAcylation perturbe la progression normale du cycle cellulaire :

L'ovocyte de xénope est un modèle de choix pour l'étude de la division cellulaire. Il présente notamment un arrêt physiologique en prophase I de méiose, dans un état comparable à la phase G2 du cycle cellulaire des cellules somatiques. Sous l'impulsion d'un stimulus tel que la progestérone, l'ovocyte reprend sa méiose pour poursuivre en phase M. Lors de ce processus de maturation, il a été observé une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation (Lefebvre et al. 2004a). D'autres travaux ont aussi montré que la modulation des niveaux de O-GlcNAcylation perturbe la progression normale du cycle cellulaire dans ce modèle d'étude. Dans ce sens, l'inhibition de l'OGT avec l'alloxane empêche la maturation de l'ovocyte de xénope (Dehennaut et al. 2007). A l'inverse, le processus est accéléré lors de l'inhibition de l'OGA avec le PUGNAc (Dehennaut et al. 2007) ou suite à l'injection de ncOGT (Dehennaut et al. 2008) (**Figure 33**).

De façon similaire, d'autres études menées dans diverses lignées cellulaires humaines ont montré que l'abolition de l'expression de l'OGT ou de l'OGA perturbe la progression du

cycle cellulaire (Olivier-Van Stichelen et al. 2012a; Lanza et al. 2016). Pris ensemble, ces travaux montrent donc l'importance du maintien de l'homéostasie de O-GlcNAcylation dans la progression normale du cycle cellulaire.



**Figure 33 : La maturation des ovocytes de xénope est perturbée par des modulations des niveaux de O-GlcNAcylation.**

Les ovocytes de xénope présentent entre autres un arrêt physiologique en prophase I de méiose, semblable à la phase G2 du cycle cellulaire des cellules somatiques. Sous l'impulsion d'un stimulus tel que la progestérone, les ovocytes sont capables de mûrir et d'entrer en phase M. L'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation via la microinjection de l'OGT ou le traitement des ovocytes avec un inhibiteur de l'OGA accélère cette maturation induite par la progestérone. A l'inverse, l'inhibition de l'OGT empêche ce processus.

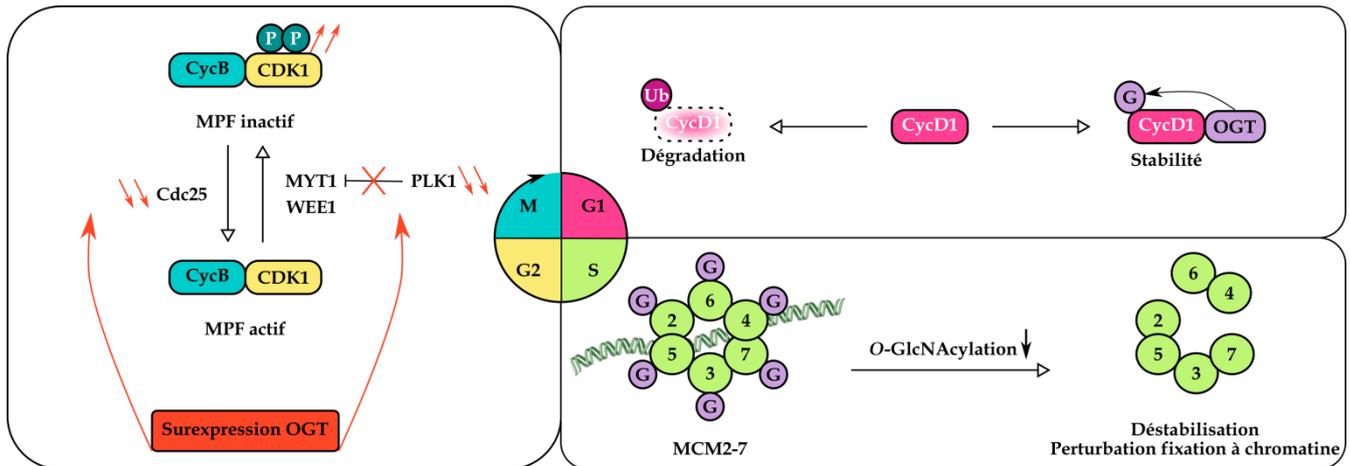
### 3. La O-GlcNAcylation régule des protéines impliquées dans le cycle cellulaire :

Plusieurs protéines régulatrices du cycle cellulaire sont contrôlées par O-GlcNAcylation. C'est le cas par exemple de la cycline D1, qui en s'associant avec les kinases CDK4/6, forme un complexe intervenant durant la phase G1 du cycle cellulaire. En protégeant la cycline D1 de la dégradation protéasomale, la O-GlcNAcylation serait en partie responsable du contrôle de la stabilité de cette protéine (Mascléf et al. 2019). Dans ce sens, l'extinction de l'OGT dans les cellules MCF7 diminue la quantité de protéines cycline D1 mais n'a aucun effet sur les transcrits. A l'inverse, l'inhibition de l'OGA avec le Thiamet-G provoque une baisse de l'ubiquitination de la protéine et une augmentation de sa demi-vie (Figure 34).

D'autres travaux ont montré que les protéines MCM (minichromosome maintenance), formant un complexe composé de MCM2 à 7 et impliqué dans la réplication de l'ADN *via* leur activité d'hélicase, sont O-GlcNAcylées (Drougat et al. 2012; Leturcq et al. 2018). L'abolition de l'expression de l'OGT dans les cellules MCF7 diminue l'association de MCM6,

MCM7 et MCM2 avec la chromatine. Dans ces conditions, aucun changement n'est observé pour les protéines MCM3, MCM4 et MCM5. De plus, l'extinction de l'OGT perturbe les interactions MCM6/MCM2 et MCM7/MCM4. La O-GlcNAcylation des protéines MCM stabiliserait donc le complexe et contrôlerait leur liaison à la chromatine (**Figure 34**) (Leturcq et al. 2018).

La protéine CDK1 forme avec la cycline B un complexe protéique appelé MPF (M-phase-Promoting Factor) qui est impliqué dans le contrôle de l'entrée et de la sortie de phase M du cycle cellulaire. Ce complexe est hautement régulé notamment *via* des phosphorylations inhibitrices retrouvées sur la Thr14 et la Tyr15 de la CDK1 qui sont respectivement apposées par les enzymes WEE1 et MYT1. La protéine MYT1 est elle-même contrôlée par une phosphorylation inhibitrice sur la Thr495 mise en place par la kinase PLK1. L'activation du MPF nécessite entre autres la déphosphorylation des résidus Thr14/Tyr15 par la Cdc25 (Schmidt et al. 2017). La O-GlcNAcylation semble inhiber l'activité de la CDK1 (**Figure 34**) (Wang et al. 2010). Dans ce sens, la surexpression de l'OGT a pour conséquence : (1) une augmentation des phosphorylations inhibitrices (Thr14 et Tyr15) de la CDK1, (2) une diminution de la phosphorylation des protéines cibles de la CDK1, (3) une baisse des niveaux de la phosphorylation inhibitrice (Thr495) de MYT1, (4) une réduction de l'expression de PLK1 et pour finir (5) la quantité de transcrits Cdc25 diminue également (**Figure 34**).



**Figure 34 : La O-GlcNAcylation régle des protéines impliquées dans le contrôle et la progression du cycle cellulaire.**

Le MPF, formé de l'association des protéines CycB et CDK1, est responsable du contrôle de l'entrée et de la sortie de phase M du cycle cellulaire. Ce complexe est notamment maintenu inactif par la présence de deux phosphorylations inhibitrices sur la CDK1, Thr14 et Tyr15, respectivement mises en place par les enzymes WEE1 et MYT1. La kinase MYT1 est elle-même régulée par une phosphorylation inhibitrice apposée par la protéine PLK1. L'activation du complexe MPF passe entre autres par l'action de la Cdc25 qui déphosphoryle la CDK1. La O-GlcNAcylation serait impliquée dans la régulation de l'activité de la CDK1. En effet, la surexpression de l'OGT conduit à une augmentation des phosphorylations inhibitrices de la CDK1, une diminution de PLK1 qui phosphoryle MYT1 dans une moindre mesure et enfin une baisse de l'expression de Cdc25.

La stabilité de la cycline D1, protéine impliquée dans la phase G1 du cycle cellulaire, est en partie contrôlée par O-GlcNAcylation.

Les protéines MCM2 à 7, intervenant lors de la réplication, sont également O-GlcNAcylées. Cette modification régulerait la stabilité du complexe et sa fixation à la chromatine. Dans ce sens, la diminution des niveaux de O-GlcNAcylation provoque une perte des interactions entre les protéines MCM2-MCM6 et MCM4-MCM7 ainsi qu'une diminution de l'association de MCM6, MCM7 et MCM2 avec la chromatine.

P : Phosphorylation – Ub : Ubiquitination – G : O-GlcNAcylation.

## 2) O-GlcNAcylation et transcription :

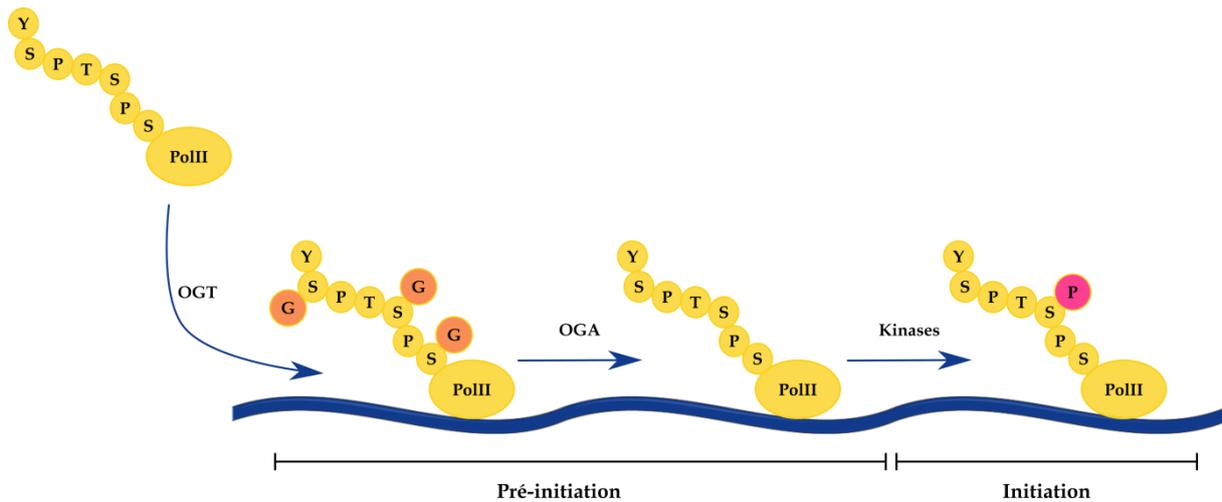
De nombreux gènes sont différenciellement exprimés durant la progression cancéreuse. Par exemple, des analyses bioinformatiques récentes ont mis en évidence 451 gènes dont l'expression est différente entre des tissus cancéreux coliques et les tissus sains adjacents (Zhao et al. 2019). De plus, de nombreux facteurs de transcription sont altérés dans les processus de tumorigenèse et participent à la mise en place des différentes « hallmarks » du cancer (Bushweller 2019). L'ARN polymérase II et de multiples facteurs de transcription sont modifiés par O-GlcNAcylation démontrant le rôle crucial de cette modification post-traductionnelle dans le contrôle de la transcription et de l'expression génique.

### 1. O-GlcNAcylation et ARN polymérase II :

Chez l'Homme, l'ARN polymérase II comporte douze sous-unités. Parmi celles-ci, la plus grande contient un domaine CTD formé de cinquante-deux répétitions d'un motif

constitué de sept acides aminés : Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. La phosphorylation de certains résidus de ce domaine C-terminal permet de coordonner le recrutement de diverses protéines au cours des différentes étapes de la transcription. La sérine 5 est le premier résidu phosphorylé. Cette modification permet la libération du promoteur ainsi que le recrutement de la machine responsable de la mise en place de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm naissant. Il s'ensuit la phosphorylation de la sérine 2 qui permet l'élongation, l'épissage et la polyadénylation. Le rôle de la phosphorylation de la sérine 7 dans la transcription des gènes codant des protéines n'est quant à lui pas clair (Egloff and Murphy 2008; Heidemann et al. 2013; Lewis and Hanover 2014; Jeronimo et al. 2016).

Deux études complémentaires ont mis en évidence l'interaction entre l'OGT et l'ARN polymérase II et la modification par *O*-GlcNAcylation des sérines 2, 5 et 7 du domaine CTD (Ranuncolo et al. 2012; Lewis et al. 2016) suggérant un rôle de la *O*-GlcNAcylation du CTD dans la régulation de la transcription. Dans ce sens, l'inhibition de la *O*-GlcNAc transférase et de la *O*-GlcNAcase, respectivement avec le ST045849 ou le PUGNAc, empêche la transcription *in vitro* (Ranuncolo et al. 2012). L'analyse des mécanismes sous-jacents a permis de démontrer l'implication de la *O*-GlcNAcylation dans le recrutement de l'ARN polymérase II et la formation du complexe de pré-initiation. En effet, l'inhibition de l'OGT diminue le recrutement de l'ARN polymérase II au niveau du complexe de pré-initiation (Lewis et al. 2016). Aussi, l'extinction de l'OGT mène à une baisse de l'occupation de l'ARN polymérase II sur plusieurs promoteurs dans des lymphocytes B (Ranuncolo et al. 2012). Les auteurs de ces études ont proposé un modèle dans lequel : d'une part, l'activité de l'OGT est requise durant l'étape de pré-initiation et d'autre part, l'hydrolyse des résidus de GlcNAc par l'OGA est essentielle pour permettre consécutivement la phosphorylation de la sérine 5 de l'ARN polymérase II (**Figure 35**).



**Figure 35 :** La O-GlcNAcylation régule l'activité de l'ARN polymérase II en modifiant son domaine C-terminal (CTD).

L'ARN polymérase II humaine est formée de douze sous-unités. La plus grande d'entre elles comporte un domaine C-terminal (CTD) formé de cinquante-deux répétitions d'un motif constitué de sept acides aminés : Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. L'ARN polymérase est O-GlcNAcylée sur les sérines 2, 5 et 7. Cette modification semble importante pour le recrutement de l'enzyme au niveau du promoteur ainsi que pour la formation du complexe de pré-initiation. L'OGA hydrolyse ensuite les résidus de GlcNAc permettant dans un premier temps la phosphorylation de la sérine 5 de l'ARN polymérase II par différentes kinases. Cette étape de phosphorylation est requise pour la libération du promoteur et l'initiation de la transcription. Y : tyrosine - S : sérine - P : proline - T : thréonine - G : O-GlcNAcylation - P : phosphorylation - PolII : ARN polymérase II.

## 2. O-GlcNAcylation et facteurs de transcription :

### i. La O-GlcNAcylation régule Sp1 :

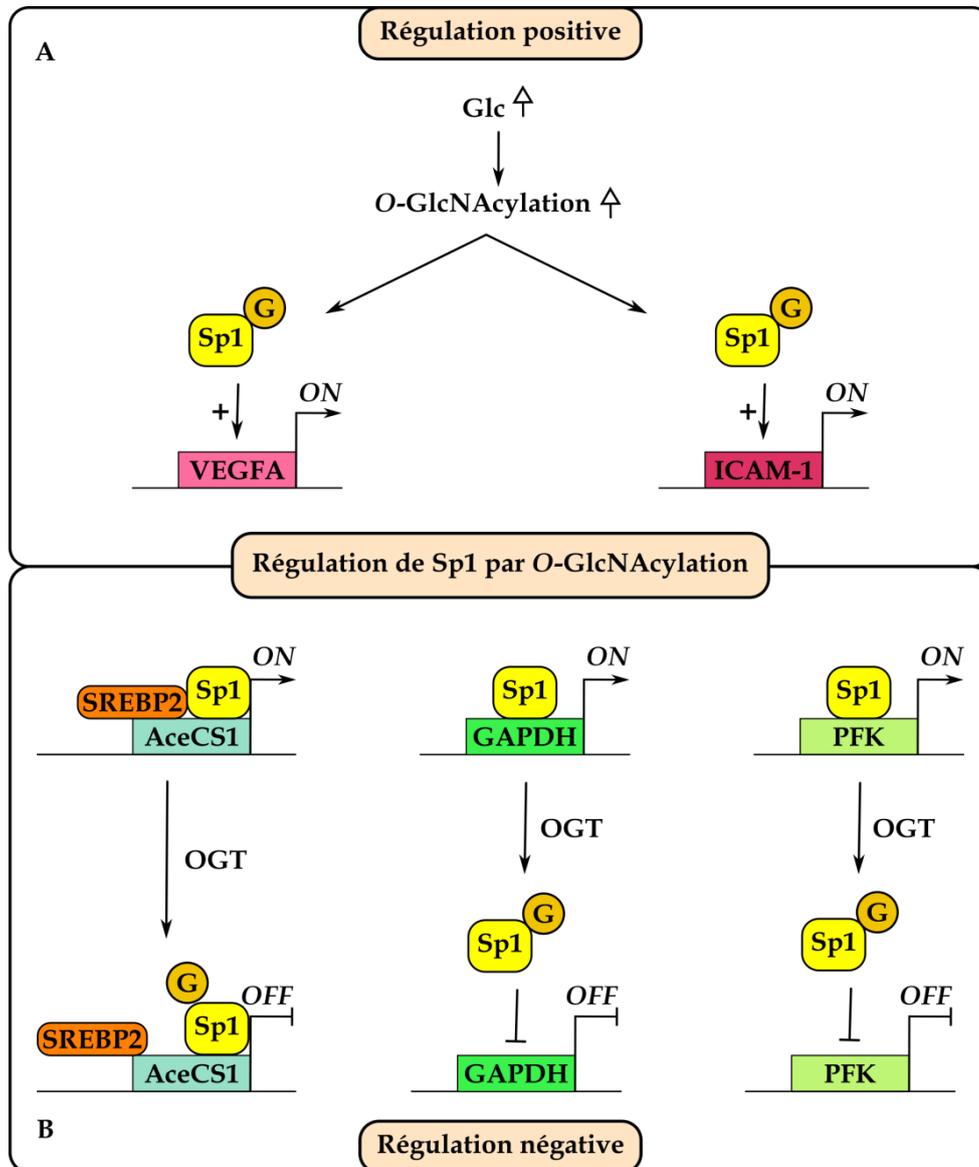
De nombreux facteurs de transcription sont régulés positivement ou négativement par O-GlcNAcylation. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer dans un premier temps l'exemple de Sp1 (Specificity protein 1) qui a fait l'objet de nombreux travaux (**Figure 36**). On considère qu'il existe plusieurs milliers de sites de fixation pour les facteurs de transcription de la famille Sp (Sp1, Sp2, Sp3 et Sp4) dans le génome humain. Ceci reflète donc leur importance dans la régulation de la transcription de nombreux gènes dont certains sont impliqués dans la tumorigenèse (Beishline and Azizkhan- Clifford 2015). Dans ce sens, il existe une augmentation de l'expression de Sp1 dans de nombreux cancers tels que : gastrique, pancréas, sein, gliome et colorectal (Beishline and Azizkhan- Clifford 2015; Xu et al. 2019c). Le facteur de transcription Sp1 est régulé par de nombreuses modifications post-traductionnelles dont la O-GlcNAcylation.

L'exposition des cellules ARPE-19 (cellules épithéliales pigmentaires de rétine humaine) à une forte concentration de glucose augmente la O-GlcNAcylation de Sp1 et l'expression de la protéine VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor A). La hausse

d'expression de ce facteur de croissance est empêchée par l'abolition de l'expression de l'OGT ou par son inhibition pharmacologique. Par ailleurs, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont montré une augmentation de l'interaction entre Sp1 et le promoteur de *VEGF-A* en conditions d'hyperglycémie. L'abolition de l'expression de Sp1 combinée à une hyperglycémie ne change pas l'expression de *VEGF-A*. La *O*-GlcNAcylation de Sp1 promouvrait donc son interaction avec le promoteur du facteur de croissance permettant ainsi une hausse de son expression (**Figure 36A**) (Donovan et al. 2014). De la même manière, il a été montré dans des cellules HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et RRCECs (Rat Retinal Capillary Endothelial Cells) une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation, de l'expression de Sp1 et d'ICAM-1 (IntraCellular Adhesion Molecule 1) en réponse à une hyperglycémie. Ces hausses sont empêchées par l'inhibition pharmacologique de l'OGT. En conditions hyperglycémiques, l'abolition de l'expression de Sp1 permet la diminution de l'expression d'ICAM-1. En réponse à une hyperglycémie, l'augmentation de l'expression d'ICAM-1 serait donc médiée par la *O*-GlcNAcylation de Sp1 (**Figure 36A**) (Zhang et al. 2017c).

Bien que ces études semblent montrer que la *O*-GlcNAcylation de Sp1 régule positivement la transcription, d'autres travaux ont mis en évidence qu'elle l'inhiberait. Par exemple, la *O*-GlcNAcylation de Sp1 empêcherait son interaction avec un autre facteur de transcription : SREBP2 (Sterol Regulatory Element Binding Protein 2) inhibant ainsi l'activation du promoteur *AceCS1* (Acetyl-CoA Synthetase 1) (Lim and Chang 2010). Dans ce sens, le mutant Sp1 « non GlcNAcylable » interagirait davantage avec SREBP2 en comparaison avec la forme sauvage de Sp1. De plus, par des tests d'activité promotrice, Lim et ses collaborateurs ont montré que la surexpression simultanée de SREBP2 et de l'OGT diminue l'activité du promoteur *AceCS1*. A l'inverse, la surexpression de la protéine Sp1 « non GlcNAcylable » augmente l'activité du promoteur *AceCS1* en comparaison au facteur de transcription non muté (**Figure 36B**) (Lim and Chang 2010). Ce mutant Sp1 « non GlcNAcylable » a également été utilisé dans une étude plus récente qui a permis de prouver que la *O*-GlcNAcylation de Sp1 inhiberait sa liaison sur le promoteur de certains de ses gènes cibles (**Figure 36B**) (Lim et al. 2015). En effet, la surexpression de Sp1 sauvage mène à une faible hausse des niveaux d'ARNm de plusieurs gènes glycolytiques dans les cellules HEK293 alors que le mutant Sp1 les augmente de façon plus importante. Pour deux de ces gènes glycolytiques, PFK et GAPDH, il a été montré par des expériences

d'immunoprécipitation de la chromatine que l'interaction entre leur promoteur et Sp1 est plus forte lorsque le facteur de transcription est muté.



**Figure 36 :** La O-GlcNAcylation régule positivement et négativement l'activité du facteur de transcription Sp1.

(A) En conditions hyperglycémiques, la O-GlcNAcylation de Sp1 augmente promouvant ainsi son interaction avec le promoteur VEGFA et la hausse de l'expression du facteur de croissance. De la même manière, l'exposition à une forte concentration de glucose peut conduire à une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation ainsi que de l'expression de Sp1 et d'ICAM-1. En réponse à l'hyperglycémie, la hausse d'ICAM-1 pourrait donc être médiée par la forme O-GlcNAcyliée de Sp1. Dans ces deux exemples, la O-GlcNAcylation de Sp1 semble réguler positivement la transcription. Néanmoins, il s'avère que cette modification post-traductionnelle puisse aussi contrôler négativement ce processus. (B) Sp1 et SREBP2 régulent tous deux la transcription d'AceCS1. La O-GlcNAcylation de Sp1 diminue l'interaction entre ces deux facteurs de transcription inhibant l'activation du promoteur AceCS1. Pareillement, la O-GlcNAcylation de Sp1 empêche l'interaction du facteur de transcription avec les promoteurs de la GAPDH et de PFK. G : O-GlcNAcylation - Glc : Glucose.

### ii. La O-GlcNAcylation régule NF- $\kappa$ B :

NF- $\kappa$ B est également un facteur de transcription régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans divers processus cellulaires dont l'apoptose, l'inflammation ou la prolifération. L'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B est dérégulée dans de nombreux types de cancers dont le CCR (Li et al. 2015; Soleimani et al. 2020). La O-GlcNAcylation de NF- $\kappa$ B permet entre autres de réguler son activité transcriptionnelle. Dans ce sens, il a été montré *in vitro* dans des cellules HeLa que l'inhibition de l'OGA augmente l'expression de CXCR4 (C-X-C chemokine receptor 4) et de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B. Par ailleurs, la substitution de la thréonine 352 de p65 (site identifié comme étant O-GlcNAcylé) en alanine diminue l'expression de CXCR4. En réalisant des xenogreffes de cellules HeLa-shOGT ou HeLa-shCTL dans des souris nude, les auteurs ont confirmé *in vivo* le rôle de la O-GlcNAcylation de p65 dans la régulation de l'expression de CXCR4. Dans ce sens, ils ont démontré que l'extinction de l'OGT diminue d'une part l'expression et la O-GlcNAcylation de p65 et réduit d'autre part l'expression de CXCR4 (Ali et al. 2017).

Par ailleurs, la translocation nucléaire de NF- $\kappa$ B (p65) serait aussi régulée par O-GlcNAcylation (Phoomak et al. 2016). Effectivement, en réalisant des expériences de fractionnement cellulaire et d'immunofluorescence dans les cellules KKKU-213 et KKKU-214 (lignées cellulaires de cholangiocarcinome), les auteurs ont montré qu'en conditions d'extinction de l'OGT, NF- $\kappa$ B semble cytoplasmique. A l'inverse, lors de l'abolition de l'expression de l'OGA, NF- $\kappa$ B augmente dans la fraction nucléaire.

### 3) O-GlcNAcylation et épigénétique :

De plus en plus d'études soulignent le rôle crucial des altérations épigénétiques dans l'initiation et la progression des cancers. Entre autres, ces anomalies de la méthylation de l'ADN ou des modifications des histones perturbent l'expression normale des gènes. L'hyperméthylation de l'ADN ou les marques répressives des histones sont à l'origine de l'inhibition de l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs. A l'inverse, la perte de méthylation de l'ADN ou les marques activatrices des histones augmentent l'expression d'oncogènes. Comme nous le verrons, de nombreux travaux ont révélé ces dernières années le rôle important de la O-GlcNAcylation dans la régulation épigénétique de l'expression génique : (1) l'OGT interagit avec certains membres de la famille des ADN déméthylases TET, (2) les histones peuvent être O-GlcNAcylées et (3) la O-GlcNAcylation régule les

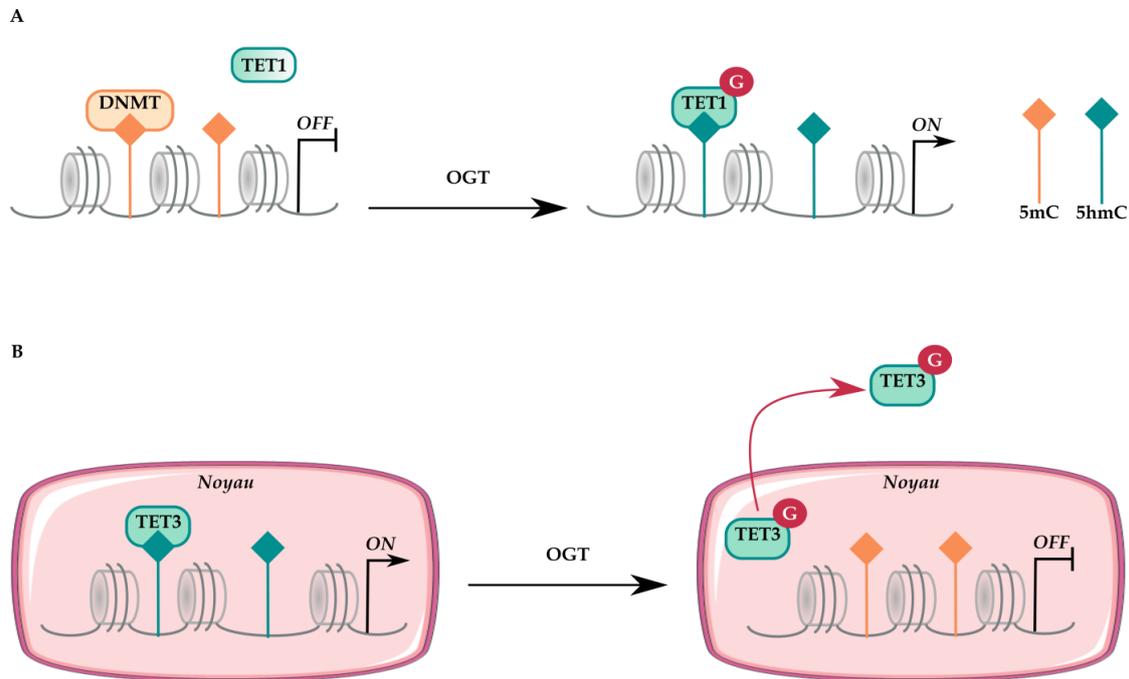
modifications post-traductionnelles des histones en modifiant des désacétylases, des méthyltransférases et les protéines de la famille Polycomb.

### 1. La O-GlcNAcylation régule les protéines TET :

La méthylation de l'ADN est une marque épigénétique répressive. L'ajout d'un groupement méthyle sur des cytosines est catalysé par des ADN méthyltransférases (DNMTs) à partir du donneur S-adénosylméthionine (SAM). A l'inverse, les membres de la famille TET (Ten-Eleven Translocation) à savoir TET1, TET2 et TET3 sont responsables de la transformation de la 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5hmC) puis 5-formylcytosine (5fC) et 5-carboxylcytosine (5caC). Bien que parfois contradictoires, plusieurs études ont rapporté une relation étroite entre ces protéines TET, l'OGT et la O-GlcNAcylation.

En effet, des analyses par spectrométrie de masse ont révélé l'existence de plusieurs sites O-GlcNAcylés sur les protéines TET. Alors que TET2 et TET3 présenteraient une vingtaine de sites modifiés, TET1 avec seulement six sites serait moins sujette à la O-GlcNAcylation (Bauer et al. 2015). Cependant, les protéines de la famille TET sont régulées de manière différentielle par O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation de TET1 contrôlerait en partie son expression (**Figure 37A**) (Shi et al. 2013). La substitution de la thréonine 535 en alanine diminue la O-GlcNAcylation de TET1 suggérant que ce résidu soit le site majeur modifié par l'OGT. De plus, alors que la surexpression de l'OGT et de TET1 dans des cellules 293T provoque la stabilisation de TET1, la mutation T535A l'abroge. Il a également été montré par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine que l'extinction de l'OGT dans des cellules souches embryonnaires murines diminue la marque 5hmC et l'enrichissement de TET1 sur plusieurs de ses gènes cibles. Toutefois, une étude menée par Zhang et ses collaborateurs a démontré dans des cellules HeLa que l'OGT n'affecte ni la localisation cellulaire ni l'activité des protéines TET1 et TET2 (Zhang et al. 2014a). En ce qui concerne TET3, la O-GlcNAcylation de cette enzyme mène à son export nucléaire et inhibe *in fine* son activité (**Figure 37B**) (Zhang et al. 2014a). Dans ce sens, des expériences d'immunofluorescence prouvent que cette protéine serait majoritairement nucléaire. Néanmoins, la surexpression simultanée de TET3 et de l'OGT dans des cellules HeLa conduit à un changement de localisation de TET3 qui semble préférentiellement retrouvée au niveau cytoplasmique. La délétion du domaine C-terminal de l'OGT empêcherait ce changement de

localisation. De plus, la surexpression concomitante de TET3 et de l'OGT diminue la marque 5hmC.



**Figure 37 : La O-GlcNAcylation régule les protéines TET.**

(A) La O-GlcNAcylation de TET1 stabilise la protéine permettant consécutivement son enrichissement au niveau de ses gènes cibles et une hausse de la marque 5hmC. (B) TET3 est majoritairement nucléaire. La O-GlcNAcylation de celle-ci conduit à son export vers le cytoplasme menant à une baisse de la marque 5hmC. 5mC : 5-méthylcytosine - 5hmC : 5-hydroxyméthylcytosine - G : O-GlcNAcylation - DNMT : ADN méthyltransférase.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'interaction entre l'OGT et les protéines TET conduit au recrutement de la O-GlcNAc transférase à la chromatine (Chen et al. 2013; Vella et al. 2013; Ito et al. 2014). Plus particulièrement, dans le cas de TET2, cette interaction favorise la O-GlcNAcylation des histones (Chen et al. 2013). Dans ce sens, Chen et ses collaborateurs ont prouvé dans des cellules HEK 293T que l'OGT privée de deux domaines essentiels à son interaction avec TET2, les répétitions TPR5 et TRP6, est moins présente à la chromatine en comparaison à l'OGT contrôle. Cette baisse du recrutement de l'OGT mutée à la chromatine est accompagnée par une diminution de la O-GlcNAcylation de la sérine 112 de l'histone H2B (Chen et al. 2013).

## 2. L'OGT fait partie du code des histones :

Les histones sont retrouvées dans le noyau des cellules eucaryotes. Ce sont les protéines autour desquelles s'enroule l'ADN pour former l'unité de base de la chromatine : le nucléosome. De par leur implication dans la formation de ce dernier, les histones H2A,

H2B, H3 et H4 sont appelées histones de « cœur ». Elles sont constituées d'un domaine C-terminal globulaire et d'un domaine N-terminal flexible retrouvé à l'extérieur du nucléosome assemblé et appelé « queue d'histone ». Cette dernière est accessible à de nombreuses enzymes et est par conséquent la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles formant le « code des histones ». Ces différentes combinaisons de modifications post-traductionnelles de la queue des histones influencent directement la structure de la chromatine, l'interaction de protéines de liaison à la chromatine et gouvernent donc l'état transcriptionnel des gènes. Ces modifications incluent la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la SUMOylation. De plus, même si une étude semble démontrer le contraire (Gagnon et al., 2015), plusieurs travaux ont également prouvé que les histones pouvaient être la cible de la O-GlcNAcylation (Dehennaut et al. 2014; Forma et al. 2014; Wu et al. 2017a).

En effet, de nombreux sites de O-GlcNAcylation sur les histones H2A, H2B, H3 et H4 ont pu être identifiés. Ces résidus modifiés sont résumés dans le tableau suivant (**Tableau 2**) et quelques exemples de la régulation des histones par O-GlcNAcylation vont être évoqués.

| Histones   | Résidus O-GlcNAcylés  | Références  |
|------------|---|---|
| <b>H2A</b> | Ser40 – Thr101  | (Sakabe et al. 2010; Hiroswawa et al. 2016)                 |
| <b>H2B</b> | Ser36 – Thr53 – Ser56 – Ser57 – Ser65 – Ser91 – Ser112 – Ser123 | (Sakabe et al. 2010; Fujiki et al. 2011; Hahne et al. 2012) |
| <b>H3</b>  | Ser10 – Thr32   | (Zhang et al. 2011; Fong et al. 2012)                       |
| <b>H4</b>  | Ser47   | (Sakabe et al. 2010)  |

**Tableau 2 : Sites de O-GlcNAcylation des histones H2A, H2B, H3 et H4.**

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la O-GlcNAcylation de la sérine 112 de l'histone H2B promeut sa monoubiquitination (Fujiki et al. 2011). Dans ce sens, le traitement de cellules HeLa avec 4,5g/l de glucose augmente non seulement les niveaux de O-GlcNAcylation de la sérine 112 de l'histone H2B mais également son ubiquitination sur la lysine 120. Ces élévations sont empêchées par l'abolition de l'expression de l'OGT. De la même manière, en réponse au glucose, le mutant H2B AA (mutations S112A/T122A) ne présente pas d'augmentation de la marque K120Ub. Des expériences de co-immunoprécipitation ont également montré que les mutants H2B AA et H2B S112A n'interagissent pas avec l'ubiquitine ligase BRE1A comparativement à l'histone H2B WT. Aussi, en réponse à un traitement avec du glucose, l'extinction de l'OGT diminue la présence des marques H2BS112GlcNAc et H2BK120Ub et de la protéine BRE1A sur le promoteur de *GSK3β*. La O-GlcNAcylation de la sérine 112 de l'histone H2B semble donc servir de point

d'ancrage pour le recrutement de la protéine BRE1A qui assure l'ubiquitination de la lysine 120 de cette histone.

La *O*-GlcNAcylation des histones semble également être impliquée dans la progression du cycle cellulaire. La surexpression de l'OGT dans des cellules HeLa, synchronisées en phase M, diminue la phosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 (H3S10P), une modification impliquée dans la condensation des chromosomes (Sakabe and Hart 2010). Cette surexpression altère aussi d'autres modifications post-traductionnelles des histones telles que : H3K9Ac (acétylation de la lysine 9 de l'histone H3), H3R17Me2 (diméthylation de l'arginine 17 de l'histone H3) et H3K27Me3 (triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3) montrant une fois de plus le dialogue entre la *O*-GlcNAcylation et les autres modifications post-traductionnelles. Zhang et ses collaborateurs ont montré que les niveaux globaux de *O*-GlcNAcylation de l'histone H3 varient au cours du cycle cellulaire : ils baissent au cours de la phase S puis augmentent à nouveau lors de la progression des cellules vers les phases G2 et M (Zhang et al. 2011). Ces auteurs ont également identifié la sérine 10 de l'histone H3 comme résidu *O*-GlcNAcylé. Le traitement des cellules HEK293 avec de la glucosamine augmente les niveaux de *O*-GlcNAcylation de l'histone H3 et diminue de manière concomitante la marque H3S10P démontrant ainsi que la *O*-GlcNAcylation entre en compétition avec la phosphorylation de la lysine 10 de l'histone H3 au cours du cycle cellulaire.

### **3. L'OGT régule les protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles des histones :**

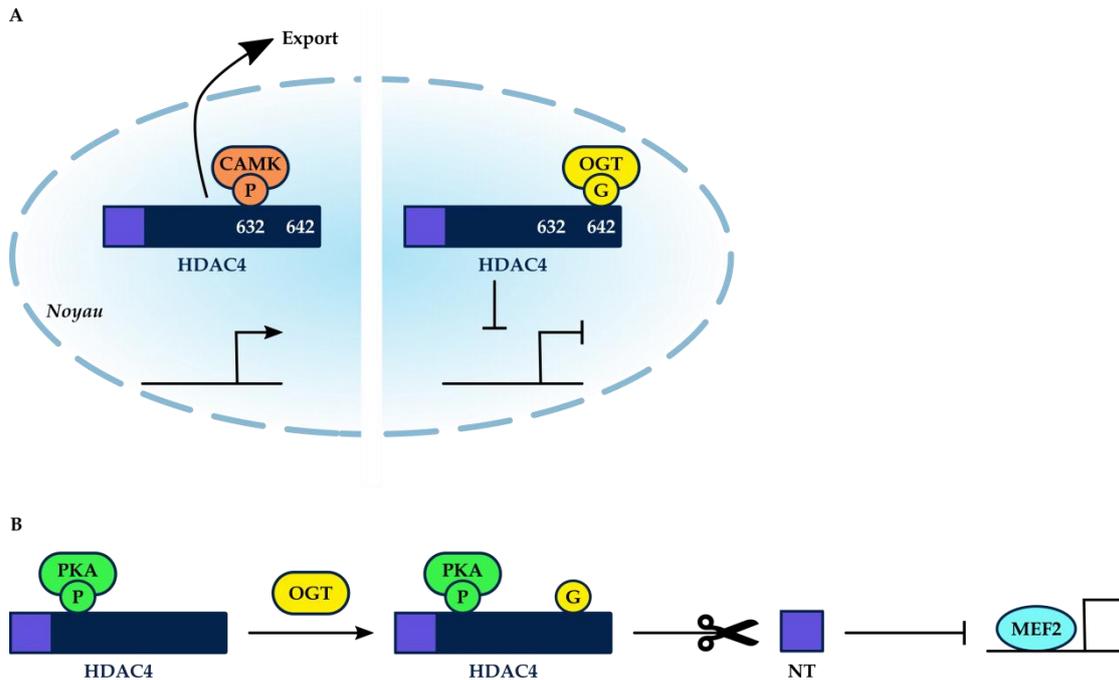
Au delà de la régulation directe des histones par *O*-GlcNAcylation, l'OGT peut également modifier et réguler les protéines impliquées dans les modifications des queues des histones.

#### **i. La *O*-GlcNAcylation régule les HDACs :**

Les protéines HDAC (Histone Déacétylase) sont responsables de l'hydrolyse des groupements acétyles situés sur les résidus lysines de la queue des histones. Ces enzymes permettent la compaction de la chromatine et donc la répression de la transcription. Chez l'Homme, il existe dix huit HDAC réparties en quatre classes : I, II, III et IV (Seto and Yoshida 2014). Parmi ces protéines, il a été montré que HDAC1 et HDAC4, appartenant respectivement à la classe I et à la classe II, sont régulées par *O*-GlcNAcylation.

HDAC1 est O-GlcNAcylée sur deux résidus : Thr114 et Ser263 (Zhu et al. 2016a). Cette modification post-traductionnelle régulerait l'activité catalytique de HDAC1. En effet, la surexpression des mutants T114A ou S263A dans les cellules HepG2 (lignée cancéreuse du foie) diminue l'activité de HDAC1 et augmente l'acétylation des histones H3 et H4. Ces résultats ont été confirmés en étudiant l'expression de *p21*, un gène cible connu de HDAC1. Les mutants T114A ou S263A provoquent une augmentation de l'expression de *p21* et une diminution du recrutement de HDAC1 sur le promoteur de ce gène.

Concernant HDAC4, cette enzyme peut être régulée par phosphorylation *via* différentes kinases. (1) La CAMK (calcium/calmodulin-dependent protein kinase) phosphoryle notamment la sérine 632 ce qui engendre l'export nucléaire de HDAC4 et la levée de répression de ses gènes cibles (**Figure 38A**). (2) Quant à la PKA (Protein Kinase A), elle phosphoryle HDAC4 provoquant ainsi la protéolyse de l'enzyme et la génération d'un fragment N-terminal (noté HDAC4-NT) qui inhibe l'activité du facteur de transcription MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) (**Figure 38B**) (Wang et al. 2014b). Une étude récente a identifié la Ser642 comme site de O-GlcNAcylation de HDAC4 (Kronlage Mariya et al. 2019). La O-GlcNAcylation de HDAC4 contrôlerait l'export nucléaire de cette enzyme en entrant en compétition avec la phosphorylation de la sérine 632 mise en place par la CAMK (**Figure 39A**). En effet, la protéine HDAC4 « non GlcNAcylable » (mutant S642A) présente des niveaux de Phospho-Ser632 plus élevés en comparaison à l'enzyme contrôle. Par ailleurs, la O-GlcNAcylation de HDAC4 serait également essentielle à la production du fragment HDAC4-NT dépendante de la PKA (**Figure 38B**). Dans ce sens, il existe chez des patients atteints de diabète sucré et chez des souris db/db (animaux diabétiques déficients en récepteur de la leptine) une augmentation de la production de HDAC4-NT. Inversement, la mutation S642A empêche la protéolyse de HDAC4 induite par la PKA.



**Figure 38 : La O-GlcNAcylation régule HDAC4.**

(A) La phosphorylation de la sérine 632 de HDAC4 entraîne son export nucléaire et donc la levée de la répression des gènes cibles de cette histone déacétylase. La O-GlcNAcylation d'un résidu voisin, la sérine 642, empêche cet export. (B) HDAC4 est aussi la cible d'une autre kinase : la PKA. Cette dernière induit la protéolyse de l'enzyme dépendamment de sa O-GlcNAcylation. Le fragment NT ainsi généré agit comme un inhibiteur de l'activité du facteur de transcription MEF2. P : Phosphorylation – G : O-GlcNAcylation – NT : fragment N-terminal de HDAC4.

### ii. L'OGT régule l'histone méthyltransférase MLL5 :

L'histone méthyltransférase MLL5 (Mixed Lineage Leukemia 5) est impliquée dans divers processus cellulaires dont la progression du cycle cellulaire, l'hématopoïèse adulte et la spermatogenèse. Cette enzyme est responsable de l'ajout de groupements méthyles sur la lysine 4 de l'histone H3 : marque activatrice permettant le relâchement de la chromatine et la transcription (Zhang et al. 2017b). La O-GlcNAcylation de MLL5 assurerait sa stabilité en inhibant la dégradation protéasomale (Ding et al. 2015). Dans ce sens, l'extinction de l'OGT dans les cellules HeLa diminue l'expression protéique de MLL5 mais ne change pas les niveaux de transcrits. De plus, la coexpression de l'OGT et de MLL5 dans les cellules HEK293T conduit à une baisse de l'ubiquitination de l'histone méthyltransférase.

### iii. L'OGT régule les protéines du groupe Polycomb :

Plusieurs études ont également montré que la O-GlcNAcylation régule directement ou indirectement divers membres de la famille Polycomb. Ces facteurs épigénétiques appartiennent à un groupe diversifié et conservé de protéines contrôlant la transcription de

nombreux gènes cibles. La régulation des protéines Polycomb par *O*-GlcNAcylation a fait l'objet d'une revue parue en 2019 que je signe en premier auteur (Decourcelle et al. 2019) (**Annexe 1**) et dont vous trouverez un résumé ci-après. D'autres travaux parus après cette publication seront également abordés dans cette partie.

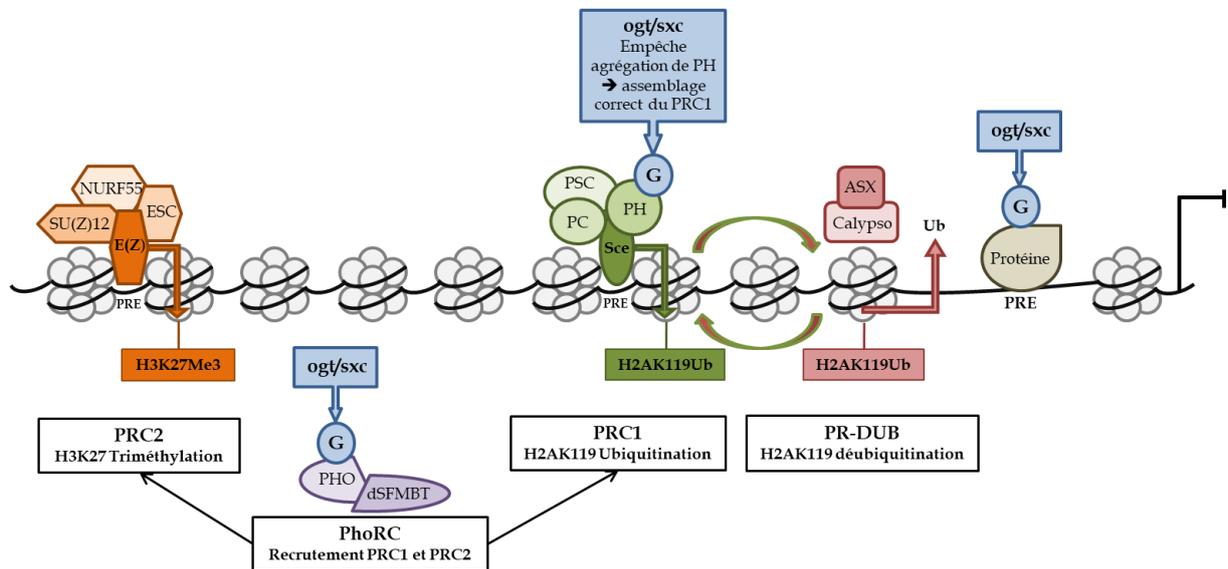
### [Les protéines Polycomb sont régulées par \*O\*-GlcNAcylation chez la drosophile :](#)

Initialement découvertes chez la drosophile et caractérisées comme des répresseurs des gènes homéotiques, les protéines Polycomb sont regroupées en cinq complexes chez cet insecte : PhoRC, PR-DUB, dRAF, PRC1 et PRC2 (**Figure 39**). Avec une composition qui lui est propre, chaque complexe modifie différemment la chromatine. Le complexe PRC1 est constitué de PH, PSC, PC et Sce qui a une activité d'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119Ub) (**Figure 39**). Cette marque épigénétique répressive peut être hydrolysée par le complexe PR-DUB lui-même composé de Calypso et ASX (**Figure 39**). L'association de NURF55, SU(Z)12, ESC et E(Z) mène à la formation du complexe PRC2. E(Z) est l'enzyme responsable de la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27Me3) (**Figure 39**). Concernant PhoRC, il permet le recrutement des complexes PRC1 et PRC2 au niveau de leurs gènes cibles et il inclut PHO et dSFMBT (**Figure 39**). Enfin, le dernier complexe, dRAF, est composé de dRING, PSC responsable de la compaction de la chromatine et dKDM2 qui peut entre autres ubiquitinyler H2AK119.

De manière intéressante, deux études indépendantes ont montré que la *O*-GlcNAc transférase était codée chez la drosophile par le gène *sxc* (super sex combs) (Gambetta et al. 2009; Sinclair et al. 2009), un gène caractérisé bien plus tôt comme appartenant à la famille Polycomb (Ingham 1984). Par ailleurs, des expériences de ChIP-seq dans des cellules de disque imaginal de larve de drosophile ont révélé de nombreux sites occupés par des protéines *O*-GlcNAcylées (Gambetta et al. 2009). Parmi ces sites, environ la moitié d'entre eux co-localisent avec des éléments de réponse aux Polycomb (PRE) (les séquences d'ADN spécifiquement reconnues par les protéines Polycomb sur les promoteurs de leurs gènes cibles) suggérant le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation de la répression médiée par les protéines Polycomb.

Par ailleurs, il a été montré que PH (Polyhomeotic) est *O*-GlcNAcylée régulant ainsi l'interaction de la protéine avec l'ADN (Gambetta et al. 2009). De plus, cette modification empêche l'auto-agrégation de PH et est requise pour l'assemblage correct du complexe PRC1 (**Figure 39**) (Gambetta and Müller 2014). Il a également été démontré que PHO est *O*-

GlcNAcylée mais le rôle de cette modification sur les propriétés de la protéine est encore peu compris (**Figure 39**) (Liu et al. 2017a). Néanmoins, la O-GlcNAcylation de PHO ne semble pas modifier le recrutement de la protéine à l'ADN (Gambetta et al. 2009).



**Figure 39 : La O-GlcNAcylation régule les propriétés des protéines Polycomb chez la drosophile.** Chez la *drosophile*, les protéines Polycomb se regroupent en plusieurs complexes dont : PRC1, PRC2, PhoRC et PR-DUB. Chaque complexe se distingue par une composition et des mécanismes de modifications de la chromatine différents. Le complexe PRC1 se compose de PSC, PC, PH et Sce et catalyse l'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A. Cette marque épigénétique répressive peut être hydrolysée par le complexe PR-DUB formé de Calypso et ASX. L'association de NURF55, SU(Z)12, ESC et E(Z) forme le complexe PRC2 qui catalyse la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 via sa sous-unité catalytique : E(Z). Concernant PhoRC, il est formé de PHO et dSFMBT et participe au recrutement des complexes PRC1 et PRC2 au niveau de leurs gènes cibles. Deux protéines Polycomb sont O-GlcNAcylées chez la *drosophile* : PHO et PH. Le rôle de la O-GlcNAcylation de PHO est à ce jour encore peu compris. Quant à la O-GlcNAcylation de PH, elle empêche l'auto-agrégation de la protéine et permet l'assemblage correct du complexe PRC1. G : O-GlcNAcylation – Ub : Ubiquitination.

## Les protéines Polycomb sont régulées par O-GlcNAcylation chez les mammifères :

De nombreux orthologues des protéines Polycomb ont été identifiés chez différents organismes prouvant leur conservation au cours de l'évolution. Chez les mammifères, ces protéines s'associent en quatre complexes (**Figures 7 et 40**) dont l'organisation s'avère plus sophistiquée que chez la *drosophile*. Dans ce sens, il existe deux complexes PRC1 : un complexe canonique (cPRC1) et un autre non canonique (ncPRC1). Ces derniers partagent le même cœur protéique composé d'une protéine RING (RING1A ou RING1B) qui est responsable de l'ajout de la marque H2AK119Ub et d'une des six protéines PCGF (PCGF1-PCGF6) (**Figures 7 et 40**). La marque répressive H2AK119Ub peut être hydrolysée par le complexe PR-DUB formé de l'association de BAP1 et ASXL (ASXL1 ou ASXL2) (**Figures 7 et**

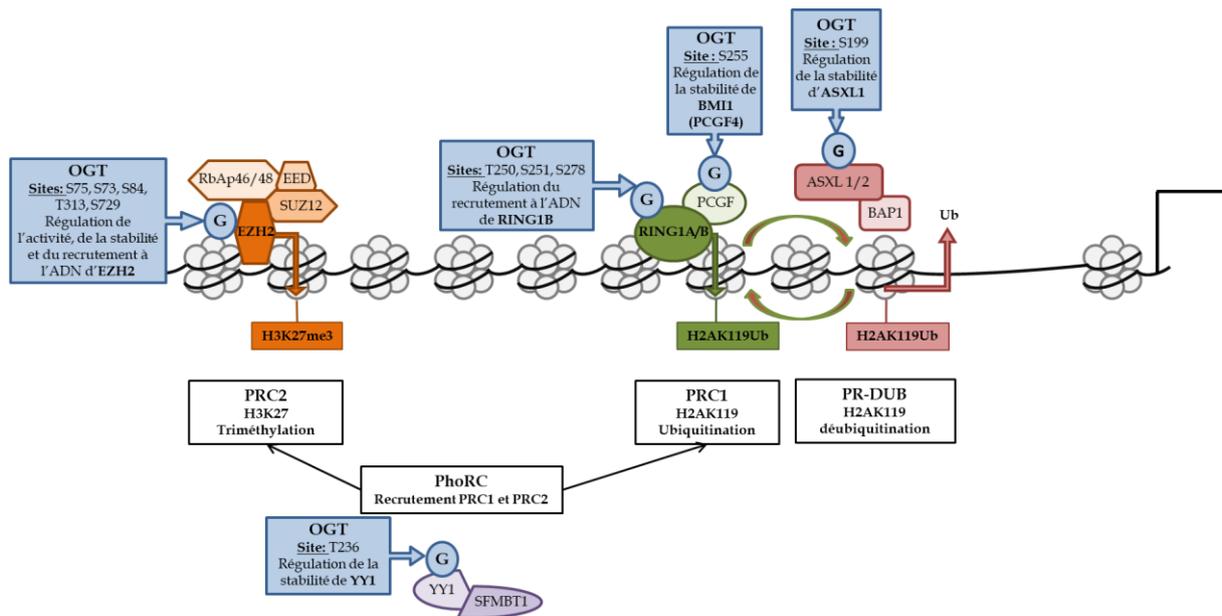
40). Les protéines RbAp46/48, EED, SUZ12 et EZH2 forment le cœur protéique du complexe PRC2. L'association de différentes sous-unités accessoires définit deux types de complexes PRC2 : le PRC2.1 et le PRC2.2 (**Figures 7, 9 et 40**). Le complexe PhoRC inclut quant à lui YY1 et SFMBT1 et permet le recrutement des complexes PRC1 et PRC2 sur leurs gènes cibles (**Figures 7 et 40**).

Des analyses protéomiques récentes, effectuées dans des cellules HeLa, ont démontré que l'OGT interagit avec différents membres du groupe Polycomb : EZH2, EED, SUZ12, RING1B, CBX2, PCGF1, BMI1, BAP1 et ASXL1 (Gao et al. 2018). Des expériences de ChIP-seq dans la lignée cancéreuse colique HT29 ont également montré l'enrichissement concomitant de protéines *O*-GlcNAcylées et de la marque H3K27Me3 sur la région promotrice de plusieurs gènes (Guo et al. 2017). De plus, des expériences de ChIP, réalisées dans des cellules cancéreuses mammaires, ont révélé que la région promotrice de seize gènes suppresseurs de tumeurs est fixée par l'OGT et enrichie en EZH2 et H3K27Me3 de manière OGT-dépendante (Chu et al. 2014). Toutes ces données suggèrent donc que la *O*-GlcNAcylation est aussi un important régulateur des fonctions des protéines Polycomb chez les mammifères.

Parmi les protéines interagissant avec l'OGT, cinq sont modifiées par *O*-GlcNAcylation chez l'Homme : YY1, ASXL1, BMI1, RING1B et EZH2. La *O*-GlcNAcylation de **YY1** a d'abord été décrite dans des cellules musculaires mais la potentielle influence de cette modification sur le recrutement des complexes PRC1 et PRC2 n'a pas été étudiée (Hiromura et al. 2003). La régulation de l'expression et de la stabilité de YY1 par *O*-GlcNAcylation a récemment été rapportée dans un contexte de cancer colorectal (Zhu et al. 2019). L'inhibition de l'OGA (PUGNAC) dans les cellules LoVo et HCT116 (lignées cancéreuses coliques) augmente l'expression protéique de YY1 mais ne change pas les niveaux d'ARNm. En réalisant des tests d'activité promotrice, les auteurs ont aussi montré que le PUGNAC augmente l'activité des promoteurs de *SLC22A15* ou *AANAT*, deux oncoprotéines régulées par YY1. Ces travaux ont également mis en évidence que la thréonine 236 représenterait le site majeur de *O*-GlcNAcylation de YY1. Concernant **ASXL1**, sa stabilité serait en partie contrôlée par sa *O*-GlcNAcylation sur la sérine 199 (Inoue et al. 2018). Par ailleurs, il a été mis en évidence que la *O*-GlcNAcylation de **BMI1** sur la sérine 255 empêcherait sa dégradation protéasomale dans des cellules cancéreuses de la prostate (Li et al. 2017c). Chai et ses collaborateurs ont quant à eux analysé la relation entre l'OGT et BMI1

dans un contexte de cancer colorectal (Chai et al. 2018). En ciblant l'OGT, miR-485-5p peut inhiber la O-GlcNAcylation de BMI1 et réguler sa stabilité. Dans ce sens, il a été montré que la transfection d'un siOGT dans les cellules HCT116 diminue l'expression de BMI1 alors que le traitement avec un inhibiteur de miR-485-5p l'augmente. Cette hausse est en partie empêchée lors de l'extinction de l'OGT. Aussi, le traitement de cellules HCT116 avec un inhibiteur de miR-485-5p permet l'augmentation de l'expression de l'OGT et de la O-GlcNAcylation de BMI1. Quant à **RING1B**, cette protéine est O-GlcNAcylée sur les résidus Thr250, Ser251 et Ser278 dans des cellules souches embryonnaires humaines (Maury et al. 2015). La O-GlcNAcylation de cette protéine pourrait réguler son recrutement à l'ADN et le ciblage du complexe PRC1 à des locis spécifiques. En effet, la forme non modifiée de RING1B se fixerait préférentiellement sur des gènes en lien avec le métabolisme et le cycle cellulaire alors que la forme O-GlcNAcylée serait retrouvée sur la région promotrice de gènes en rapport avec la différenciation neuronale.

La O-GlcNAcylation d'**EZH2** est un peu plus documentée mais ses rôles semblent multiples. Cette modification de la sous-unité catalytique du complexe PRC2 a été décrite pour la première fois dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 (Chu et al. 2014). Dans ces travaux, les auteurs ont démontré que la O-GlcNAcylation de la sérine 75 d'EZH2 régula sa stabilité. En analysant la construction FLAG-EZH2 dans des cellules HEK293T par spectrométrie de masse, la même équipe a identifié plus récemment quatre résidus supplémentaires d'EZH2 modifiés par O-GlcNAcylation : Ser73, Ser84, Thr313 et Ser729 (Lo et al. 2018a). La construction de mutants « non GlcNAcylables » a permis de montrer que la O-GlcNAcylation dans la région N-terminale d'EZH2 (Ser73, Ser84, Thr313) régula sa stabilité alors que la modification de la sérine 729, située dans le domaine C-terminal, contrôlait son activité catalytique. Si plusieurs études ont confirmé le rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation de la stabilité et de l'activité d'EZH2 (Inoue et al. 2018; Jiang et al. 2018; Butler et al. 2019), d'autres travaux proposent que cette modification puisse contrôler le recrutement de cette histone méthyltransférase sur certains de ses gènes cibles tels que *FOXC1* (Forma et al. 2018).



**Figure 40 : La O-GlcNAcylation régule les propriétés des protéines Polycomb chez l'Homme.**

Chez l'Homme, les protéines Polycomb se regroupent en quatre complexes : PRC1, PRC2, PhoRC et PR-DUB. La composition de ses complexes et leurs mécanismes de modifications de la chromatine diffèrent. Le cœur protéique du complexe PRC1 est composé d'une protéine RING (RING1A ou RING1B), qui porte l'activité d'ubiquitination de la lysine 119 de l'histone H2A, et une des six protéines PCGF (PCGF1-6). Le complexe PR-DUB, qui hydrolyse la marque H2AK119Ub, est formé de BAP1 et d'ASXL1 ou ASXL2. L'association de RbAp46/48, EED, SUZ12 et EZH2 mène à la formation du cœur protéique du complexe PRC2. EZH2 représente la sous-unité catalytique de ce complexe et est responsable de l'ajout de la marque H3K27Me3. Enfin, le complexe PhoRC inclut YY1 et SFMBT1. Comme chez la drosophile, l'OGT interagit avec plusieurs protéines Polycomb humaines et les modifie régulant ainsi leurs fonctions. YY1, BMI1 et ASXL1 présentent chacune un résidu modifié par O-GlcNAcylation. Cette modification permet de moduler leur stabilité. Le recrutement à l'ADN de RING1B est contrôlé par la O-GlcNAcylation de trois sites. Enfin, les rôles de la O-GlcNAcylation d'EZH2 semblent variés. Certains travaux soutiennent le fait que cette modification régule la stabilité et l'activité de l'histone méthyltransférase alors que d'autres émettent l'hypothèse d'un contrôle de son recrutement à l'ADN. G : O-GlcNAcylation – Ub : Ubiquitination.

Comme nous venons de le décrire, la O-GlcNAcylation peut réguler directement les propriétés des protéines Polycomb en les modifiant. Cependant, bien que cela n'ait pas été démontré à ce jour, la O-GlcNAcylation pourrait aussi jouer un rôle plus indirect dans la régulation des protéines Polycomb *via* notamment la modification de facteurs régulant l'expression de ces protéines. Par exemple, deux protéines impliquées dans le contrôle de la transcription d'EZH2 sont O-GlcNAcylées : c-myc et E2F (Bracken et al. 2003; Koh et al. 2011; Wells et al. 2011; Itkonen et al. 2013). De la même manière, certains partenaires des protéines Polycomb, agissant dans le recrutement de ces protéines au niveau de leurs gènes cibles, peuvent être O-GlcNAcylés. C'est le cas par exemple de HIC1, un répresseur transcriptionnel impliqué dans le ciblage du complexe PRC2 à des locis spécifiques (Lefebvre et al. 2004b; Boulay et al. 2012). Nous pouvons donc imaginer que cette modification puisse moduler

l'interaction entre les complexes Polycomb et leurs divers partenaires même si cela n'a pas été démontré à ce jour.

Comme nous venons de le voir, la *O*-GlcNAcylation régule les propriétés protéiques d'une pléthore de cibles et est impliquée dans de nombreux processus cellulaires. Il est donc aisé d'admettre que la dérégulation de son homéostasie mène à l'apparition de différentes pathologies dont les cancers.

## VII. *O*-GlcNAcylation et CCR :

Les niveaux globaux de *O*-GlcNAcylation sont perturbés dans divers cancers tels que : la thyroïde, le sein, le foie, la prostate, le poumon, le pancréas et le colon (Chaiyawat et al. 2014; de Queiroz et al. 2014; Ferrer et al. 2016; Trinca and Hagan 2018). La *O*-GlcNAcylation module les propriétés de milliers de protéines dont des oncogènes (Makwana et al. 2019) tels que la  $\beta$ -caténine (Olivier-Van Stichelen et al. 2014b) et des gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53 (Yang et al. 2006) ou encore HIC1 (Lefebvre et al. 2004b). En régulant des facteurs impliqués dans la tumorigenèse, la *O*-GlcNAcylation participe à la transformation maligne des cellules et à la régulation de nombreuses « hallmarks » du cancer dont : la prolifération des cellules cancéreuses et leur survie, l'invasion, la formation de métastases, la résistance à l'apoptose ou encore l'angiogenèse (Ma and Vosseller 2014; Ferrer et al. 2016). La suite de mon propos se focalisera principalement sur les travaux réalisés dans un contexte de cancer colorectal.

### 1) Altération de l'homéostasie de *O*-GlcNAcylation et régulation des propriétés des cellules cancéreuses coliques :

#### 1. Dérégulation de l'expression de l'OGT et des niveaux de *O*-GlcNAcylation :

Plusieurs études ont rapporté une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation corrélée à une hausse de l'expression de l'OGT dans des tissus cancéreux coliques en comparaison aux tissus sains adjacents (**Figure 41**) (Mi et al. 2011; Phueaouan et al. 2013; Olivier-Van Stichelen et al. 2014b; Wu et al. 2019b; Yu et al. 2019). Cependant, il est aussi aisé d'admettre que cette hausse puisse être la conséquence de l'augmentation de la disponibilité en UDP-GlcNAc ou de la dérégulation des enzymes de la voie de biosynthèse des

hexosamines. Dans ce sens, les niveaux protéiques de GFAT1 et GFAT2 sont augmentés dans des tissus cancéreux coliques en comparaison aux tissus sains adjacents (**Figure 41**) (Vasconcelos-Dos-Santos et al. 2017). Concernant l'expression de l'OGA, elle ne semble pas varier lors des processus de tumorigenèse colique (Mi et al. 2011; Phueaouan et al. 2013). L'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation corrélée à la hausse de l'expression de l'OGT représenteraient des facteurs de mauvais pronostic. En effet, les patients atteints d'un CCR présentant des hauts niveaux de O-GlcNAcylation ou une forte expression de l'OGT ont une survie globale plus courte (Jiang et al. 2018; Wu et al. 2019b; Xu et al. 2019a).

A ce jour, aucune mutation de l'OGT n'a été reportée dans le CCR et les raisons de l'augmentation de son expression sont encore peu comprises. Cependant, comme nous avons pu le voir précédemment, l'expression de l'OGT est régulée à de multiples niveaux (**Figure 24**) et en partie de manière post-transcriptionnelle. Dans ce sens, une étude a mis en exergue un lien entre un lncRNA récemment identifié, RHPN1-AS1 (Rhopilin Rho GTPase binding protein 1 antisense RNA 1), miR-7-5p et l'OGT dans des cellules cancéreuses coliques (**Figure 41**) (Zheng et al. 2020). RHPN1-AS1 modulerait l'expression de la O-GlcNAc transférase en agissant comme une éponge vis-à-vis de miR-7-5p. En effet, l'expression de RHPN1-AS1 augmente dans les cellules HT29, HCT116, SW620 et SW480 en comparaison avec la lignée colique normale FHC et à l'inverse l'expression de miR-7-5p diminue dans ces lignées. Les auteurs ont également démontré que RHPN1-AS1 interagit avec miR-7-5p et inhibe son expression. De plus, la transfection d'un mimétique de miR-7-5p ou l'extinction de RHPN1-AS1 diminuent l'expression de l'OGT.

miR-101 est un autre exemple d'ARN non codant impliqué dans la régulation de l'expression de l'OGT (**Figure 41**) (Jiang et al. 2018). En effet, la cotransfection de l'OGT et de miR-101 dans les cellules SW480 diminue l'expression de l'OGT. Cette baisse est empêchée par la mutation de l'OGT au niveau de la séquence cible du miR-101. L'expression de miR-101 est diminuée dans les tissus cancéreux coliques en comparaison aux tissus sains adjacents (Chen et al. 2017b). La dérégulation de ce miRNA pourrait donc être à l'origine des variations d'expression de l'OGT dans le CCR.

## 2. La O-GlcNAcylation régule de nombreuses « hallmarks » du CCR :

L'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation a été retrouvée *in vitro* dans de nombreuses lignées cancéreuses coliques (HT29, HCT116, LoVo, SW480, SW620) en

comparaison à des lignées cellulaires intestinales normales (HCoEpiC ou NCM460) ou à une lignée cellulaire fœtale colique normale (CCD841CoN) (Steenackers et al. 2016; Jiang et al. 2018; Wu et al. 2019b). Plusieurs études ont aussi étudié l'impact des modulations des niveaux de *O*-GlcNAcylation sur les propriétés des cellules cancéreuses coliques *in vitro* et *in vivo*.

Il a été montré que l'abolition de l'expression de l'OGT diminue la prolifération de plusieurs lignées cancéreuses coliques : HT29, HCT116 et SW480 (Steenackers et al. 2016; Wu et al. 2019b; Xu et al. 2019a). La capacité des cellules HT29, HCT116 et SW480 à former des colonies baisse également dans ces conditions (Mi et al. 2011; Steenackers et al. 2016; Wu et al. 2019b). A l'inverse, elle est augmentée lors du traitement des cellules HT29 avec un inhibiteur de l'OGA (Mi et al. 2011). En ce qui concerne la migration et l'invasion, l'extinction de l'OGT diminue ces deux propriétés dans les cellules HT29, SW620 et SW480 (Steenackers et al. 2016; Jiang et al. 2018; Wu et al. 2019b). Les cellules HCT116-shOGT et SW620-shOGT présentent aussi une baisse de leur capacité d'invasion (Jiang et al. 2018; Xu et al. 2019a). A l'inverse, le traitement des cellules SW480 avec un inhibiteur de l'OGA ou la surexpression de l'OGT conduisent à une augmentation des propriétés d'invasion et de migration (Jiang et al. 2018).

Le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation de ces différentes propriétés a également été étudié *in vivo*. Les souris ayant reçu une injection de cellules cancéreuses coliques murines dans lesquelles l'expression de l'OGT est abolie (CT26-shOGT) présentent des tumeurs d'un diamètre plus faible comparativement aux animaux contrôles. Ces souris possèdent également moins de métastases et ont un taux de mortalité inférieur (Harosh-Davidovich and Khalaila 2018). Wu et ses collaborateurs ont aussi démontré que l'injection de cellules SW480-shOGT conduit au développement de tumeurs présentant un volume plus faible en comparaison au groupe contrôle (Wu et al. 2019b). Le nombre de nodules métastatiques dans le foie et les poumons est également moindre lors de l'injection de cellules SW620-shOGT alors qu'il augmente lors de la surexpression de la *O*-GlcNAc transférase (Jiang et al. 2018). Enfin, si la xenogreffe de cellules HCT116 mène à la formation de tumeurs chez des souris immunodéprimées, le pré-traitement de ces cellules cancéreuses coliques avec un inhibiteur de l'OGT inhibe la croissance tumorale (Shimizu and Tanaka 2019).

### 2) Régulation par O-GlcNAcylation de protéines impliquées dans les propriétés des cellules cancéreuses coliques :

L'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation conduit à la modification de l'expression de nombreux gènes et module donc les propriétés des cellules cancéreuses. Dans ce sens, une analyse par puces à ADN a permis de révéler un changement d'expression de 1300 gènes dans des cellules SW620 dans lesquelles l'OGA a été abolie par siRNA. Parmi ces gènes, certains sont notamment impliqués dans la migration, la croissance, la prolifération et la mort cellulaire (Yehezkel et al. 2012). D'autres travaux ont démontré plus directement le rôle de la O-GlcNAcylation dans la régulation de protéines impliquées dans le CCR. Cinq exemples vont être décrits : la  $\beta$ -caténine, ITGA5, DDX5, NF- $\kappa$ B et p53.

#### 1. O-GlcNAcylation et $\beta$ -caténine :

Il est très fréquent que les altérations de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine initient les processus de cancérisation colique (**Figure 1**). Les mutations génétiques touchent notamment la boîte de destruction de la  $\beta$ -caténine qui n'est plus prise en charge par le protéasome. La voie de signalisation est alors activée en permanence conduisant finalement à une prolifération anarchique des cellules cancéreuses coliques (**Figure 2**). L'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation dans le CCR pourrait contribuer à stabiliser la  $\beta$ -caténine de manière anormale et participerait également à l'activation constitutive de cette voie. Dans ce sens, Olivier-Van Stichelen et ses collaborateurs ont montré une augmentation de l'expression de la  $\beta$ -caténine corrélée à une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation dans des tissus cancéreux coliques comparativement aux tissus sains adjacents (Olivier-Van Stichelen et al. 2014b). De plus, cette hausse d'expression de la  $\beta$ -caténine a également été retrouvée *in vivo* dans deux modèles murins présentant une hausse des niveaux de O-GlcNAcylation colique : le premier consistant à nourrir des souris avec un régime riche en sucres et le second à injecter de manière intra-péritonéale du Thiamet-G. Des analyses par spectrométrie de masse ont permis d'identifier quatre sites de O-GlcNAcylation sur la  $\beta$ -caténine dans les cellules HT29 : Ser23, Thr40, Thr41, et Thr112. L'exposition de cellules cancéreuses coliques à une forte concentration de glucose diminue la phosphorylation de la thréonine 41 de la  $\beta$ -caténine, modification régulant sa dégradation protéasomale. De plus, le mutant T41A est plus stable et moins ubiquitinylé en comparaison à la  $\beta$ -caténine WT (**Figure 41**). Par ailleurs, les variations des niveaux de O-GlcNAcylation perturbent aussi l'interaction entre la  $\beta$ -

caténine et l' $\alpha$ -caténine. Dans ce sens, l'inhibition pharmacologique de l'OGT ou l'abolition de son expression diminue cette interaction.

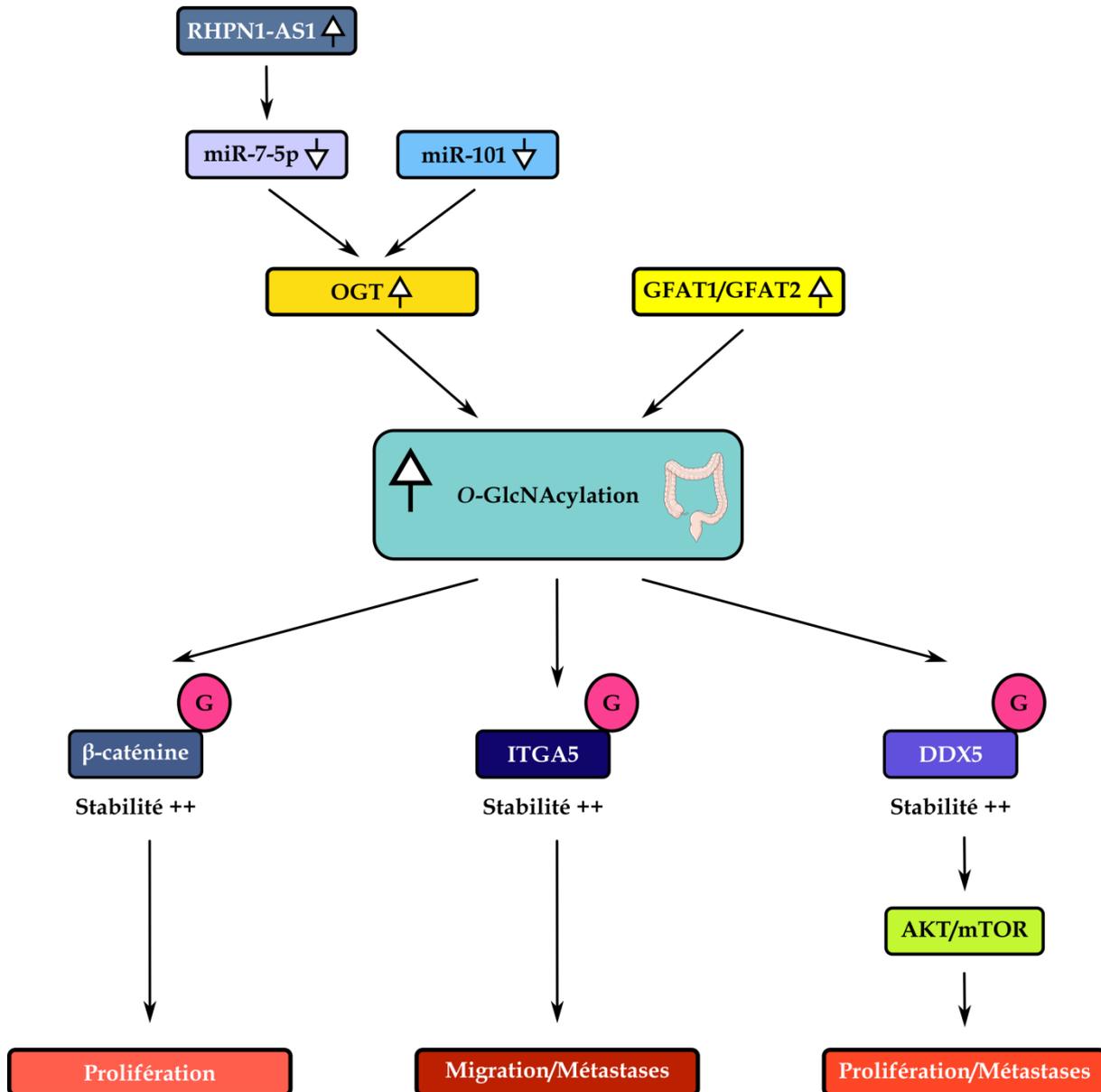
### 2. O-GlcNAcylation et ITGA5 :

L'intégrine  $\alpha 5$  (ITGA5) fait partie des protéines transmembranaires de la famille des intégrines. Elle est impliquée dans la communication cellules/cellules ou cellules/matrice extracellulaire et peut ainsi promouvoir la migration et la formation de métastases. Dans ce sens, l'expression d'ITGA5 augmente dans des tissus cancéreux coliques en comparaison aux tissus sains adjacents (Yu et al. 2019). *In vivo*, l'injection de cellules SW620-shITGA5 ou de cellules RKO surexprimant l'intégrine  $\alpha 5$  mène respectivement à une baisse et à une hausse du poids des tumeurs suggérant son rôle dans les processus de cancérisation. *In vitro*, l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation à l'aide d'un inhibiteur de l'OGA est corrélée à une hausse de l'expression d'ITGA5 dans les cellules SW620 et RKO. En réalisant des expériences d'immunoprécipitation et de marquages enzymatiques, les auteurs ont montré que l'intégrine  $\alpha 5$  est O-GlcNAcylée. L'inhibition de l'OGA stabilise ITGA5 alors que l'extinction de l'OGT accélère sa dégradation. En stabilisant l'intégrine  $\alpha 5$ , la O-GlcNAcylation participerait donc à l'augmentation de son expression qui accélère le processus de développement tumoral (**Figure 41**) (Yu et al. 2019).

### 3. O-GlcNAcylation et DDX5 :

DDX5 est une hélicase impliquée dans la régulation de l'expression des gènes à de multiples niveaux : métabolisme des ARN, réplication de l'ADN, biogenèse des miRNA ou encore transcription (Nyamao et al. 2019). Par ailleurs, de plus en plus d'études tendent à montrer que cette protéine contrôle de nombreuses voies impliquées dans la tumorigenèse. Dans ce sens, l'expression de DDX5 augmente dans des tissus cancéreux coliques en comparaison aux tissus sains adjacents (Wu et al. 2019b). L'hélicase DDX5 serait stabilisée par O-GlcNAcylation ce qui participerait au processus de cancérisation colique en activant notamment la voie AKT/mTOR (**Figure 41**) (Wu et al. 2019b). Dans ce sens, l'extinction de l'OGT diminue l'expression de DDX5 alors que l'inhibition pharmacologique de l'OGA augmente la stabilité de l'hélicase. *In vivo*, l'injection de cellules SW480-shOGT mène à la formation de tumeurs d'un volume plus faible par rapport au groupe contrôle. En revanche, la surexpression concomitante de DDX5 conduit au développement de tumeurs d'un volume comparable à celui du groupe contrôle. D'un point de vue mécanistique, l'extinction de l'OGT et de DDX5 diminue la phosphorylation de mTOR et d'AKT signe d'une baisse de

leur activité. Enfin, l'inhibition de la prolifération cellulaire induite par le shDDX5 est en partie empêchée par le traitement concomitant avec un agoniste de mTOR.

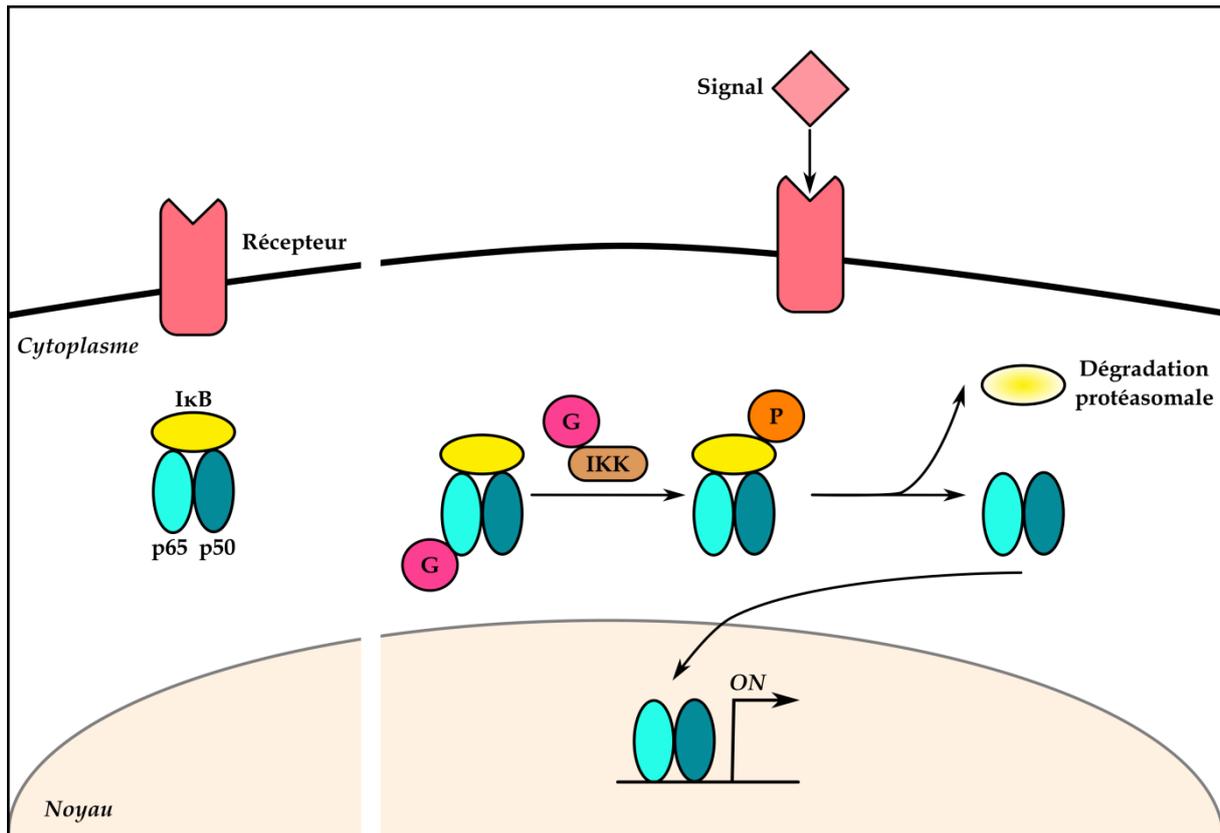


**Figure 41:** L'altération de l'homéostasie de O-GlcNAcylation module les propriétés de nombreuses protéines impliquées dans la tumorigenèse colique.

La hausse de l'expression de la GFAT1/2 ou de l'OGT est à l'origine d'une augmentation des niveaux globaux de O-GlcNAcylation dans le CCR. L'expression anormale de l'OGT peut s'expliquer par l'altération d'ARN non codants (RHPN1-AS1/miR-7-5p/miR-101) régulant de manière post-transcriptionnelle l'expression de la O-GlcNAc transférase. La hausse des niveaux de O-GlcNAcylation promeut la stabilité de nombreuses protéines dont la β-caténine, ITGA5 et DDX5 impliquées dans certaines « hallmarks » du cancer. G : O-GlcNAcylation.

### 4. O-GlcNAcylation et NF- $\kappa$ B :

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription impliqué notamment dans la prolifération, la survie, l'apoptose, l'angiogenèse et la formation de métastases. NF- $\kappa$ B est un complexe homo- ou hétéro-dimérique formé de différentes sous-unités dont les plus connues sont p65 et p50. En l'absence de signal, ce dimère reste localisé dans le cytoplasme où il interagit avec I $\kappa$ B. Sous l'impulsion d'un stimulus, la kinase IKK phosphoryle la protéine I $\kappa$ B qui est ensuite ubiquitinée. La dégradation de cet inhibiteur permet ainsi la translocation nucléaire du dimère p65/p50 qui peut alors activer la transcription de ses gènes cibles (**Figure 42**). Le rôle de la O-GlcNAcylation de NF- $\kappa$ B et des acteurs de cette voie n'a pas été étudié dans un contexte de cancer colorectal. Toutefois, au vu de l'importance du rôle de NF- $\kappa$ B dans les processus de cancérisation colique (Soleimani et al. 2020), il est intéressant de citer les travaux effectués dans d'autres modèles. Comme nous avons pu l'évoquer précédemment, la O-GlcNAcylation de NF- $\kappa$ B (**Figure 42**) régulerait son activité transcriptionnelle (Ali et al. 2017) et sa localisation cellulaire (Phoomak et al. 2016) respectivement dans des cellules cancéreuses du col de l'utérus et dans un contexte de cholangiocarcinome. Par ailleurs, la O-GlcNAcylation d'IKK $\beta$  régulerait son activité (**Figure 42**) (Kawauchi et al. 2009). Le traitement de cellules cancéreuses hépatiques, HepG2, avec une forte concentration de glucose augmente la O-GlcNAcylation d'IKK $\beta$ . Par des expériences de mutagenèse, il a été montré qu'IKK $\beta$  est O-GlcNAcylée sur la sérine 733, résidu pouvant également porter une phosphorylation inactivatrice. Dans le même sens, l'inhibition pharmacologique de l'OGA augmente la phosphorylation de la sérine 181 d'IKK, modification essentielle pour son activation. Finalement, l'ensemble de ces travaux laisse à penser que l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation pourrait également conduire à une activation constitutive de la voie NF- $\kappa$ B et donc à des effets pro-tumoraux dans un contexte de CCR.



**Figure 42 : Acteurs de la voie de signalisation NF-κB modifiés par O-GlcNAcylation.**

En l'absence de signal, IκB interagit avec le dimère p65/p50 qui reste alors dans le cytoplasme. Sous l'impulsion d'un stimulus, la protéine IκB est phosphorylée par la kinase IKK puis ubiquitinée. La dégradation de cet inhibiteur permet la translocation nucléaire du dimère p65/p50 et par conséquent la transcription des gènes cibles de la voie de signalisation. Une des sous-unités de NF-κB, p65, est modifiée par O-GlcNAcylation. Cette modification permet de réguler son activité transcriptionnelle et sa localisation nucléaire. La O-GlcNAcylation d'IKK permet aussi de moduler son activité. G : O-GlcNAcylation - P : Phosphorylation.

### 5. O-GlcNAcylation et p53 :

Bien que ces travaux n'aient pas été menés dans un contexte de cancer colorectal, il est toutefois intéressant de les citer ici au vu de l'implication de p53 dans les processus de tumorigenèse colique (**Figures 1 et 4**). La O-GlcNAcylation de la sérine 149 de p53 stabiliserait le gène suppresseur de tumeurs en empêchant sa phosphorylation sur une thréonine voisine (Yang et al. 2006). L'inhibition pharmacologique de l'OGA dans des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 augmente l'expression de p53 et diminue son ubiquitination. Inversement, la mutation S149A diminue l'expression de p53 et augmente sa phosphorylation sur la thréonine 155, modification connue pour son implication dans l'ubiquitination et la dégradation du gène suppresseur de tumeurs. Au vu de ces résultats, nous pourrions imaginer que l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation dans les tissus cancéreux coliques promouvrait la stabilisation de p53 et conduirait par conséquent à

des effets anti-tumoraux. Cependant, p53 est fréquemment muté dans de nombreux cancers dont le CCR. Notamment, la sérine 149 de p53 pourrait être substituée en proline ou en phénylalanine (données issues de : « IARC TP53 Database » accessible à l'adresse suivante <http://www-p53.iarc.fr/>). Ces mutations rendent donc peu probable la O-GlcNAcylation de la sérine 149 de p53 et empêcheraient finalement sa stabilisation et ses effets anti-tumoraux.

# **Travaux personnels**

## **Partie I :**

**La *O*-GlcNAcylation connecte  
la nutrition à la répression  
épigénétique d'*UNC5A* durant la  
cancérogenèse colique**

# TRAVAUX PERSONNELS :

## Partie I : La O-GlcNAcylation connecte la nutrition à la répression épigénétique d'UNC5A durant la cancérogenèse colique

---

### I. Contexte de l'étude :

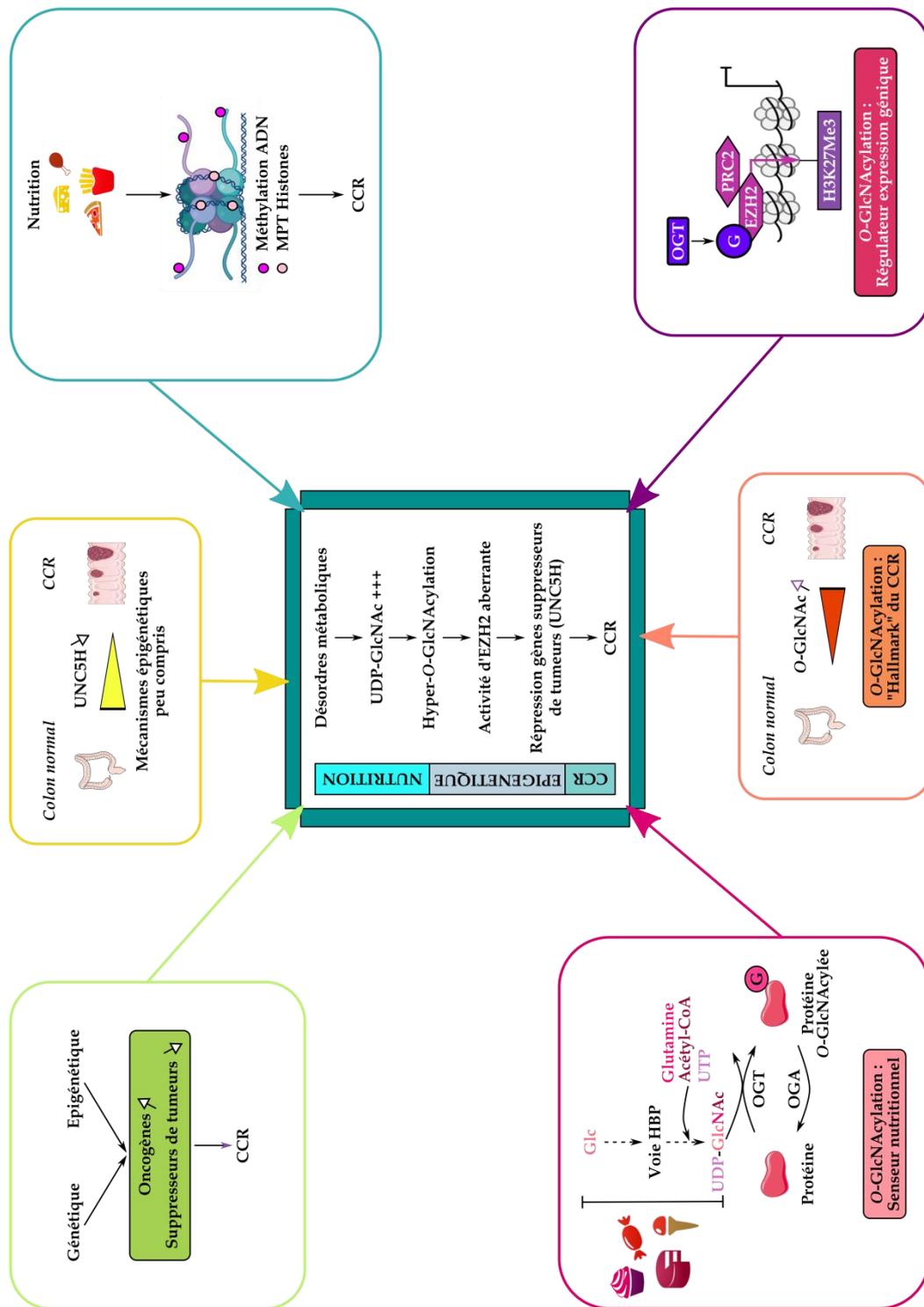
Il est maintenant largement admis que des altérations génétiques contribuent à l'émergence et à la progression du cancer colorectal. Cependant, de plus en plus d'études montrent également l'importance des perturbations épigénétiques dans les processus de cancérisation colique. Ces anomalies peuvent concourir en effet à la surexpression d'oncogènes et à l'extinction de gènes suppresseurs de tumeurs. Comme mentionné dans la partie introductive, les récepteurs à dépendance de la famille *UNC5H* sont des gènes suppresseurs de tumeurs dérégulés dans le cancer colorectal *via* des mécanismes épigénétiques mais les processus moléculaires sous-jacents restent encore peu compris.

Par ailleurs, le nombre de travaux démontrant une relation étroite entre la nutrition, l'épigénétique et le cancer colorectal ne cesse de croître mais là encore, les mécanismes moléculaires restent à éclaircir. De manière intéressante, une hyper-O-GlcNAcylation est retrouvée dans les tissus cancéreux coliques comparativement aux tissus sains adjacents définissant cette modification post-traductionnelle comme une nouvelle « hallmark » du cancer colorectal. De plus, du fait des niveaux de O-GlcNAcylation qui dépendent étroitement de la concentration en UDP-GlcNAc qui elle-même est sensible au statut nutritionnel de l'organisme, cette modification post-traductionnelle est également considérée comme un senseur nutritionnel. Enfin, en modifiant des protéines impliquées dans la régulation épigénétique telles qu'EZH2 (la sous-unité catalytique du complexe PRC2 responsable du dépôt de la marque épigénétique répressive H3K27Me3), l'OGT émerge de plus en plus comme un important régulateur de l'expression génique.

En combinant toutes ces données de la littérature, nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle des désordres nutritionnels, facteurs de risque importants du CCR, pourraient être à l'origine d'une augmentation de la concentration en UDP-GlcNAc qui se traduirait par une hausse des niveaux de O-GlcNAcylation intracellulaire. Cette hyper-O-GlcNAcylation conduirait à une activité aberrante d'EZH2 qui elle-même perturberait l'expression de certains de ses gènes cibles participant ainsi à l'émergence et à la progression du CCR (**Figure 43**). Dans ce contexte, **les objectifs de mes travaux de thèse ont été de déterminer :**

**1°/ l'influence de la nutrition sur la régulation épigénétique des membres de la famille *UNC5H* au cours de la carcinogenèse colique,**

**2°/ si l'axe OGT/EZH2 pouvait en être l'un des relais moléculaires.**



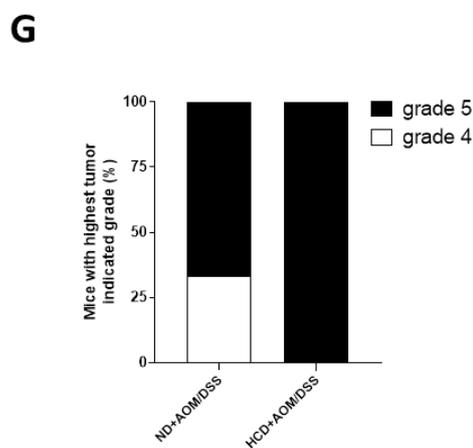
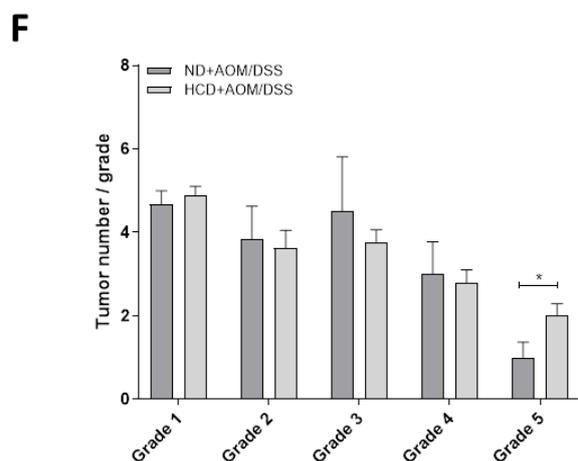
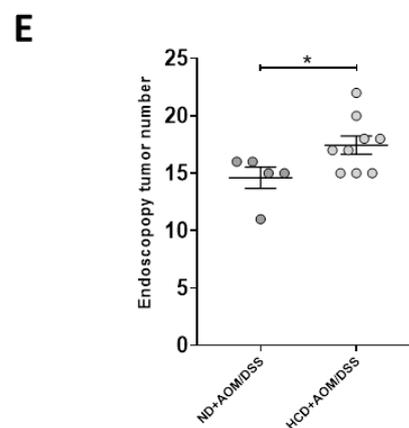
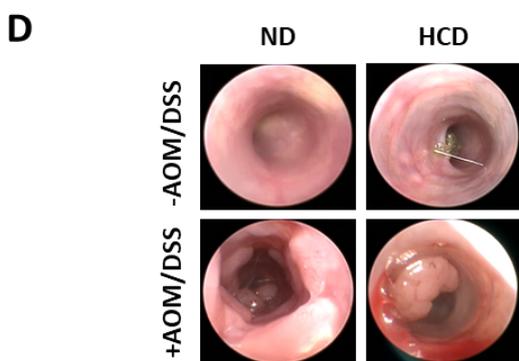
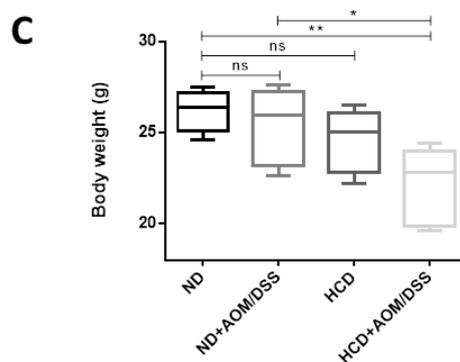
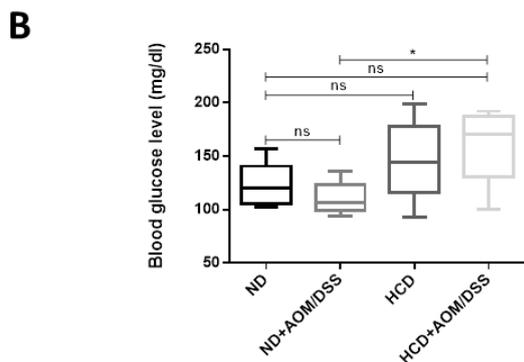
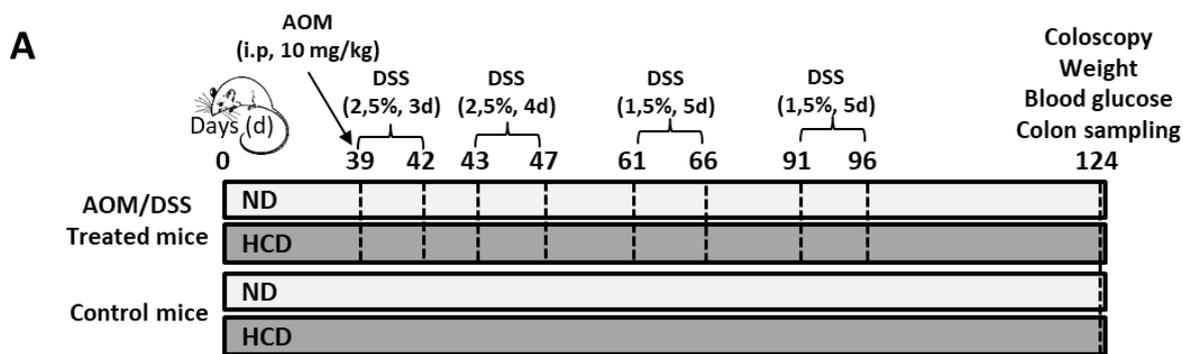
**Figure 43 : Hypothèse de travail.**

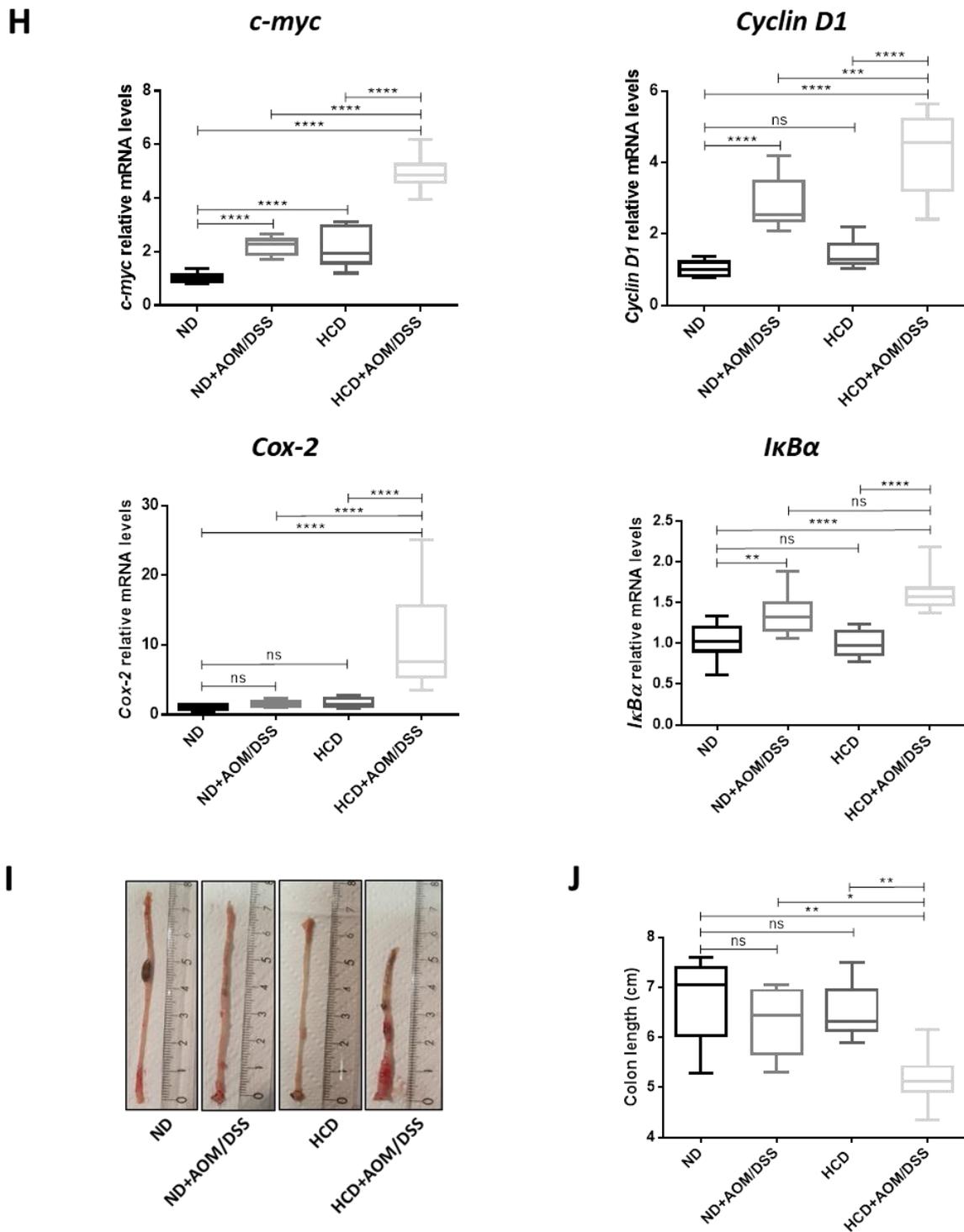
Des altérations génétiques et épigénétiques peuvent être à l'origine de la surexpression d'oncogènes et de l'extinction de gènes suppresseurs de tumeurs participant ainsi à la tumorigenèse colique. Les récepteurs UNC5H figurent parmi les gènes suppresseurs de tumeurs dérégulés épigénétiquement dans le CCR mais les mécanismes moléculaires sont peu compris. Par ailleurs, de plus en plus d'études montrent un lien entre la nutrition, l'épigénétique et le CCR. La O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle considérée comme un senseur nutritionnel et définie comme une nouvelle caractéristique du CCR et un important régulateur épigénétique de l'expression génique. Au vu de ces données de la littérature, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle des désordres nutritionnels responsables d'une augmentation de la concentration en UDP-GlcNAc et d'une hyper-O-GlcNAcylation contribueraient à une activité aberrante du complexe PRC2 perturbant ainsi l'expression de certains de ses gènes cibles encourageant l'émergence et la progression tumorale.

## II. Résultats :

### 1) Le régime HCD aggrave la carcinogénèse colique et provoque une répression d'UNC5A, UNC5B et UNC5C :

Pour tester si la nutrition influence l'expression des récepteurs UNC5H durant la carcinogénèse colique, nous avons soumis des souris C57BL/6Jrj soit à un régime normal (« Normal Diet » ou ND) ou à un régime riche en sucres (« High Carbohydrate Diet » ou HCD). 39 jours après le début des différents régimes, la carcinogénèse colique a été induite en utilisant le modèle AOM (Azoxyméthane)/DSS (Dextran Sodium Sulfate) (**Figure 44A**). Au terme de l'expérience, les souris nourries avec le régime HCD avaient une glycémie qui tendait à augmenter en comparaison aux souris soumises au régime normal (**Figure 44B**). Par ailleurs, aucune différence significative de poids n'a été observée excepté pour le groupe de souris HCD+AOM/DSS (**Figure 44C**). La sévérité de la pathologie peut probablement expliquer la perte de poids chez ces animaux. En effet, nous avons évalué la charge tumorale par endoscopie (**Figure 44D**) et avons montré que les souris nourries avec le régime HCD présentaient davantage de tumeurs que le groupe contrôle (**Figure 44E**). Elles avaient également un nombre de tumeurs de grade 5 plus important (**Figure 44F**) et les tumeurs de cette catégorie ont été retrouvées chez la totalité des individus (**Figure 44G**). Nous avons également examiné l'expression des oncogènes *c-myc* et *Cycline D1*, deux gènes cibles de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine qui est dérégulée dans la grande majorité des CCR, et comme attendu, la quantité d'ARNm coliques de *c-myc* et de la *Cycline D1* augmente en réponse au traitement AOM/DSS chez les souris soumises au régime normal en comparaison avec le groupe contrôle ND (**Figure 44H**). De manière intéressante, une plus forte augmentation de l'expression de ces deux transcrits est retrouvée dans les tumeurs issues des animaux placés sous régime HCD (**Figure 44H**). Une inflammation plus importante, caractérisée par une diminution de la longueur du colon et une activation de la voie NF- $\kappa$ B (augmentation des niveaux de transcrits *Cox-2* et *I $\kappa$ B $\alpha$* ), a également été observée chez les souris HCD+AOM/DSS (**Figure 44 H-I -J**). L'ensemble de ces résultats montre donc que **le régime HCD aggrave les processus de cancérogenèse colique dans le modèle AOM/DSS.**



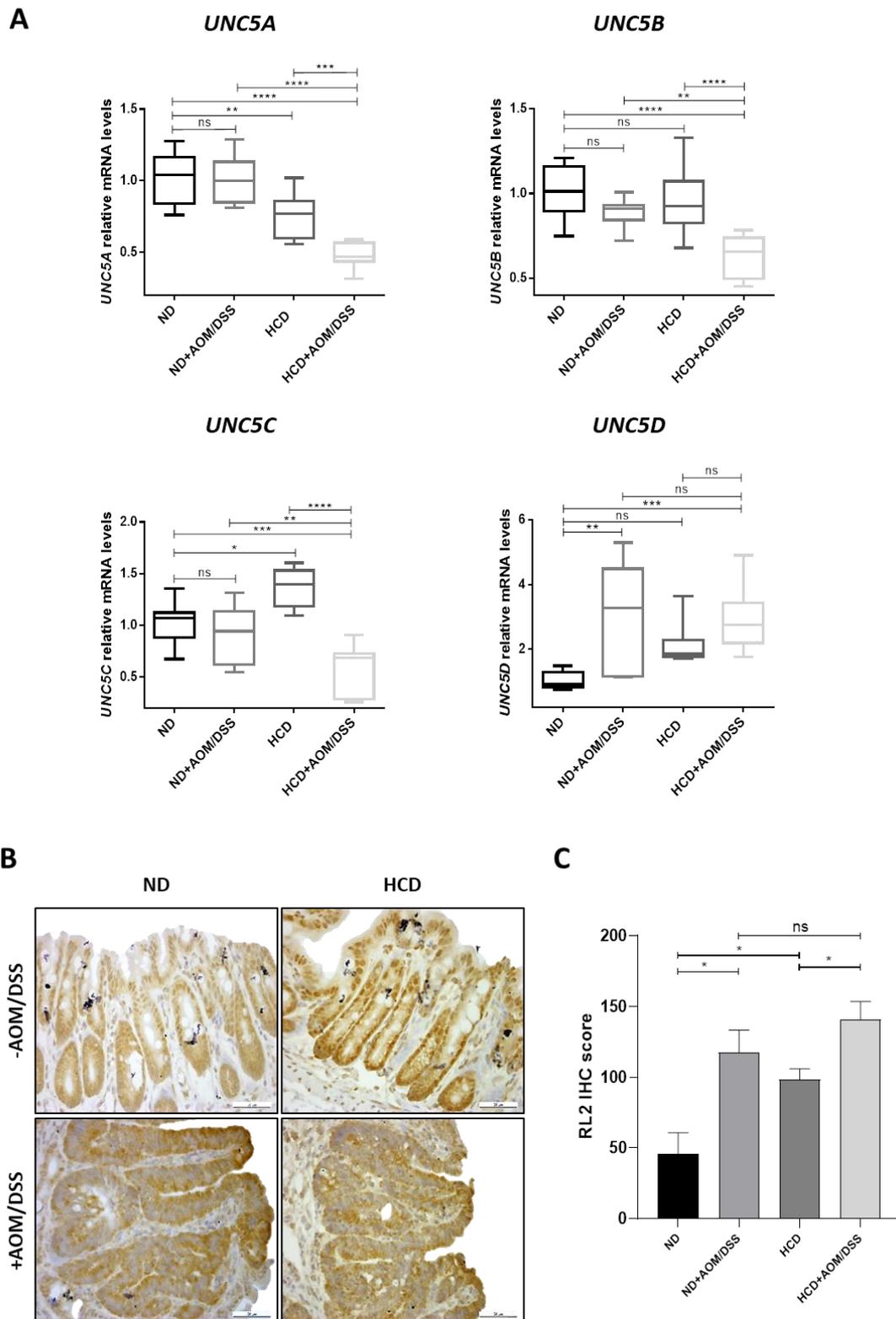


**Figure 44 : Le régime HCD aggrave les processus de cancérogenèse colique.**

(A) Protocole expérimental. La moitié des souris C57BL/6Jrj a été nourrie avec un régime normal (ND) et l'autre moitié avec un régime riche en sucre (HCD). 39 jours après le début des différents régimes, la cancérogenèse colique a été induite chez la moitié des animaux grâce à une seule injection d'azoxyméthane (AOM, 10mg/kg) suivie de quatre cycles de dextran sodium sulfate (DSS) incorporé dans l'eau de boisson. Les souris ont été sacrifiées 85 jours après l'injection d'AOM. Au jour du sacrifice, chaque groupe contenait le nombre suivant d'animaux: ND (n=5), ND+AOM/DSS (n=6), HCD (n=7) et HCD+AOM/DSS (n=9). Au terme de l'expérience, la glycémie à jeun (B) et le poids des individus (C) ont été analysés. ns : non-significatif, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  : Bonferroni's multiple comparisons test. Au jour 124, un examen par endoscopie (D) a permis de déterminer le nombre de tumeurs par souris (E), le nombre de tumeurs par grade (F) et le pourcentage de souris réparties selon le plus haut grade de tumeurs qu'elles présentent (G). \* $p < 0.05$  : student's t-test. (H) Analyse par RT-qPCR de la quantité de transcrits c-myc, cycline D1, Cox-2 et IκBα normalisée sur l'ARNm de RPLP0. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ : Bonferroni's multiple comparisons test. (I-J) La taille du colon a également été mesurée après le sacrifice des animaux. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ : Bonferroni's multiple comparisons test.

Dans un second temps, nous avons déterminé les niveaux d'expression d'UNC5A, UNC5B, UNC5C et UNC5D dans les différentes conditions expérimentales par RT-qPCR. Étrangement et en désaccord avec leur statut de gènes suppresseurs de tumeurs, nous n'avons pas observé de variation d'expression d'UNC5A, UNC5B et UNC5C dans le groupe ND+AOM/DSS en comparaison au groupe contrôle ND et la quantité d'ARNm d'UNC5D quant à elle augmente (**Figure 45A**). Ce résultat laisse à penser que la répression de ces gènes n'est donc pas une étape indispensable pour l'émergence du CCR. En revanche, nos résultats montrent une forte diminution de l'expression d'UNC5A, UNC5B et UNC5C dans le colon des souris HCD+AOM/DSS (**Figure 45A**). Il est également intéressant de noter qu'en absence d'induction tumorale, soumettre des souris à un régime riche en sucres est suffisant pour diminuer les niveaux de transcrits UNC5A (**Figure 45A**, ND *vs* HCD). Ces résultats suggèrent donc fortement que **la nutrition est impliquée dans la répression de ces gènes, répression qui pourrait impacter la progression de la carcinogenèse.**

Nous avons ensuite évalué les niveaux globaux de *O*-GlcNAcylation colique par immunohistochimie (**Figure 45B-C**). En accord avec nos précédents travaux, nous montrons que le régime HCD provoque une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation colique en comparaison aux souris soumises au régime normal (**Figure 45C**, ND *vs* HCD). De plus, comme il a déjà été démontré chez l'Homme, l'hyper-*O*-GlcNAcylation semble également être une caractéristique du CCR chez la souris. En effet, les niveaux de *O*-GlcNAcylation sont environ deux fois plus importants dans les tissus tumoraux en comparaison aux tissus sains chez les souris soumises au régime ND (**Figure 45C**, ND *vs* ND+AOM/DSS). De plus, cette hausse est accentuée lorsque le régime HCD est combiné à l'AOM et au DSS (**Figure 45C**, HCD *vs* HCD+AOM/DSS). Au vu de ces résultats, nous avons supposé que **la *O*-GlcNAcylation puisse représenter un relais moléculaire entre le régime riche en sucres et la répression des membres de la famille *UNC5H* pendant les processus de cancérogenèse colique.**

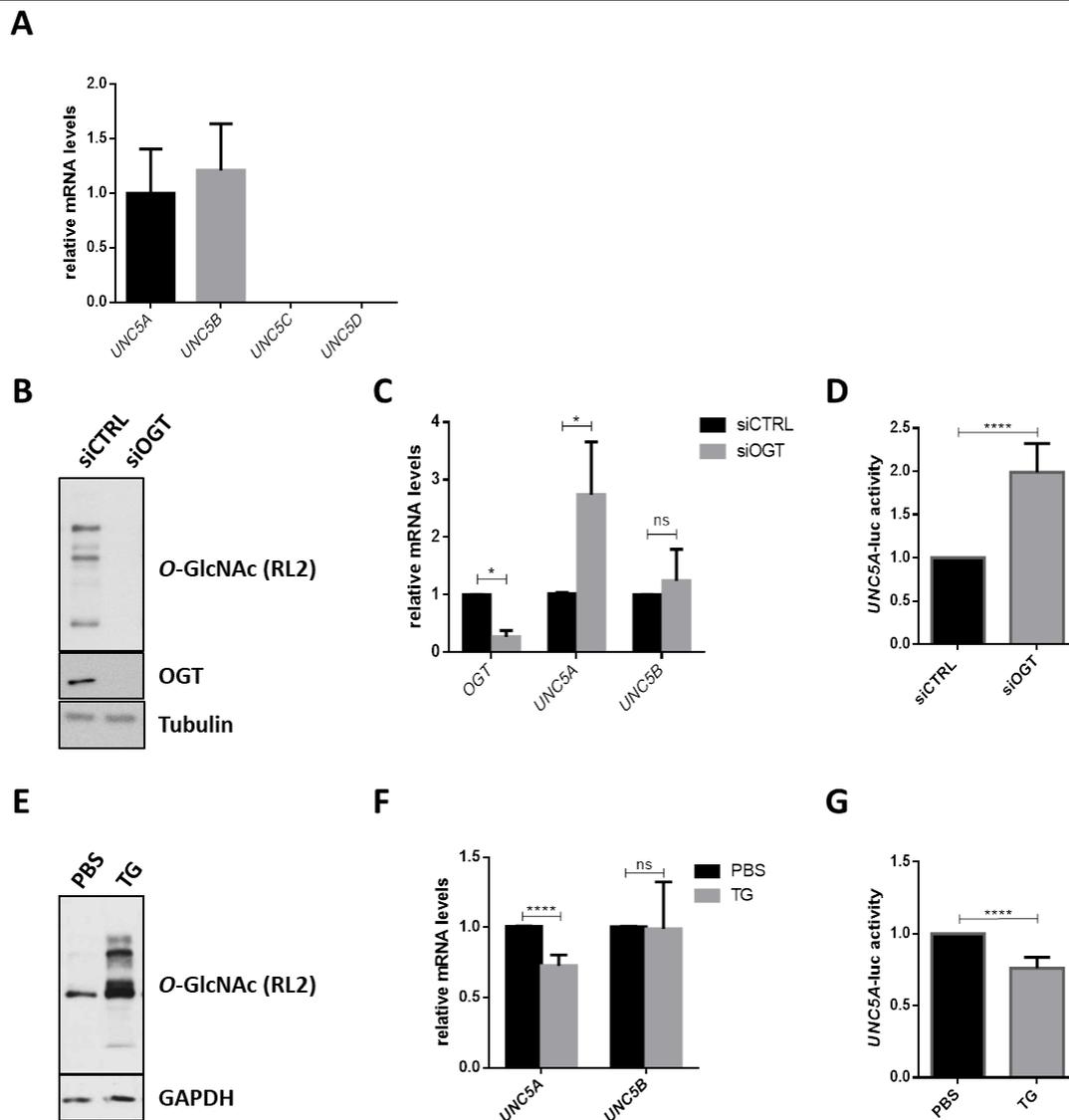


**Figure 45 :** L'expression d'UNC5A, UNC5B et UNC5C est réprimée dans les tumeurs coliques mais uniquement chez les souris soumises à un régime riche en sucres et est corrélée à une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation.

(A) Analyse de la quantité relative de transcrits UNC5A, UNC5B, UNC5C et UNC5D par RT-qPCR. Les valeurs ont été normalisées par rapport à RPLP0. ns: non-significant, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ : Bonferroni's multiple comparisons test. Les niveaux de O-GlcNAcylation ont été déterminés par immunohistochimie. (B) Tissus marqués avec l'anticorps anti-O-GlcNAc (RL2). Les images présentées sont représentatives de deux coupes par souris. (C) Score IHC caractéristique de l'intensité de marquage et du pourcentage de surface marquée. \* $p < 0.05$ : unpaired t-test.

## 2) La O-GlcNAcylation intervient dans la régulation de l'expression d'UNC5A dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 :

Afin de déterminer si la O-GlcNAcylation jouait un rôle dans la régulation de l'expression des membres de la famille UNC5H au cours de la carcinogenèse colique, nous avons réalisé une série d'expériences *in vitro* dans les cellules cancéreuses coliques humaines HCT116. Ces cellules ont des niveaux détectables des transcrits UNC5A et UNC5B mais pas UNC5C ni UNC5D (**Figure 46A**). Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à l'effet du knock-down de l'OGT par siRNA (**Figure 46B**) sur les niveaux de transcrits UNC5H. Nos résultats montrent que le siOGT entraîne une hausse des niveaux d'ARNm d'UNC5A mais qu'en revanche il ne perturbe pas l'expression d'UNC5B (**Figure 46C**) ni d'UNC5C et UNC5D dont les transcrits restent indétectables (données non montrées). En réalisant des tests d'activité luciférase, nous avons par la suite pu déterminer si l'augmentation des niveaux d'ARNm d'UNC5A était d'origine transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle (stabilité des ARNm). Nos résultats montrent que la hausse des transcrits UNC5A en réponse au siOGT est due à une activation plus importante de son promoteur (**Figure 46D**). A l'inverse, le traitement des cellules avec un inhibiteur de l'OGA, le Thiamet G, provoque une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation (**Figure 46E**) corrélée à une diminution des niveaux de transcrits UNC5A (**Figure 46F**) et à une baisse de l'activation de son promoteur (**Figure 46G**). Ces premiers résultats montrent donc que **la O-GlcNAcylation prend part à la régulation de la transcription colique d'UNC5A mais ne semble pas interférer avec l'expression des autres membres de la famille.**

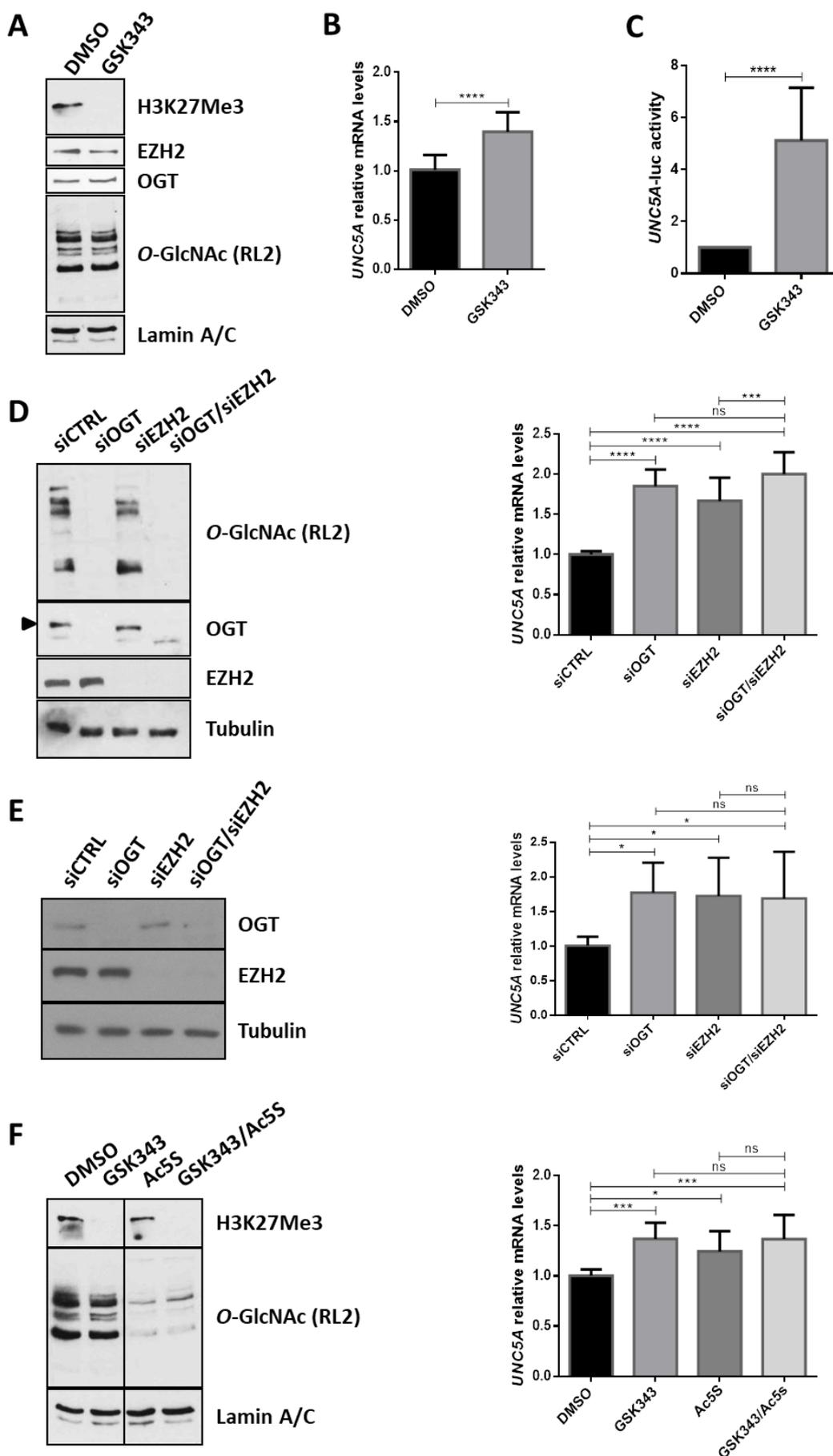


**Figure 46 : La O-GlcNAcylation est impliquée dans la régulation de la transcription d'UNC5A dans les cellules cancéreuses coliques HCT116.**

(A) Analyse par RT-qPCR des niveaux de transcrits UNC5H (UNC5A, UNC5B, UNC5C et UNC5D) normalisés sur l'ARNm de RPLP0. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. (B-C-D) Les cellules HCT116 ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCTRL) ou ciblant l'OGT (siOGT) et les lysats ont été récupérés 72h plus tard. (B) Pour vérifier l'efficacité de transfection des siRNA, une partie des lysats cellulaires a été analysée par Western Blot avec un anticorps anti-O-GlcNAc (RL2) et un anticorps anti-OGT. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (C) Analyse par RT-qPCR des niveaux d'ARNm de l'OGT, d'UNC5A et d'UNC5B normalisés sur l'ARNm de RPLP0. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. ns: non-significant,  $*p < 0.05$ : unpaired t-test. (D) 24h après la transfection des siRNA, les cellules ont été transfectées avec 200ng de plasmide contenant le gène rapporteur de la luciférase placé sous contrôle du promoteur UNC5A et 25ng du reporteur  $\beta$ -galactosidase. L'activité luciférase a été déterminée 48h plus tard et normalisée par rapport à l'activité de la  $\beta$ -galactosidase. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes.  $****p < 0.0001$ : unpaired t-test. (E-F-G) Les cellules HCT116 ont été traitées avec un inhibiteur de l'OGA, le Thiamet G (1 $\mu$ M), pendant 24h. (E) L'efficacité du traitement a été vérifiée par Western Blot avec un anticorps anti-O-GlcNAc (RL2). La GAPDH a été utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (F) Les niveaux de transcrits UNC5A et UNC5B ont été mesurés par RT-qPCR et normalisés sur la quantité d'ARNm de RPLP0. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes.  $****p < 0.0001$ : unpaired t-test. (G) 200ng de plasmide contenant le gène rapporteur de la luciférase placé sous contrôle du promoteur UNC5A et 25ng du reporteur  $\beta$ -galactosidase ont été transfectés dans les cellules HCT116. 24h plus tard, les cellules ont été traitées avec 1 $\mu$ M de Thiamet G pendant 24h. L'activité luciférase a été normalisée par rapport à l'activité de la  $\beta$ -galactosidase. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes.  $****p < 0.0001$ : unpaired t-test.

### 3) La O-GlcNAcylation régule la transcription d'UNC5A via le complexe PRC2 dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 :

Comme cité dans la partie introductive de ce manuscrit, la O-GlcNAcylation régule l'activité de plusieurs épizymes dont l'histone méthyltransférase EZH2, la sous-unité catalytique du complexe PRC2, complexe dont l'implication dans la carcinogenèse colique a par ailleurs été démontrée. Dans ce contexte, nous nous sommes demandé si le complexe PRC2 pouvait également être impliqué dans la régulation transcriptionnelle d'UNC5A. Pour répondre à cette question, nous avons inhibé pharmacologiquement EZH2 en traitant les cellules HCT116 avec le GSK343 (**Figure 47A**) puis avons analysé les niveaux de transcrits UNC5A par RT-qPCR et l'activation de son promoteur par des tests d'activité luciférase. Nous montrons que l'inhibition d'EZH2 induit une augmentation des niveaux d'ARNm d'UNC5A (**Figure 47B**) corrélée à une hausse de l'activité de son promoteur (**Figure 47C**) suggérant qu'**UNC5A est en effet un gène cible du complexe PRC2 dans notre modèle d'étude**. Nous avons confirmé ces résultats en transfectant les cellules HCT116 avec un siRNA ciblant EZH2 et/ou l'OGT puis en analysant les niveaux de transcrits UNC5A par RT-qPCR. L'abolition de l'expression d'EZH2 conduit à une dépression d'UNC5A (**Figure 47D**). De plus, nous observons que le siEZH2 augmente les niveaux d'ARNm d'UNC5A à des niveaux similaires au siOGT (**Figure 47D**). L'abolition simultanée de l'OGT et d'EZH2 n'a en outre pas d'effet additif sur l'augmentation des niveaux de transcrits UNC5A en comparaison au siOGT seul alors qu'elle a un léger effet additif comparativement au siEZH2 seul (**Figure 47D**). Ces résultats ont été confirmés dans la lignée cancéreuse colique LS174T (**Figure 47E**) mais également en traitant les cellules HCT116 avec deux inhibiteurs spécifiques de l'OGT et d'EZH2 : respectivement l'Ac5S-GlcNAc et le GSK343 (**Figure 47F**). Ces données suggèrent donc que **l'OGT et EZH2 participent conjointement à la répression d'UNC5A**.

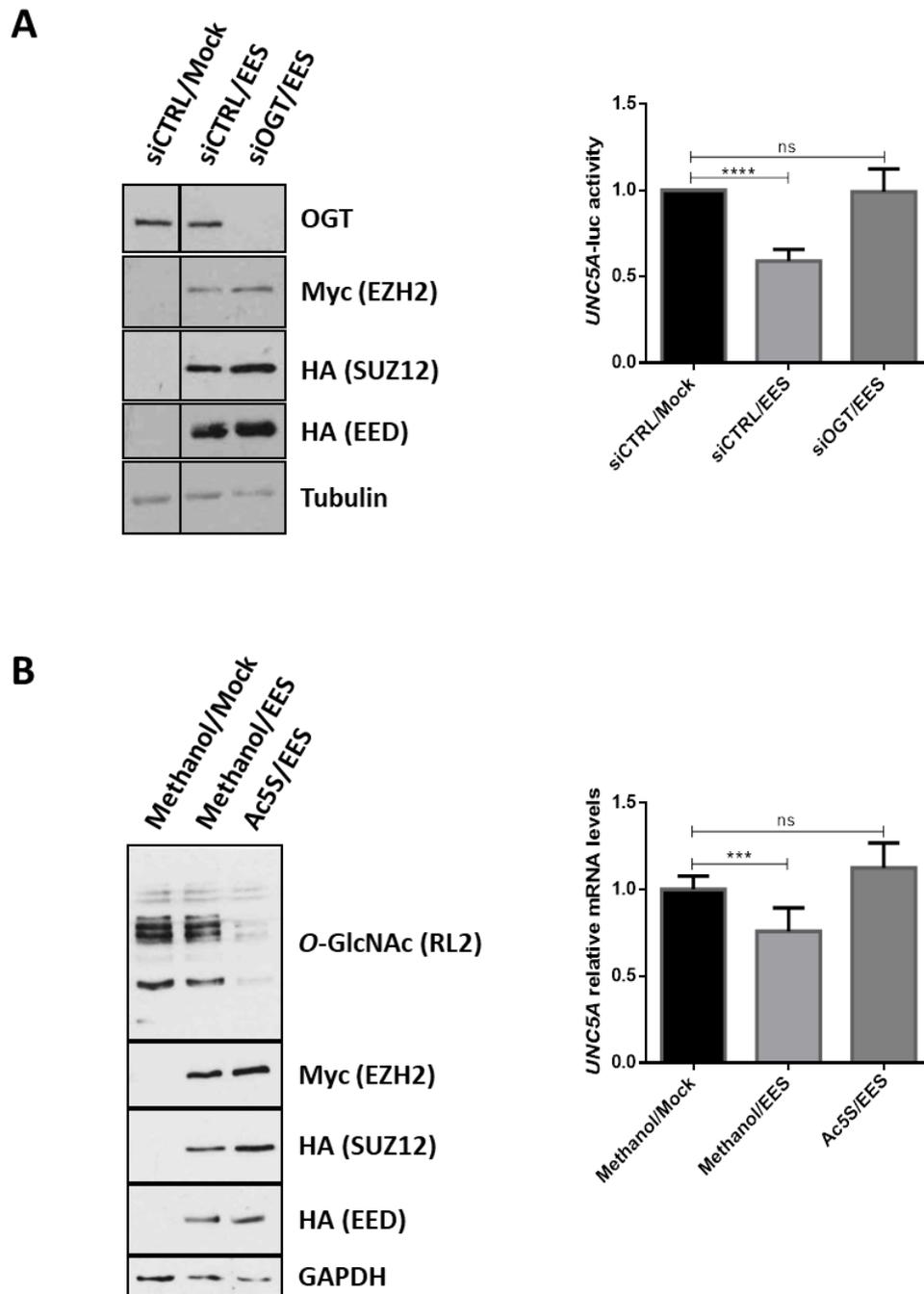


**Figure 47: L'OGT et EZH2 participent conjointement à la répression de la transcription d'UNC5A dans les cellules cancéreuses coliques.**

(A-B-C) Les cellules HCT116 ont été traitées pendant 48h avec 5 $\mu$ M de GSK343. (A) L'efficacité du traitement a été vérifiée à partir de fraction chromatiniennne par des analyses en Western Blot avec un anticorps anti-H3K27Me3. Les niveaux d'EZH2, d'OGT et de O-GlcNAcylation ont également été analysés. Les lamines A/C sont utilisées comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (B) La quantité de transcrits UNC5A a été mesurée par RT-qPCR et normalisée sur les niveaux d'ARNm de RPLP0. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. \*\*\*\* $p < 0.0001$ : unpaired t-test. (C) Les cellules ont été transfectées avec 200ng de plasmide contenant le gène rapporteur de la luciférase placé sous contrôle du promoteur UNC5A et 25ng du reporteur  $\beta$ -galactosidase. 6h plus tard, les cellules ont été traitées avec 5 $\mu$ M de GSK343 pendant 48h. L'activité luciférase a été normalisée par rapport à l'activité de la  $\beta$ -galactosidase. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. \*\*\*\* $p < 0.0001$ : unpaired t-test. (D) Les cellules HCT116 ont été transfectées avec un siRNA ciblant l'OGT et/ou EZH2. Les ARN totaux et les lysats protéiques ont été récupérés 72h après la transfection. Partie gauche : l'efficacité de transfection a été vérifiée par des analyses en Western Blot en utilisant les anticorps indiqués. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs de cinq expériences indépendantes. Partie droite : analyse en RT-qPCR de la quantité de transcrits UNC5A normalisée sur l'ARNm de RPLP0. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de cinq expériences indépendantes. ns: non-significant, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ : Bonferroni's multiple comparisons test. (E) Les cellules LS174T ont été transfectées avec un siRNA ciblant l'OGT et/ou EZH2. Les ARN totaux et les lysats protéiques ont été récupérés 72h après la transfection. Partie gauche : l'efficacité de transfection a été vérifiée par des analyses en Western Blot en utilisant les anticorps indiqués. Les résultats sont représentatifs de cinq expériences indépendantes. Partie droite : analyse en RT-qPCR de la quantité de transcrits UNC5A normalisée sur l'ARNm de RPLP0. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. ns: non-significant, \* $p < 0.05$  : Bonferroni's multiple comparisons test. (F) Les cellules HCT116 ont été traitées avec 50 $\mu$ M d'Ac5S-GlcNAc pendant 24h et/ou 5 $\mu$ M de GSK343 pendant 48h. Partie gauche : l'efficacité des traitements a été vérifiée à partir de fraction chromatiniennne par des analyses en Western Blot des niveaux de H3K27Me3 et des niveaux d'expression de l'OGT, d'EZH2 et des lamines A/C. Les résultats sont représentatifs de quatre expériences indépendantes. Partie droite : analyse en RT-qPCR de la quantité de transcrits UNC5A normalisée sur l'ARNm de RPLP0. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de quatre expériences indépendantes. ns: non-significant, \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ : Bonferroni's multiple comparisons test.

---

Afin de renforcer ces résultats, nous avons mesuré l'expression des transcrits UNC5A ainsi que l'activité de son promoteur dans des conditions de surexpression du « core » complexe PRC2 (EES : EZH2 + SUZ12 + EED) combiné ou non à une modulation à la baisse des niveaux de O-GlcNAcylation (**Figure 48**). Nos résultats montrent que la surexpression du « core » PRC2 provoque une diminution des transcrits UNC5A (**Figure 48B**) corrélée à une diminution de l'activation de son promoteur (**Figure 48A**) confirmant ainsi qu'UNC5A est bien un gène cible du complexe PRC2. En revanche, cette répression n'est plus observée lorsque l'expression ou l'activité de l'OGT est inhibée. Ces résultats démontrent donc que la O-GlcNAcylation régule la répression d'UNC5A médiée par le complexe PRC2.



**Figure 48 : La O-GlcNAcylation régule la transcription d'UNC5A via le complexe PRC2 dans les cellules cancéreuses coliques HCT116.**

(A) 24h après la transfection des siRNA, les cellules ont été transfectées avec le « core » PRC2 (EES : Myc-EZH2, HA-EED, HA-SUZ12), 200ng de plasmide codant le gène rapporteur de la luciférase placé sous contrôle du promoteur d'UNC5A et 25ng de  $\beta$ -galactosidase. Partie gauche : l'efficacité de transfection et de traitement a été vérifiée par Western Blot en utilisant les anticorps indiqués. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Partie droite : l'activité luciférase a été déterminée 72h après la transfection de siRNA et a été normalisée par rapport à l'activité  $\beta$ -galactosidase. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. ns : non-significatif, \*\*\*\* $p < 0,0001$  : Bonferroni's multiple comparisons test. (B) Les cellules HCT116 ont été transfectées avec le « core » PRC2. 24h après la transfection, les cellules ont été traitées avec 50 $\mu$ M d'Ac5S-GlcNAc pendant 24h puis lysées. Partie gauche : l'efficacité de transfection et de traitement a été vérifiée par Western Blot en utilisant les anticorps indiqués. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Partie droite : les niveaux de transcrits UNC5A ont été mesurés par RT-qPCR et normalisés sur les niveaux d'ARNm de RPLP0. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. ns: non-significatif, \*\*\* $p < 0,001$ : Bonferroni's multiple comparisons test.

#### 4) La O-GlcNAcylation d'EZH2 permet son recrutement sur le promoteur d'UNC5A dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 :

Nous avons finalement souhaité déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels la O-GlcNAcylation influence la répression d'UNC5A médiée par le complexe PRC2. Premièrement, nous avons mis en évidence la O-GlcNAcylation d'EZH2 dans notre modèle d'étude en réalisant des enrichissements sur billes d'agarose couplées à la lectine sWGA. De manière succincte, les cellules sont traitées avec 1 $\mu$ M de Thiamet G afin de maintenir des niveaux de O-GlcNAcylation élevés (**Figure 49A**, Inputs). Les extraits protéiques totaux sont ensuite mis en présence de billes d'agarose couplées à la lectine et préalablement incubées ou non en présence de GlcNAc libre. Après révélation par Western Blot avec un anticorps anti-O-GlcNAc, nous observons un enrichissement de nombreuses protéines O-GlcNAcylées parmi lesquelles EZH2 (**Figure 49A**, partie haute). Ce signal est totalement perdu lors de l'ajout de GlcNAc libre montrant la spécificité de notre enrichissement (**Figure 49A**, partie haute). Ces résultats montrent donc qu'**EZH2 est O-GlcNAcylée dans les cellules HCT116**. D'après les données de la littérature, les rôles de la O-GlcNAcylation d'EZH2 pourraient être multiples. Alors que certaines données tendent à montrer une régulation de la stabilité et de l'activité d'EZH2 par O-GlcNAcylation, d'autres avancent un rôle de la O-GlcNAcylation dans la fixation d'EZH2 sur le promoteur de certains de ses gènes cibles. Pour éclaircir le rôle de la O-GlcNAcylation d'EZH2 dans les cellules HCT116, nous avons dans un premier temps déterminé l'expression de l'épizyme dans des cellules traitées à l'Ac5S-GlcNAc. Contrairement au DZNEP qui est connu pour déstabiliser EZH2, l'inhibition de l'OGT n'affecte pas l'expression de cette histone méthyltransférase (**Figure 49B**). De manière similaire, l'abolition de l'expression de l'OGT par siRNA n'induit aucune variation des niveaux protéiques d'EZH2 (**Figures 47D et 49C-D**). Inversement, l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation en réponse à un traitement avec le Thiamet G (**Figure 49A-E**) ne provoque pas non plus de changement d'expression d'EZH2. Tous ces résultats montrent que **la O-GlcNAcylation ne semble pas influencer la stabilité d'EZH2 dans notre modèle d'étude**. Par ailleurs, **la O-GlcNAcylation n'interviendrait pas non plus dans la régulation de l'activité catalytique d'EZH2**. En effet, l'inhibition de l'expression ou de l'activité de l'OGT ne conduit à aucun changement des niveaux de H3K27Me3, la marque épigénétique déposée par le complexe (**Figures 47F et 49C**). D'autre part, des expériences de co-

immunoprécipitation réalisées dans des conditions de modulation des niveaux de O-GlcNAcylation (**Figure 49D-E**) mettent en évidence que **cette modification post-traductionnelle ne régule pas non plus l'interaction entre SUZ12 et EZH2**. Nous avons finalement testé si la O-GlcNAcylation intervient dans la régulation du recrutement d'EZH2 sur le promoteur d'*UNC5A*. Pour ce faire, nous avons réalisé des expériences de CUT&RUN, une technique alternative à l'immunoprécipitation de la chromatine permettant également d'étudier les interactions ADN/protéines. Nos résultats démontrent qu'EZH2 se fixe sur le promoteur d'*UNC5A* et que cette liaison est amoindrie dans des conditions d'inhibition de l'OGT (**Figure 49F**). A l'inverse, l'Ac5S-GlcNAc permet une augmentation de l'enrichissement de la marque épigénétique activatrice, H3K4Me3, sur le promoteur d'*UNC5A* (**Figure 49G**). En conclusion, l'ensemble de ces résultats prouve que **dans les cellules cancéreuses coliques HCT116, la O-GlcNAcylation d'EZH2 permet son recrutement sur le promoteur d'*UNC5A* afin d'en réprimer la transcription.**



**Figure 49 :** Dans les cellules cancéreuses coliques, la O-GlcNAcylation n'influence ni la stabilité ni la stabilité d'EZH2, ni son activité, ni son interaction avec SUZ12 mais permet son recrutement sur le promoteur d'UNC5A.

(A) Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec 1 $\mu$ M de Thiamet G pendant 24h puis ont été lysées. Afin d'enrichir les protéines O-GlcNAcylées, les extraits protéiques ont été mis en présence de billes d'agarose couplées à la sWGA préalablement incubées ou non en présence de 0.5M de GlcNAc libre (contrôle négatif). Les protéines retenues sur les billes ainsi qu'une fraction de l'extrait total (Inputs) ont été analysés par Western Blot avec les anticorps indiqués. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes. (B) Les cellules HCT116 ont été traitées avec 5 $\mu$ M de DZNEP ou 50 $\mu$ M d'Ac5S-GlcNAc respectivement pendant 48h et 24h. Des analyses en Western Blot ont été effectuées en utilisant les anticorps indiqués. La tubuline a été utilisée comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes. (C) Les cellules HCT116 ont été transfectées avec un siRNA contrôle (siCTRL) ou un siRNA ciblant l'OGT (siOGT) ou EZH2 (siEZH2, utilisé comme contrôle positif) pendant 72h. Des analyses par Western Blot ont été réalisées à partir de fraction chromatinienne avec les anticorps indiqués. Les lamines A/C ont été utilisées comme contrôle de charge. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes. (D) Les cellules HCT116 ont été transfectées avec deux siRNA différents ciblant l'OGT (siOGT#2 et siOGT#3) ou avec un siRNA contrôle (siCTRL) pendant 72h. L'interaction entre SUZ12 et EZH2 a été évaluée en réalisant des expériences de co-immunoprécipitation. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (E) Les cellules HCT116 ont été traitées avec 50 $\mu$ M d'Ac5S-GlcNAc pendant 24h puis l'interaction entre SUZ12 et EZH2 a été analysée grâce à des expériences de co-immunoprécipitation. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes. (F-G) Les cellules HCT116 ont été traitées avec 50 $\mu$ M d'Ac5S-GlcNAc pendant 24h. La liaison d'EZH2 (F) et la présence de la marque H3K4Me3 (G) ont ensuite été examinées par des expériences de CUT&RUN. Les données correspondent à l'enrichissement par rapport à l'IgR contrôle d'une seule expérience déposée en duplicats et sont représentatifs de deux expériences indépendantes. \*\* $p < 0.01$ : unpaired t-test.

---

### III. Conclusion et discussion :

Au cours de ces dernières décennies, les changements dans le mode de vie occidental, caractérisé par une sédentarité accrue qui n'est pas compensée par une diminution de l'apport calorique, ont largement contribué à une augmentation de l'incidence du CCR. Dans ce sens, plusieurs études épidémiologiques ont montré qu'il existe un facteur de risque plus important de développer un CCR chez des patients atteints d'un syndrome métabolique, de diabète de type II ou d'obésité (Pais et al. 2009; Zheng et al. 2017; de Jong et al. 2018). Bien qu'il soit maintenant admis que l'émergence et la progression du CCR sont dues à une succession d'altérations génétiques, l'apport de connaissances sur les acteurs moléculaires contrôlant l'expression des gènes a révélé le rôle tout aussi important de l'épigénétique dans les processus de cancérisation. Par ailleurs, un nombre croissant de travaux tend à montrer que l'épigénome est capable d'intégrer des informations nutritionnelles suggérant que l'alimentation, en modifiant l'épigénome, puisse influencer l'émergence et la progression du CCR (Bishop and Ferguson 2015; Sapienza and Issa 2016). Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore peu compris.

L'UDP-GlcNAc, le nucléotide sucre donneur utilisé par l'OGT pour O-GlcNAcyler ses protéines cibles, est produit *via* le voie de biosynthèse des hexosamines qui se situe au carrefour de plusieurs métabolismes. C'est pourquoi, l'UDP-GlcNAc et la O-GlcNAcylation sont définis comme des senseurs nutritionnels pouvant refléter les effets d'un apport alimentaire excessif, l'obésité ou encore les syndromes métaboliques. Plusieurs travaux ont montré une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation et de l'expression de l'OGT dans les tumeurs coliques humaines en comparaison aux tissus sains adjacents (Mi et al. 2011; Olivier-Van Stichelen et al. 2014b). De la même manière, il existe une augmentation de l'expression des membres du complexe PRC2 (EZH2, EED, SUZ12) qui est responsable du dépôt de la marque épigénétique répressive H3K27Me3 dans le CCR (Liu et al. 2015). Inversement, l'expression des gènes suppresseurs de tumeurs *UNC5H* est fréquemment réprimée dans le CCR *via* des mécanismes épigénétiques peu compris (Thiébaud et al. 2003; Bernet et al. 2007; Shin et al. 2007; Hibi et al. 2009a; Wu et al. 2017b).

Notre étude a dans un premier temps permis de montrer que la consommation d'un régime riche en sucres (HCD) aggrave les processus de CCR induit par l'azoxyméthane (AOM) et le dextran sodium sulfate (DSS) chez la souris. Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus par différentes équipes montrant une plus forte susceptibilité des souris obèses (*ob/ob*, *db/db* et *KK-A(y)*) à développer des tumeurs coliques suite à l'injection d'AOM (Hirose 2003; Ealey et al. 2008; Teraoka et al. 2011). De la même manière, un régime favorisant l'obésité (DIO pour « Diet Induced Obesity) augmente le risque de CCR induit par l'AOM chez la souris (Sikalidis et al. 2013; Olivo-Marston et al. 2014).

Par ailleurs, dans notre modèle, nous avons également observé une diminution de l'expression d'*UNC5A*, *UNC5B* et *UNC5C* dans les tumeurs mais uniquement chez les souris soumises au régime HCD associant ainsi l'alimentation à la répression de ces gènes durant la progression du CCR. De plus, nous avons remarqué que cette baisse d'expression était corrélée à une augmentation des niveaux globaux de O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation semble donc représenter un relais moléculaire entre la nutrition et la prédisposition au CCR. Deux études indépendantes avaient auparavant démontré une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation dans le colon de souris soumises à un régime HCD (Olivier-Van Stichelen et al. 2014b) et dans celui de souris obèses (*ob/ob*) (Very et al. 2018) dans un contexte non tumoral.

D'un point de vue mécanistique, nous avons montré *in vitro* dans des cellules cancéreuses coliques l'action conjointe de l'OGT et d'EZH2 dans la régulation de l'expression d'UNC5A. Plus précisément, la O-GlcNAcylation d'EZH2 permet son recrutement sur le promoteur d'UNC5A de manière à réprimer sa transcription. En accord avec nos résultats, Chu et ses collaborateurs avaient mis en évidence une augmentation des niveaux de transcrits UNC5A dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 en réponse à l'abolition de l'expression de l'OGT ou d'EZH2. De plus, un enrichissement d'EZH2 et de sa marque H3K27Me3, dépendant de l'OGT, sur le promoteur d'UNC5A avait aussi été observé dans ce modèle (Chu et al. 2014). Cependant, même si la O-GlcNAcylation d'EZH2 a déjà été décrite dans plusieurs lignées cellulaires, les fonctions de cette modification post-traductionnelle semblent variées. En effet, alors que certains travaux concluent que la O-GlcNAcylation d'EZH2 contrôle sa stabilité et son activité (Chu et al. 2014; Jiang et al. 2018; Lo et al. 2018a), d'autres argumentent en faveur d'une régulation fine de la liaison d'EZH2 sur certains promoteurs (Forma et al. 2018; Shi et al. 2018). Nous avons ici pu confirmer dans un premier temps la O-GlcNAcylation d'EZH2 dans les cellules cancéreuses coliques HCT116. La O-GlcNAcylation ne semble pas influencer ni la stabilité ni l'activité histone méthyltransférase d'EZH2 dans ces cellules. L'interaction entre EZH2 et SUZ12 n'est pas non plus impactée par des modulations des niveaux de O-GlcNAcylation. En revanche, nos données prouvent que la O-GlcNAcylation régule la fixation d'EZH2 à des locis spécifiques dont UNC5A dans les cellules HCT116.

Même si plusieurs sites de O-GlcNAcylation d'EZH2 ont été identifiés à ce jour (S73, S75, S76, S84, S87, T313 et S729) (Chu et al. 2014; Lo et al. 2018a), d'autres restent encore à déterminer. Une approche par spectrométrie de masse pourrait être envisagée pour procéder à la caractérisation de nouveaux sites de O-GlcNAcylation d'EZH2. L'obtention de ces sites permettrait la construction de versions « non GlcNAcylables » de la protéine par mutagenèse dirigée. Ces mutants aideraient à la meilleure compréhension des mécanismes de régulation d'EZH2 par O-GlcNAcylation. En parallèle, différents anticorps reconnaissant spécifiquement les formes O-GlcNAcyliées d'EZH2 pourraient être synthétisés. Ils seraient alors utilisés en immunohistochimie par exemple sur des coupes de tumeurs coliques pour estimer si, tel que nous pouvons l'imaginer, la O-GlcNAcylation d'EZH2 puisse représenter un marqueur diagnostic ou pronostic du CCR.

Les récepteurs UNC5H font partie de la famille des récepteurs membranaires et sont capables d'initier deux signalisations opposées. En présence de leur ligand, ces récepteurs

activent une signalisation « positive » (prolifération, survie, différenciation et migration) alors qu'en l'absence de leur ligand, ils déclenchent une signalisation « négative » : l'apoptose. Ces récepteurs représentent donc de réels gardiens de l'épithélium intestinal en éliminant les cellules ayant une croissance démesurée dans un environnement pauvre en ligand. Cependant, une perte d'expression des récepteurs UNC5H est fréquemment retrouvée dans le CCR prouvant que les cellules cancéreuses sont capables de contourner le mécanisme de surveillance mis en place par ces récepteurs. Ainsi, les récepteurs UNC5H semblent être des cibles thérapeutiques intéressantes. Des stratégies visant à augmenter leur expression pourraient permettre de favoriser l'apoptose des cellules cancéreuses. Dans ce sens, l'injection de cellules cancéreuses de la vessie 5637 surexprimant UNC5B diminue la progression tumorale chez la souris (Kong et al. 2016). D'autre part, *UNC5A*, *UNC5B* et *UNC5D* sont des gènes cibles de p53 et il a été montré dans différentes lignées cellulaires une augmentation de l'expression d'UNC5H en réponse à des dommages à l'ADN provoqués par différentes chimiothérapies (Tanikawa et al. 2003; Wang et al. 2008; Miyamoto et al. 2010; Zhu et al. 2014b). Néanmoins, des travaux menés par Paradisi et ses collaborateurs ont mis en évidence dans plusieurs lignées cancéreuses non seulement une hausse des récepteurs UNC5H mais aussi de leur ligand, la nétrine-1, en réponse à différentes chimiothérapies (doxorubicine, 5-fluorouracile, paclitaxel et cisplatine) empêchant par conséquent ces récepteurs d'exercer leur fonction pro-apoptotique (Paradisi et al. 2013). Ces auteurs ont prouvé *in vitro* que l'inhibition de l'interaction entre la nétrine-1 et UNC5A (avec la TRAP-netrin<sup>UNC5A</sup>) permet de sensibiliser des cellules cancéreuses à différentes chimiothérapies dont la doxorubicine. *In vivo*, la combinaison de la TRAP-netrin<sup>UNC5A</sup> et de la doxorubicine conduit à une inhibition de la croissance tumorale dans un modèle de xenogreffe chez la souris. Dans le même sens, l'injection de l'anticorps net1-mAb bloquant l'interaction nétrine-1/UNC5B diminue le développement tumoral colique induit par l'AOM et le DSS chez la souris (Grandin et al. 2016). La combinaison d'un agent chimiothérapeutique, la dacarbazine, avec cet anticorps permet d'augmenter significativement la survie de souris injectées avec des cellules de mélanome (Boussouar et al. 2020). De manière intéressante, nous avons observé dans notre étude que l'abolition de l'expression de l'OGT par siRNA conduit à une augmentation de l'expression d'*UNC5A* mais n'a pas d'effet sur la nétrine-1 (données non montrées). A court terme, il serait donc intéressant d'investiguer les mécanismes de régulation de la transcription d'*UNC5A* par la forme O-GlcNAcylée d'EZH2 en réponse aux

chimiothérapies. L'inhibition de l'interaction entre l'OGT et EZH2 représenterait peut être un moyen d'améliorer l'efficacité des chimiothérapies dans le CCR.

**Publication 1:**

***O*-GlcNAcylation links nutrition  
to the epigenetic  
downregulation of *UNC5A*  
during colon carcinogenesis**



Article

## O-GlcNAcylation Links Nutrition to the Epigenetic Downregulation of *UNC5A* during Colon Carcinogenesis

Amélie Decourcelle <sup>1</sup>, Ninon Very <sup>2</sup>, Madjid Djouina <sup>3</sup> , Ingrid Loison <sup>1</sup>, Julien Thévenet <sup>4</sup>, Mathilde Body-Malapel <sup>3</sup> , Eric Lelièvre <sup>5</sup>, Olivier Coqueret <sup>5</sup> , Dominique Leprince <sup>1</sup>, Ikram El Yazidi-Belkoura <sup>2</sup> and Vanessa Dehennaut <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277—CANTHER—Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France; amelie.decourcelle@ibl.cnrs.fr (A.D.); ingrid.loison@ibl.cnrs.fr (I.L.); dominique.leprince@ibl.cnrs.fr (D.L.)

<sup>2</sup> Université de Lille, CNRS, UMR 8576—UGSF—Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France; ninon.very.etu@univ-lille.fr (N.V.); ikram.el-yazidi@univ-lille.fr (I.E.Y.-B.)

<sup>3</sup> Université de Lille, Inserm, CHU Lille, U1286—INFINITE—Institute for translational research in inflammation, F-59000 Lille, France; madjid.djouina@univ-lille.fr (M.D.); mathilde.body@univ-lille.fr (M.B.-M.)

<sup>4</sup> Université de Lille, Inserm, CHU Lille, UMR 1190 Translational Research for Diabetes, European Genomic Institute for Diabetes, F-59000 Lille, France; julien.thevenet@univ-lille.fr

<sup>5</sup> Paul Papin ICO Cancer Center, CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, 49055 Angers, France; eric.lelievre@univ-angers.fr (E.L.); olivier.coqueret@univ-angers.fr (O.C.)

\* Correspondence: vanessa.dehennaut@ibl.cnrs.fr

Received: 2 October 2020; Accepted: 25 October 2020; Published: 28 October 2020



**Simple Summary:** Nutritional disorders represent major risk factors for colorectal cancer according to mechanisms of action that are still insufficiently known. The aim of our study was to investigate the putative involvement of nutrition in the epigenetic downregulation of the tumor suppressor genes of the *UNC5* (Uncoordinated 5) family during colonic carcinogenesis and to understand its molecular relays. Herein, we provided evidence that the consumption of a High Carbohydrate Diet worsens colon carcinogenesis in mice and is correlated with the downregulation of several members of the *UNC5* family whose *UNC5A* (Uncoordinated 5A). Mechanistically, we identified the nutritional sensor *O*-GlcNAcylation as one of the molecular relays that regulate the recruitment of the PRC2 complex onto the *UNC5A* promoter to repress its transcription.

**Abstract:** While it is now accepted that nutrition can influence the epigenetic modifications occurring in colorectal cancer (CRC), the underlying mechanisms are not fully understood. Among the tumor suppressor genes frequently epigenetically downregulated in CRC, the four related genes of the *UNC5* family: *UNC5A*, *UNC5B*, *UNC5C* and *UNC5D* encode dependence receptors that regulate the apoptosis/survival balance. Herein, in a mouse model of CRC, we found that the expression of *UNC5A*, *UNC5B* and *UNC5C* was diminished in tumors but only in mice subjected to a High Carbohydrate Diet (HCD) thus linking nutrition to their repression in CRC. *O*-GlcNAcylation is a nutritional sensor which has enhanced levels in CRC and regulates many cellular processes amongst epigenetics. We then investigated the putative involvement of *O*-GlcNAcylation in the epigenetic downregulation of the *UNC5* family members. By a combination of pharmacological inhibition and RNA interference approaches coupled to RT-qPCR (Reverse Transcription-quantitative Polymerase Chain Reaction) analyses, promoter luciferase assay and CUT&RUN (Cleavage Under Target & Release Using Nuclease) experiments, we demonstrated that the *O*-GlcNAcylated form of the histone methyl transferase EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) represses the transcription of *UNC5A* in human colon cancer cells. Collectively, our data support the hypothesis that *O*-GlcNAcylation could

represent one link between nutrition and epigenetic downregulation of key tumor suppressor genes governing colon carcinogenesis including *UNC5A*.

**Keywords:** *UNC5A*; *O*-GlcNAcylation; OGT; EZH2; nutrition; epigenetics; colon cancer

## 1. Introduction

The emergence and progression of cancer depend on a complex interplay between the genome and the epigenome, which together interact with several environmental factors. Particularly, several studies have highlighted the key role of diet and nutritional compounds in the epigenetic regulation of gene expression [1–3]. They hence support the hypothesis of a close relationship between nutritional disorders (obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes, etc.), well-known risk factors for many cancers including colorectal cancer (CRC), and epigenetic reprogramming linked to carcinogenesis.

The *UNC5* gene family consists of four related genes including *UNC5A*, *UNC5B*, *UNC5C* and *UNC5D* that encode type-I transmembrane receptors of Netrin-1. *UNC5* and Netrin-1 play essential role in axon guidance during neuronal development and differentiation [4]. In addition, in neuronal and non-neuronal cells, *UNC5* receptors share the capability to act as “dependence receptors”: they transduce a “positive” cell proliferation and survival signal when bound to Netrin-1 but induce caspase-dependent apoptosis in absence of their ligand. In recent years, the *UNC5* receptors have been defined as key players of colorectal carcinogenesis by regulating the survival/apoptosis balance and are considered as conditional tumor suppressor genes [5]. In fact, expression of *UNC5A*, *UNC5B* and *UNC5C* is frequently downregulated in colorectal cancer (CRC) and their silencing has been associated in part with loss of heterozygosity (LOH) within *UNC5* loci and with epigenetic alterations that are not fully understood [6–10]. Notably, the putative influence of nutrition on the repression of the *UNC5* family members during colon carcinogenesis has not yet been investigated.

Among the molecular elements that could connect nutrition to epigenetic reprogramming in CRC, the nutritional sensor *O*-linked- $\beta$ -N-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAcylation) has emerged during the last decade as a key regulator of chromatin remodeling and thereby of the epigenetic regulation of gene expression [11–14]. *O*-GlcNAcylation is a reversible post-translational modification of nucleocytoplasmic and mitochondrial proteins that consists in the covalent linkage of a unique sugar N-acetylglucosamine (GlcNAc) to serines and threonines of target proteins [15]. *O*-GlcNAcylation levels are regulated by a unique couple of enzymes: OGT (*O*-GlcNAc Transferase) that catalyzes the transfer of GlcNAc from UDP-GlcNAc onto the protein and OGA (*O*-GlcNAcase) that hydrolyzes the residue. *O*-GlcNAcylation levels are closely dependent upon the concentration of UDP-GlcNAc synthesized through the Hexosamine Biosynthesis Pathway (HBP) at the crossroad of glucose, amino acid, fatty acid and nucleotide metabolisms. UDP-GlcNAc and *O*-GlcNAcylation are thus considered as sensors of the nutritional state which can relay the effects of an excessive food supply, unbalanced diet, obesity and other metabolic problems that represent high risk factors of CRC [16–18]. In this sense, through Western Blot analyses, we previously showed that colons from mice fed a High Carbohydrate Diet (HCD) exhibited higher amounts of *O*-GlcNAcylation relative to mice fed a Normal Diet (ND) [19]. Moreover, we and others observed increased contents of *O*-GlcNAcylation and OGT in human colon cancer samples in comparison with normal tissues [19–23]. Contrary, decreasing *O*-GlcNAcylation levels by silencing OGT reduces proliferation, adhesion, migration and anchorage-independent cell growth of colon cancer cell lines [20,24]. Aberrant OGT and *O*-GlcNAcylation levels are thus defined as new CRC hallmarks [25].

*O*-GlcNAcylation is involved in the regulation of many cellular processes, including the epigenetic regulation of gene expression. Indeed, *O*-GlcNAcylation is part of the histone code and OGT interacts with and regulates the DNA demethylases of the Ten-Eleven-Translocation (TET) family and several histone modifying proteins [11–13]. Among this last class of proteins, the members of the Polycomb

Repressive Complex 2 (PRC2) repress the transcription of numerous target genes through the deposit of the repressive chromatin mark H3K27Me3 consisting of trimethylation of lysine 27 on histone H3. The core of PRC2 is composed of three Polycomb group (PcG) proteins: Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), Embryonic Ectoderm Development (EED) and Suppressor of Zeste 12 (SUZ12). The methyl transferase EZH2 is the catalytic subunit of the PRC2 complex and SUZ12 and EED are indispensable for EZH2 enzymatic activity. Several studies have reported abnormally elevated expression of EZH2, EED and SUZ12 in CRC in correlation with advanced stages of the disease and poor prognosis [26–28]. Regulation of EZH2 functions by its O-GlcNAcylation has been evidenced in several studies conducted in different cell lines including breast and colon cancer cells [29–33]. In the colon cancer cell line HT29, O-GlcNAcylated proteins and H3K27 trimethylation were found together at the promoter region of 61 genes [34]. In breast cancer MCF7 cells, a co-regulation by OGT and EZH2 was also evidenced for 16 tumor suppressor genes including *UNC5A* [29]. However, the involvement of this OGT-EZH2 axis in the regulation of the expression of *UNC5A* as well as the other members of the *UNC5A* family in colon cancer cells has not been studied.

Therefore, in this study, we investigated whether nutrition could influence the expression of the *UNC5* family members during colon carcinogenesis and whether it could be related to the OGT-EZH2 axis.

## 2. Results

### 2.1. Subjecting Mice to a High Carbohydrate Diet (HCD) Worsens Colon Carcinogenesis

To test whether nutrition could be involved in the epigenetic downregulation of *UNC5* receptors during colon carcinogenesis, we subjected C57BL/6J mice either to a Normal Diet (ND) or to a High Carbohydrate Diet (HCD). Thirty-nine days after the beginning of the different diets, we induced CRC in these mice using the well-characterized azoxymethane (AOM)/dextran sulfate sodium (DSS) method [35] (Figure 1A). At the end of experiment, mice treated with AOM/DSS and fed HCD had a statistically significant higher blood glucose level compared to mice treated with AOM/DSS and fed ND (Supplementary Figure S1A). Moreover, weight loss was observed in mice treated with AOM/DSS and fed HCD (Supplementary Figure S1B) probably due to the severity of the disease in this group of animals. Indeed, we monitored tumor burden via endoscopy (Figure 1B) and observed that mice fed HCD had a higher number of tumors than the control group (Figure 1C) with a higher number of grade 5 tumors (Figure 1D) observed in 100% of mice (Figure 1E). We also studied the expression of *c-myc* and *cyclin D1*, two well-known target genes of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, whose activity is commonly upregulated in CRC. As expected, both *c-myc* and *Cyclin D1* transcripts were increased in tumors in mice fed ND compared to the control group (Figure 1F, compare ND vs. ND + AOM/DSS). Interestingly, the High Carbohydrate Diet caused an even greater increase in *c-myc* and *Cyclin D1* expression (Figure 1F, compare ND + AOM/DSS vs. HCD + AOM/DSS). Moreover, in mice treated with AOM/DSS in conjunction with the HCD, we also observed a clear decrease in colon length compared to mice fed ND (Figure 1G,H) and an increase in *Cox-2* and *I $\kappa$ B $\alpha$*  mRNA levels (that indicates activation of the NF- $\kappa$ B pathway) (Figure 1F) thus reflecting a higher level of inflammation in these mice. Taken together, these results demonstrate, as we might expect, that the High Carbohydrate Diet worsens inflammation-driven colon carcinogenesis in mice.

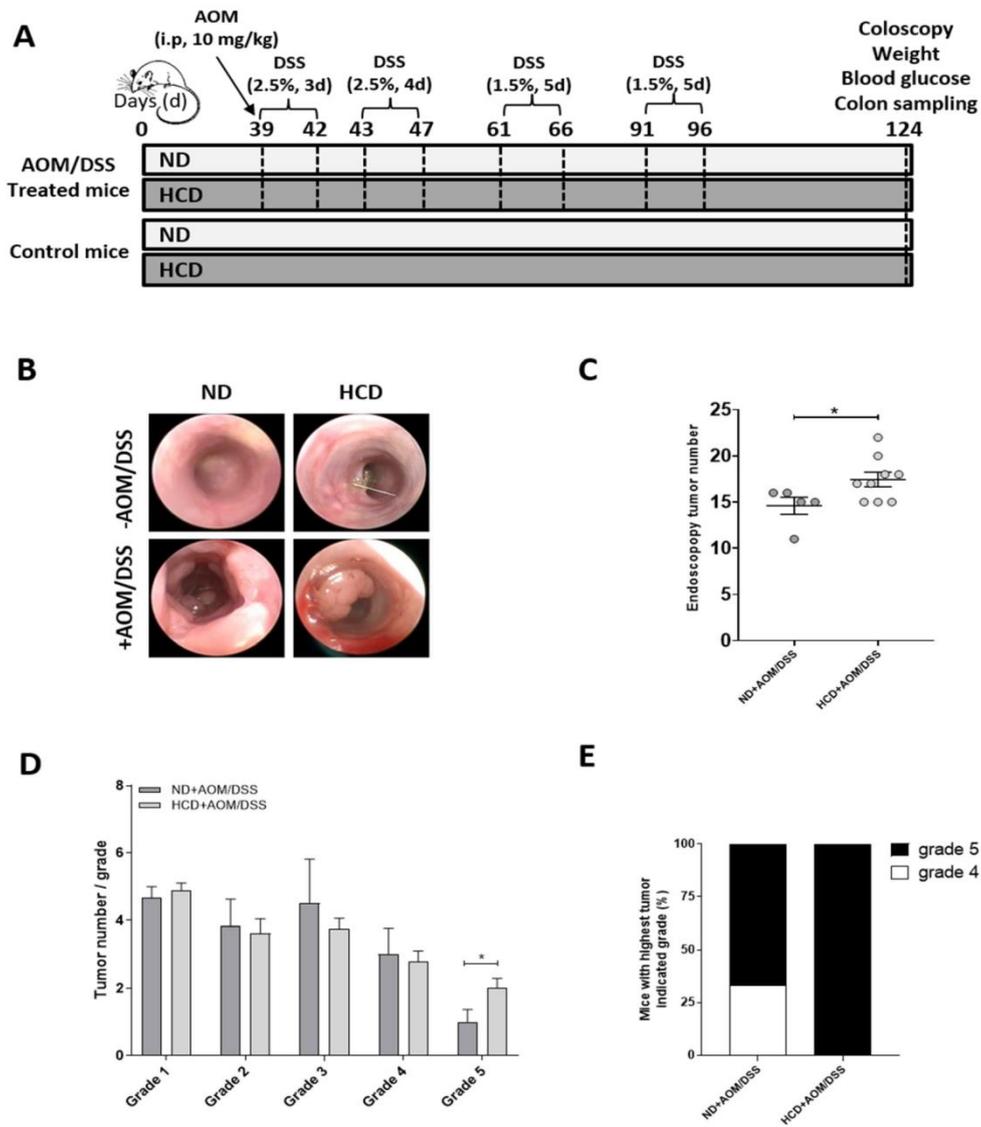
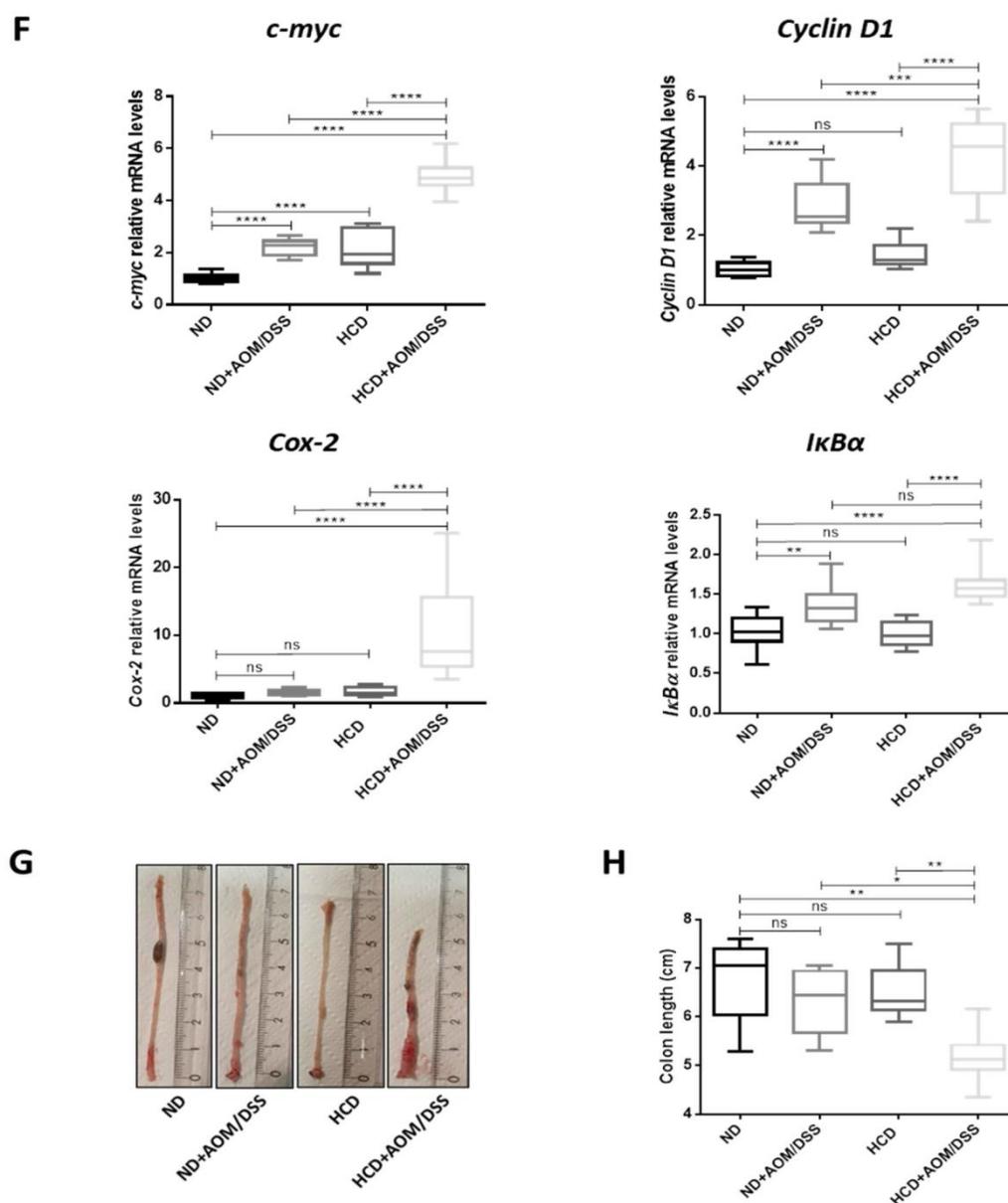


Figure 1. Cont.



**Figure 1.** Subjecting mice to a High Carbohydrate Diet (HCD) worsens colon carcinogenesis. (A) Experimental protocol. Half of the C57BL/6J mice were subjected to a Normal Diet (ND) and the other half to a High Carbohydrate Diet (HCD). Thirty-nine days after the beginning of the two diets, half of the experimental animals received a single intraperitoneal injection of azoxymethane (AOM, 10 mg/kg) and they began to receive 2.5% dextran sulfate sodium (DSS) in drinking water for 3 consecutive days followed by drinking water for 1 day. Mice were then submitted to three additional cycles of DSS (4 days with 2.5% DSS for the first one and 5 days with 1.5% DSS for the two others) with a resting period of 14 days between each cycle. Animals were sacrificed 85 days after AOM injection (day 124). At this time, each group contained the following number of animals: ND (n = 5), ND + AOM/DSS (n = 6), HCD (n = 7) and HCD + AOM/DSS (n = 9). At day 124, tumor burden was

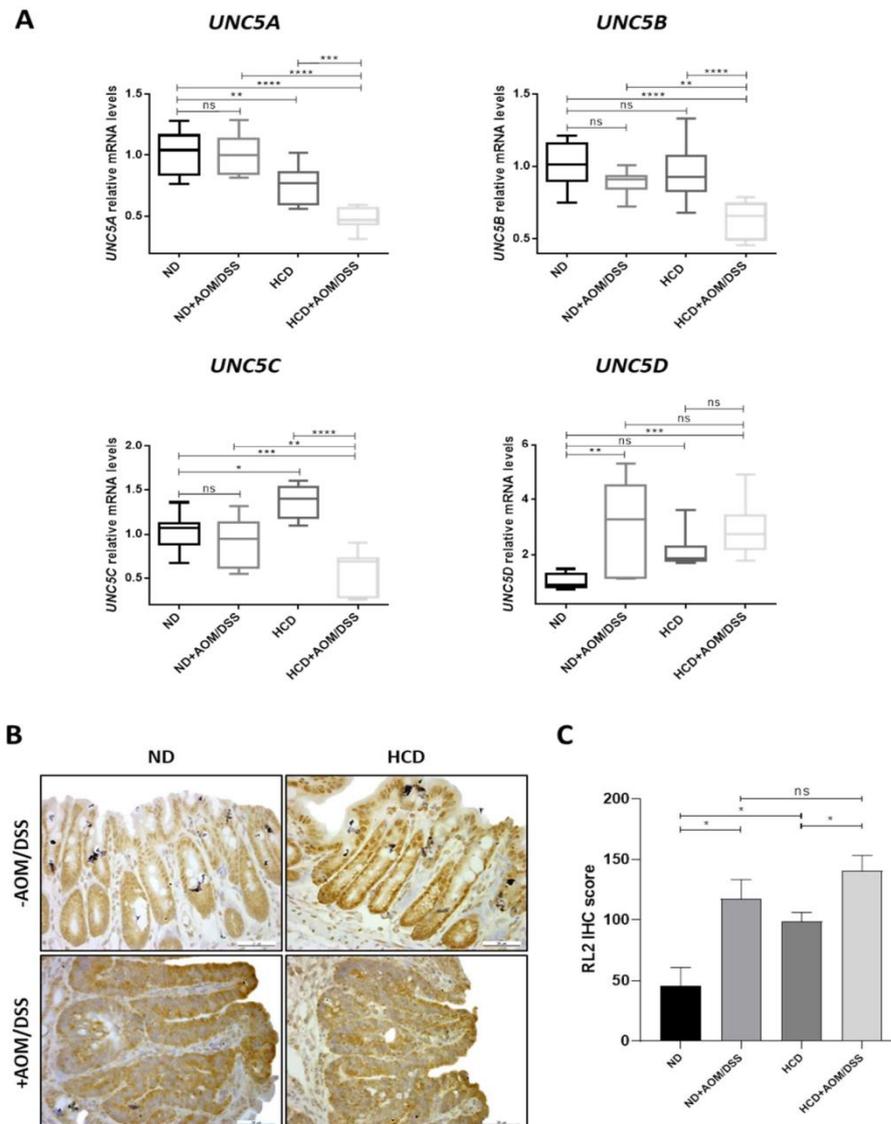
monitored via endoscopy (B) and the total tumors numbers (C), the number of tumors per grade (D) and the percentage of mice ranked by the most severe grade (E) were then determined. \*  $p < 0.05$ : student's *t*-test. (F) Relative expression of c-myc, Cyclin D1, Cox-2 and Ikb $\alpha$  were assessed by RT-qPCR. Values are normalized to RPLP0. ns: non-significant, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ : Bonferroni's multiple comparisons test. (G–H) Colon length was determined just after surgery. ns: non-significant, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ : Bonferroni's multiple comparisons test.

### 2.2. *UNC5A, UNC5B and UNC5C Expression Is Downregulated in Colon Tumors Only in Mice Subjecting to the High Carbohydrate Diet*

We then examined the colonic expression of UNC5A, UNC5B, UNC5C and UNC5D by RT-qPCR analysis (Figure 2A). Surprisingly and in disagreement with their tumor suppressor gene status, we did not observe any difference in the expression of UNC5A, UNC5B, and UNC5C between control group (ND) and AOM/DSS group under Normal Diet (ND + AOM/DSS) and UNC5D was found to increase (Figure 2A). These results suggest that downregulation of these family of genes is not necessary for CRC emergence. In contrast, our results showed a marked decrease in the level of UNC5A, UNC5B and UNC5C transcripts in the colon of AOM/DSS treated mice fed HCD (Figure 2A, compare ND or ND + AOM/DSS vs. HCD + AOM/DSS) strongly suggesting that nutrition is involved in the epigenetic downregulation of these genes that might occur during the progression of CRC.

### 2.3. *O-GlcNAcylation Levels Are Enhanced in Colon from Mice Fed HCD and in Response to AOM/DSS Treatment*

To test whether O-GlcNAcylation could be one of the molecular relays between this nutrition-dependent downregulation of UNC5A, UNC5B and UNC5C in AOM/DSS treated mice fed HCD, we performed immunohistochemistry experiments (Figure 2B,C). A 2.5 fold increase in IHC (Immunohistochemistry) score in tumors compared to normal tissues were observed in mice fed ND thus demonstrating that enhanced O-GlcNAcylation levels seem to be also a hallmark of CRC in mice (Figure 2B,C, compare ND vs. ND + AOM/DSS). In non-tumorigenic mice colons, the results showed that the HCD caused a 2 fold increase in colonic O-GlcNAcylation levels compared to the normal diet (Figure 2B,C, compare ND vs. HCD) thus confirming our previous work [19]. In addition, O-GlcNAcylation levels are further increased when the HCD is combined to the AOM/DSS treatment (Figure 2B,C, compare HCD vs. HCD + AOM/DSS). Nevertheless, the O-GlcNAcylation levels are not statistically higher in tumorigenic mice fed HCD compared to ND. This last observation argues against a direct link between O-GlcNAcylation levels and the downregulation of the members of the UNC5 family observed in tumorigenic mice fed HCD. However, and in an inverse correlation with the O-GlcNAcylation levels, our results show that subjecting mice to the High Carbohydrate Diet is sufficient to decrease the expression of UNC5A but not of the other members of the UNC5 family in non-tumorigenic mice colons (Figure 2A, compare ND vs. HCD) and that this decrease in UNC5A transcripts is even greater in mice treated with AOM/DSS and subjected to the HCD (Figure 2A, compare HCD vs. HCD + AOM/DSS). Therefore, we hypothesized that O-GlcNAcylation could be one of the molecular relays between High Carbohydrate Diet and downregulation of the colonic expression of UNC5A exclusively.

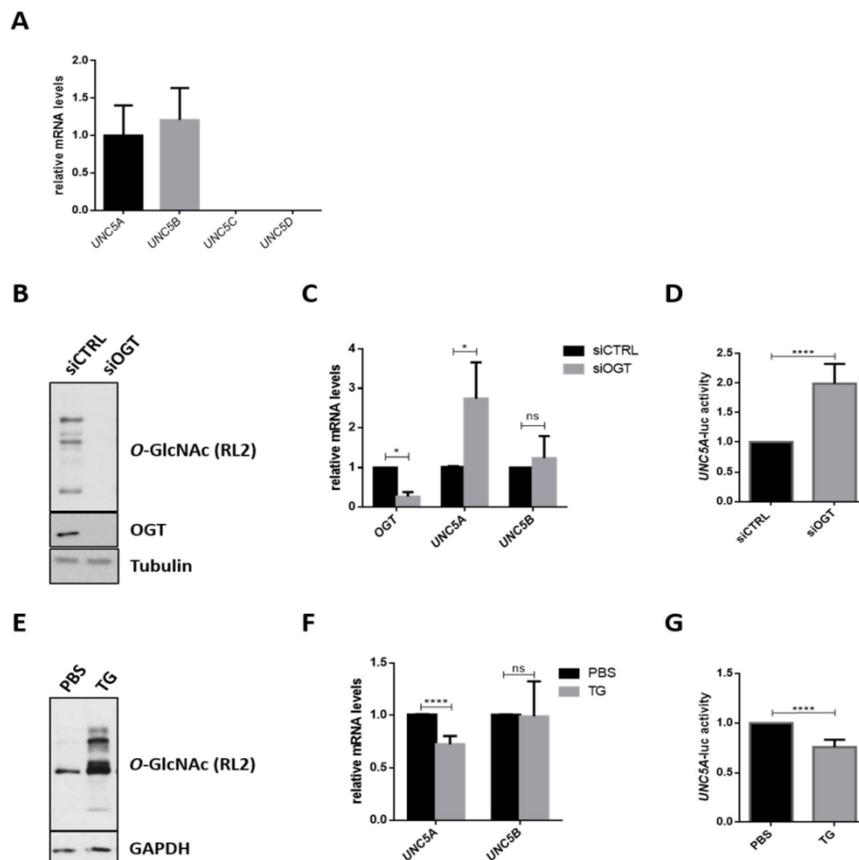


**Figure 2.** *UNC5A*, *UNC5B* and *UNC5C* expression is downregulated in colon tumors only in mice subjected to a High Carbohydrate Diet in association with an increase in O-GlcNAcylation levels. (A) Relative expression of *UNC5A*, *UNC5B*, *UNC5C* and *UNC5D* were assessed by RT-qPCR in the colon of mice fed a normal diet (ND) or a High Carbohydrate Diet (HCD) in combination or not with AOM/DSS. Values are normalized to RPLP0. ns: non-significant; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ : Bonferroni's multiple comparisons test. (B) Tissue samples processed for immunohistochemistry staining of RL2. Pictures shown are representative of two sections per mouse. (C) IHC score performed in (B) was scored as described in the methods section and plotted as mean  $\pm$  sem. \*  $p < 0.05$ : unpaired *t*-test.

#### 2.4. O-GlcNAcylation Is Involved in the Regulation of *UNC5A* Gene Expression in Human Colon Cancer HCT116 Cells

To evaluate the role of O-GlcNAcylation in the epigenetic downregulation of the *UNC5* family, we first examined the expression of *UNC5A*, *UNC5B*, *UNC5C* and *UNC5D* transcripts in the human

colon cancer cell line HCT116 (Figure 3A). We detected significant levels of only *UNC5A* and *UNC5B* transcripts. We then investigated the effect of the knock-down of OGT by siRNA on the levels of the *UNC5* family members in this cell line. siOGT efficiency was checked at protein (Figure 3B) and mRNA level (Figure 3C) and we found that it induced a significant increase in *UNC5A* mRNA levels but had no effect on *UNC5B* (Figure 3C). Moreover, *UNC5C* and *UNC5D* transcripts remained undetectable upon OGT silencing (Decourcelle, A.; Dehennaut, V.; Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277—CANTHER—Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France. Personal observation, 2020.). This first observation supports our hypothesis that *O*-GlcNAcylation is only involved in the regulation of the expression of *UNC5A* but not of the other members of the family. mRNA amounts can be regulated either at the transcriptional level or at the post-transcriptional level (mRNA stability). In order to investigate whether siOGT-induced increase of *UNC5A* expression was due to transcriptional regulation, we used a previously described *UNC5A* promoter activity reporter plasmid [36,37] in luciferase assay. As shown in Figure 3D, siOGT caused a 2-fold induction of the *UNC5A* promoter activity correlated with a decrease in *O*-GlcNAcylation levels (Figure 3B). Inversely, treating HCT116 cells with the potent OGA inhibitor Thiamet G (TG) induced an *O*-GlcNAcylation increase (Figure 3E) correlated with a drop of 25% in *UNC5A* mRNA levels (Figure 3F) and promoter activity (Figure 3G). In contrast, Thiamet G treatment has no effect on *UNC5B* mRNA levels (Figure 3F). Taken together, these data demonstrate that *O*-GlcNAcylation is involved in the regulation of the transcription of colonic *UNC5A*.



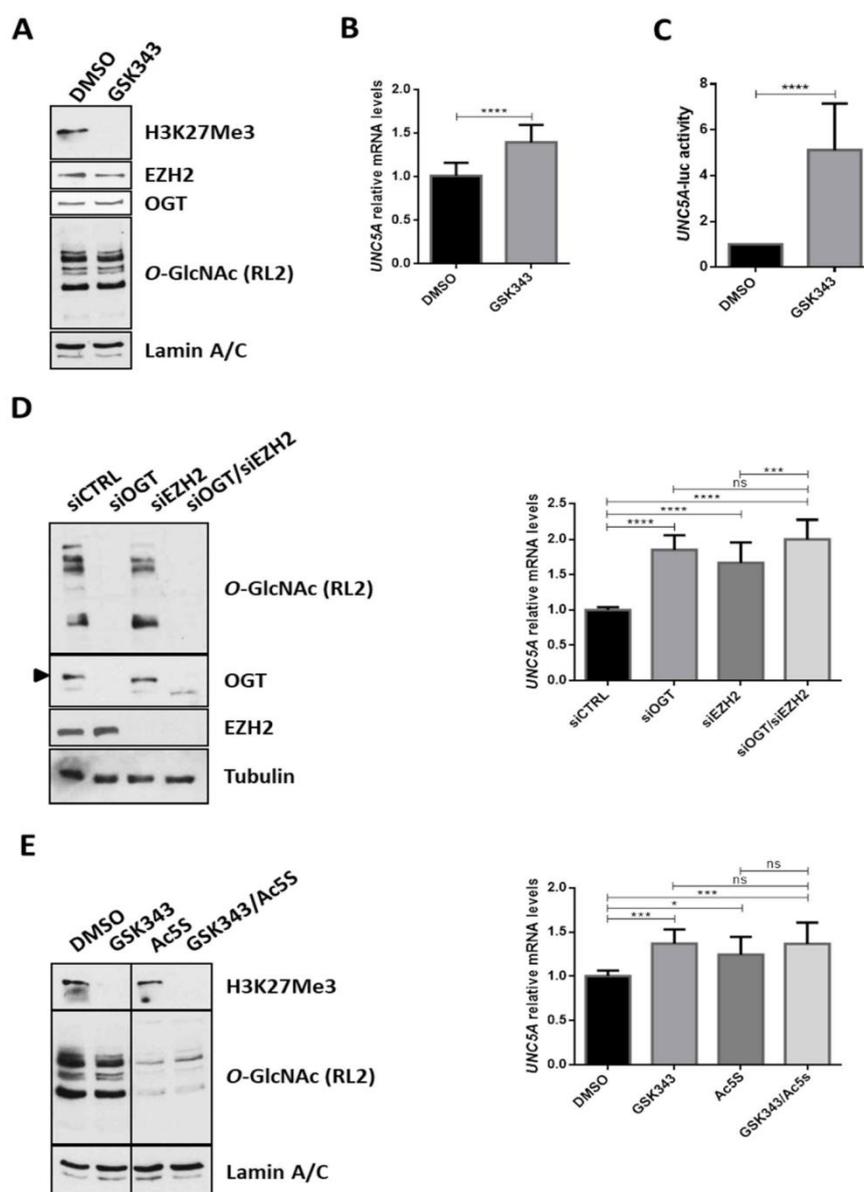
**Figure 3.** *O*-GlcNAcylation is involved in the regulation of the transcription of *UNC5A* in human colon cancer HCT116 cells. (A) Expression of the four members of the *UNC5* gene family (*UNC5A*, *UNC5B*,

*UNC5C* and *UNC5D*) was analyzed by RT-qPCR in HCT116 cells. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. (B–D) HCT116 cells were transfected with non-target control siRNA (siCTRL) or with OGT siRNA (siOGT) for 72 h. (B) To ensure siRNA efficiency, a fraction of the cell lysates was analyzed by Western blot (WB) with anti-O-GlcNAc (RL2) and anti-OGT antibodies. Tubulin was used as a loading control. Data shown are representative of three independent experiments. (C) Cells were harvested for total RNA extraction. The mRNA expression levels of OGT, *UNC5A* and *UNC5B* were assessed by RT-qPCR. Values were normalized to *RPLP0*. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. ns: non-significant, \*  $p < 0.05$ : unpaired *t*-test. (D) Then, 24 h after siRNA transfection, cells were transfected with 200 ng of an *UNC5A* promoter activity reporter plasmid and 25 ng of  $\beta$ -galactosidase reporter. Thus, 48 h later, *UNC5A*-luciferase activity was determined as described in the experimental procedures section. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ : unpaired *t*-test. (E–G) HCT116 cells were treated with the OGA inhibitor Thiamet G (TG) (1  $\mu$ M final in PBS (Phosphate Buffered Saline)) for 24 h. (E) Treatment efficiency was ensured by WB analyses of O-GlcNAcylation (RL2) levels. GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was used as a loading control. Data shown are representative of three independent experiments. (F) mRNA expression level of *UNC5A* and *UNC5B* were assessed by RT-qPCR. Values were normalized to *RPLP0*. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ : unpaired *t*-test. (G) Cells were transfected with 200 ng of an *UNC5A* promoter activity reporter plasmid and 25 ng of  $\beta$ -galactosidase reporter. Following this, 24 h later, cells were treated with TG (1  $\mu$ M final in PBS) for 24 h. *UNC5A*-luciferase activity was determined as described in the experimental procedures section. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ : unpaired *t*-test.

#### 2.5. O-GlcNAcylation Regulates the PRC2-Mediated Repression of *UNC5A* in Human Colon Cancer Cells

As mentioned in the introduction section, several members of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), including the histone methyl transferase EZH2, are overexpressed in CRC [26–28]. Moreover, several studies have demonstrated that OGT and O-GlcNAcylation regulate EZH2 functions [29–33]. Next, we wondered whether the PRC2 complex was also involved in the regulation of *UNC5A* transcription in colon cancer cells. To answer this question, we first inhibited the methyl transferase activity of EZH2 in HCT116 cells with GSK343, a selective SAM (S-adenosyl methionine)-competitive EZH2 inhibitor (Figure 4A) and analyzed the levels of *UNC5A* mRNA (Figure 4B) and promoter activity (Figure 4C). GSK343 clearly diminished the level of H3K27 trimethylation in cells (Figure 4A) and increased *UNC5A* expression (Figure 4B) and promoter activity (Figure 4C). These first results thus suggest that EZH2 is also involved in the regulation of *UNC5A* expression in HCT116 cells. To confirm this result, we performed siRNA knockdown of EZH2 alone or in combination with siOGT in HCT116 cells and analyzed the levels of *UNC5A* mRNA (Figure 4D). We first observed that siEZH2 induced a derepression of *UNC5A* expression in line with the results obtained with GSK343 inhibitor. Moreover, siEZH2 increased *UNC5A* transcripts at a level similar to siOGT and the simultaneous knockdown of OGT and EZH2 had no additive effect compared to siEZH2 or siOGT alone. It is also to note that the abolition of the expression of EZH2 or the inhibition of its catalytic activity had no effect on OGT expression nor on O-GlcNAcylation levels (Figure 4A,D,E) arguing against an indirect modulation of *UNC5A* expression through the modulation of OGT functions in these conditions. This last result thus suggests that OGT and EZH2 act together to repress *UNC5A* transcription. We confirmed this result by inhibiting OGT and/or EZH2: respectively with Ac5S-GlcNAc (Ac5S) and GSK343 specific inhibitors (Figure 4E) and validated them also in LS174T human colorectal cancer cell line (Supplementary Figure S2). We then overexpressed the catalytic core of PRC2 complex (composed of EZH2, SUZ12 and EED) in HCT116 cells by co-transfecting cells with plasmids encoding Myc-EZH2, HA-SUZ12 and HA-EED (Figure 5A, EES). In PRC2-transfected cells, we observed a 40% reduction of the *UNC5A* promoter activity compared to mock-transfected ones (Figure 5A, right panel) thus confirming that *UNC5A* is a target of the PRC2 complex. However, this repression was no longer

observed in cells co-transfected with siOGT suggesting that O-GlcNAcylation is required for the PRC2-mediated repression of *UNC5A*. In a second set of experiments, we again overexpressed the core PRC2, this time in conjunction with treatment of the HCT116 cells with Ac5S-GlcNAc. We then analyzed the *UNC5A* mRNA levels by RT-qPCR (Figure 5B). In agreement with the luciferase activity assay, overexpression of the core PRC2 led to a decrease in *UNC5A* mRNA and this was prevented by simultaneous treatment of cells with Ac5S-GlcNAc (Figure 5B, right panel). Taken together, these results demonstrate that O-GlcNAcylation regulates the PRC2-mediated repression of *UNC5A* in human colon cancer cells.



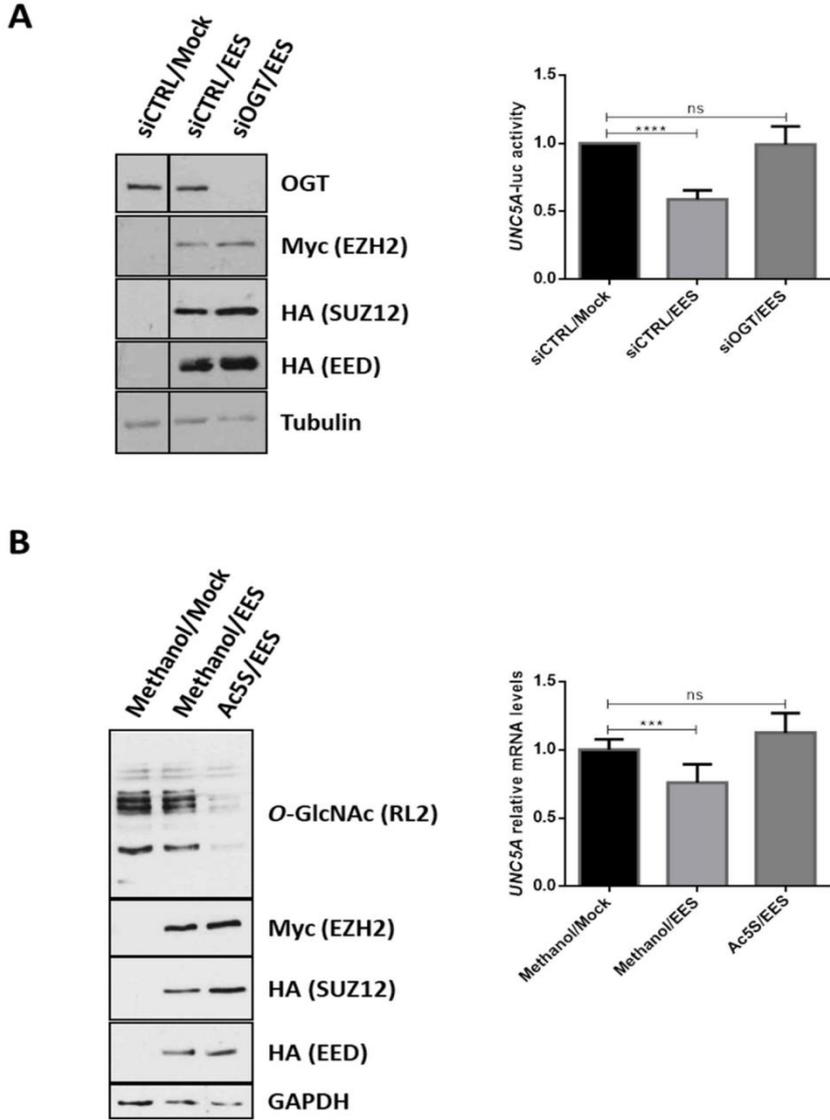
**Figure 4.** EZH2 and OGT act together to repress the transcription of *UNC5A* in colon cancer cells. (A,B) HCT116 cells were treated with the EZH2 inhibitor GSK343 (5  $\mu$ M final in DMSO (Dimethyl sulfoxide)) for 48 h. (A) Treatment efficiency was ensured by WB analyses of H3K27Me3 levels from

chromatin-bound proteins extracts. EZH2, OGT and O-GlcNAcylation (RL2) levels were also assessed. Lamin A/C were used as a loading control. Data shown are representative of three independent experiments. (B) mRNA expression level of *UNC5A* was assessed by RT-qPCR. Values were normalized to *RPLP0*. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ : unpaired *t*-test. (C) Cells were transfected with 200 ng of an *UNC5A* promoter activity reporter plasmid and 25 ng of  $\beta$ -galactosidase reporter. Thus, 6 h later, cells were treated with GSK343 (5  $\mu$ M final in DMSO) for 48 h. *UNC5A*-luciferase activity was determined as described in the experimental procedures section. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ : unpaired *t*-test. (D) HCTT116 cells were transfected either with non-target siRNA control (siCTRL), OGT siRNA (siOGT), EZH2 siRNA (siEZH2) or with a combination of siOGT and siEZH2 for 72 h. Cells were harvested either for total proteins or RNA extraction. Left panel: WB analyses were performed using the indicated antibodies. Data shown are representative of five independent experiments. Right panel: mRNA expression level of *UNC5A* was assessed by RT-qPCR. Values were normalized to *RPLP0*. Data shown are the average  $\pm$  SD of five independent experiments. ns: non-significant, \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ : Bonferroni's multiple comparisons test. (E) HCTT116 cells were treated with the EZH2 inhibitor GSK343 (5  $\mu$ M final in DMSO) or the OGT inhibitor Ac5S-GlcNAc (50  $\mu$ M final in DMSO) alone or in combination. Cells were harvested either for total protein or RNA extraction. Left panel: WB analyses of Lamin A/C, H3K27Me3 and O-GlcNAcylation levels from chromatin-bound proteins extracts. Data shown are representative of four independent experiments. Right panel: amount of *UNC5A* transcripts was assessed by RT-qPCR. Values were normalized to *RPLP0*. Data shown are the average  $\pm$  SD of four independent experiments. ns: non-significant, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ : Bonferroni's multiple comparisons test.

#### 2.6. O-GlcNAcylation Drives the Recruitment of EZH2 onto the *UNC5A* Promoter

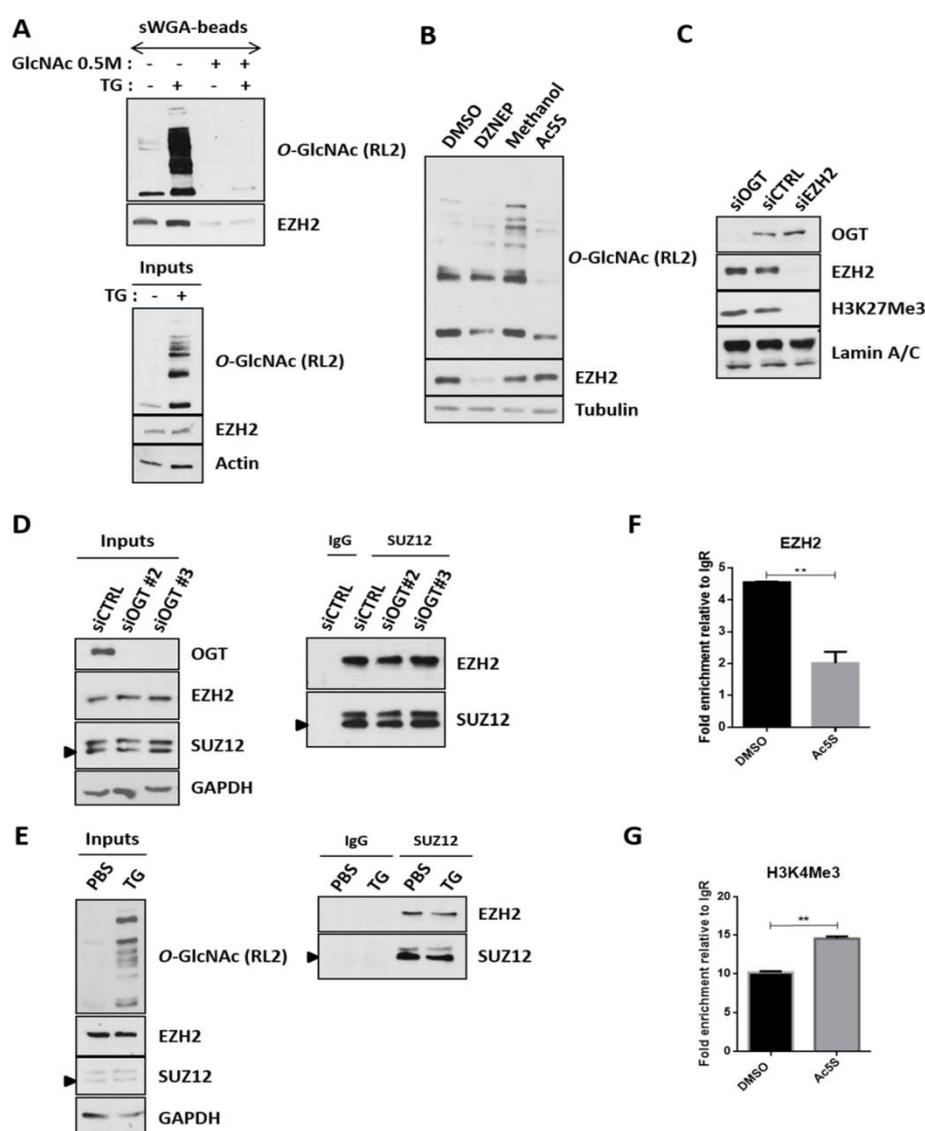
We then investigated the mechanisms by which O-GlcNAcylation could influence the EZH2 mediated-repression of *UNC5A*. Indeed, regulation of EZH2 functions by its O-GlcNAcylation has been evidenced in several studies conducted in different cell lines but the exact roles of this glycosylation are not so clear. Indeed, while some studies argue for a role of O-GlcNAcylation in the regulation of EZH2 stability and catalytic activity [29–31], others propose that the glycosylation rather regulates EZH2 recruitment to some of its target genes such as *FOXC1* in breast cancer cells [32] or *IL-15* in muscle [33]. First, we checked the modification of endogenous EZH2 by O-GlcNAcylation in HCT116 cells by sWGA (succinyl Wheat Germ Agglutinin)-beads enrichment experiments (Figure 6A). Briefly, HCT116 cells were treated with Thiamet G for 24 h to maintain high O-GlcNAcylation levels in the cells (Figure 6A, bottom panel). Total cell lysates were incubated with sWGA-beads to extract O-GlcNAcyated proteins or, as a negative control, with sWGA-beads preincubated with free GlcNAc (Figure 6A, top panel). EZH2 was easily detected in the sWGA-enriched fractions (with or without TG) but not in the negative controls thus proving O-GlcNAcylation of EZH2 in HCT116 cells. Inhibition of OGT activity by Ac5S-GlcNAc did not affect EZH2 expression, whereas DZNEP, a well-known EZH2 destabilizing agent, did (Figure 6B). Similarly, the suppression of OGT expression by siRNA did not lead, as might be expected, to a decrease in EZH2 protein levels (Figures 4D and 6C,D Inputs). In addition, increasing O-GlcNAcylation levels with Thiamet G did not lead to any variation in EZH2 expression (Figure 6A,E Inputs). All these results therefore do not argue for a stabilizing role of O-GlcNAcylation in our study model. O-GlcNAcylation also does not seem to influence the methyltransferase activity of EZH2 in this cell line since the inhibition of OGT activity or expression had no impact on the levels of H3K27Me3, the epigenetic mark deposited by the PRC2 complex (Figures 4E and 6C). Among the EZH2 O-GlcNAcylation sites identified to date, Ser<sup>313</sup> is located in the domain of interaction with SUZ12 [38]. Nevertheless, co-immunoprecipitation experiments between EZH2 and SUZ12 carried out in HCT116 cells under O-GlcNAcylation levels modulation conditions showed that this post-translational modification did not seem to influence the interaction between these two partners (Figure 6D,E). We finally analyzed whether O-GlcNAcylation could drive

the recruitment of the PRC2 complex onto the *UNC5A* promoter. To test this hypothesis, we performed CUT&RUN experiments (an alternative method to ChIP that also enables mapping of protein-DNA interactions) under conditions of modulation of O-GlcNAcylation levels (Figure 6F,G). In this way, we showed that EZH2 was bound onto the *UNC5A* promoter in HCT116 cells and that inhibition of OGT with Ac5S-GlcNAc clearly diminished its binding (Figure 6F). On the contrary, OGT inhibition led to an increased binding of the H3K4Me3 activating mark on the *UNC5A* promoter (Figure 6G). So, taken together, our overall results demonstrate that in colon cancer cells, O-GlcNAcylation of EZH2 targets the PRC2 complex onto the *UNC5A* promoter to inhibit its transcription.



**Figure 5.** O-GlcNAcylation mediates the PRC2-mediated repression of *UNC5A*. (A) HCT116 cells were co-transfected with the core PRC2 complex (EES: Myc-EZH2, HA-EED, HA-SUZ12), 200 ng of plasmid encoding the luciferase reporter gene under the control of the *UNC5A* promoter and 25 ng of  $\beta$ -galactosidase in combination or not with siOGT. Left panel: transfection efficiency and OGT inhibition

were checked by WB analyses with the indicated antibodies. Data shown are representative of three independent experiments. Right panel: luciferase activity was determined 48 h later and was normalized to  $\beta$ -galactosidase activity. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. ns: non-significant, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ : Bonferroni's multiple comparison tests. **(B)** Cells were co-transfected with plasmids encoding the core PRC2 (EES: Myc-EZH2, HA-EED, HA-SUZ12), or with empty vectors (Mock). Thus, 24 h after transfection, cells were treated with the potent OGT inhibitor Ac5s-GlcNAc (50  $\mu$ M final in methanol) for 24 h. Left panel: transfection efficiency and OGT inhibition were checked by WB analyses with the indicated antibodies. Data shown are representative of three independent experiments. Right panel: mRNA expression level of *UNC5A* was assessed by quantitative RT-PCR. Values were normalized to RPLP0. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. ns: non-significant, \*\*\*  $p < 0.001$ : Bonferroni's multiple comparison tests.



**Figure 6.** In colon cancer cells, O-GlcNAcylation neither influences EZH2 stability, methyltransferase activity nor its interaction with SUZ12 but drives the PRC2 recruitment onto the *UNC5A* promoter.

(A) Enrichment of the *O*-GlcNAcylated proteins from Thiamet G-treated (1  $\mu$ M final in PBS, 24 h) or non-treated cells were performed with sWGA-agarose beads as described in the experimental procedures section. In total, 25  $\mu$ g of whole cell lysates (Inputs) and bound proteins were analyzed by WB with anti-EZH2 and anti-*O*-GlcNAc (RL2) antibodies. Actin was used as a loading control. Data shown are representative of two independent experiments. (B) HCT116 cells were treated with the EZH2 destabilizing agent DZNEP (3-Deazaneplanocin A) (5  $\mu$ M final in DMSO) or the OGT inhibitor Ac5S-GlcNAc (50  $\mu$ M final in methanol) respectively for 48 h or 24 h. WB analyses were performed using the indicated antibodies. Tubulin was used as a loading control. Results are representative of at least three independent experiments. (C) HCT116 cells were transfected either with non-target siRNA control (siCTRL) or siRNA targeting OGT (siOGT) or EZH2 (siEZH2, used as a positive control) for 72 h. Chromatin-bound proteins were extracted and WB analyses were performed using the indicated antibodies. Lamin A/C were used as a loading control. Results are representative of at least three independent experiments. (D–E) HCT116 cells were transfected with 2 different OGT-targeting siRNA (siOGT#2 or siOGT#3) or a non-relevant siRNA (siCTRL) for 72 h (D) or were treated with 1  $\mu$ M Thiamet G for 24 h (E). The interaction between SUZ12 and EZH2 was then evaluated by co-immunoprecipitation experiments. Results are representative of three independent experiments. (F–G) HCT116 cells were treated with the OGT inhibitor Ac5S-GlcNAc (50  $\mu$ M final in DMSO) for 24 h. Then binding of EZH2 (F) as well as presence of the H3K4Me3 activating mark (G) onto the *UNC5A* promoter were assessed by CUT&RUN experiments. Data shown represent the fold enrichment relative to the isotype control (Rabbit IgG) of a single experiment deposited in duplicate and is representative of two independent experiments. \*\* $p < 0.01$ : unpaired *t*-test.

### 3. Discussion

In recent decades, changes in Western lifestyle (increased sedentary not compensated by a decrease in caloric intake) have largely contributed to the increased incidence of CRC. In this regard, several epidemiological studies have shown that there is a higher risk factor for developing CRC in patients with metabolic syndrome, type-2 diabetes or obesity [16–18]. In addition to the well-known genetic origin of CRC, many studies have shown that colon carcinogenesis also involves alterations in the epigenetic regulation of genome. Furthermore, a growing number of studies tends to prove that the epigenome is able to integrate nutritional informations and it seems therefore obvious that nutritional intake, by modifying the epigenome, could influence the emergence and progression of CRC [1–3]. However, the underlying mechanisms are still insufficiently known. The nucleotide sugar UDP-GlcNAc, donor for the *O*-GlcNAc modification, is synthesized through the Hexosamine Biosynthesis Pathway (HBP) at the crossroad of glucose, amino acid, fatty acid and nucleotide metabolisms. UDP-GlcNAc and *O*-GlcNAcylation are therefore considered as sensors of the nutritional state of the organism [15] which can relay the effects of an excessive food supply, unbalanced diet, obesity and other metabolic problems. It has been previously shown that the expression of the core PRC2 complex (EZH2, EED and SUZ12) that catalyzes the deposit of the epigenetic repressive mark H3K27Me3 [26–28] as well as OGT and *O*-GlcNAcylation levels are increased during colorectal carcinogenesis [19–22]. Inversely, the expression of the tumor suppressor genes of the *UNC5* family is frequently downregulated in CRC in part through epigenetic mechanisms not fully deciphered [6–10]. In this study, in agreement with the fact that poor eating habits may influence colon carcinogenesis, we observed that consumption of a High Carbohydrate Diet (HCD) worsens colon carcinogenesis in mice. In this model, we found that the expression of *UNC5A*, *UNC5B* and *UNC5C* was diminished in tumors of mice only fed HCD but not of mice fed ND thus linking nutrition to their repression during the progression of CRC. We then tested the hypothesis that *O*-GlcNAcylation could be one of the molecular relays between this nutrition-dependent repression of *UNC5A*, *UNC5B* and *UNC5C*. Our *in vivo* and *in vitro* results argued against a direct correlation between *O*-GlcNAcylation levels and expression of *UNC5B* and *UNC5C* but strongly suggested a more direct link between *O*-GlcNAcylation and *UNC5A* expression. Mechanistically, we provide evidences that the *O*-GlcNAcylated form of EZH2 prevents the transcription of *UNC5A*

in human colon cancer cells through aberrant *O*-GlcNAcylation and abnormal targeting of the PRC2 complex onto its promoter, thus linking nutrition to downregulation of *UNC5A* in CRC. However, further work will be required to understand the molecular link between nutrition and epigenetic regulation of the other members of the *UNC5* family.

*O*-GlcNAcylation of EZH2 had already been described in several cell lines but the functions of this post-translational modification are still unclear. In fact, some studies conclude that *O*-GlcNAcylation regulates EZH2 stability and methyltransferase activity [29–31,38] while others tempt to demonstrate that it rather steers the PRC2 complex onto specific loci [32,33]. Here, we confirmed the previously described *O*-GlcNAcylation of EZH2 in the colon cancer cell line HCT116. In our hands, *O*-GlcNAcylation does not seem to affect either stability or catalytic activity of EZH2 but appears to regulate the binding of EZH2 at specific loci including the *UNC5A* promoter in colon cancer cells.

*UNC5* receptors belong to the family of the so-called “dependence receptors”. Such receptors initiate two opposite signaling pathways. When ligand (Netrin-1 for *UNC5*) is available, these receptors transduce a “positive signal” leading to cellular proliferation, differentiation, migration or survival. In absence of their ligand, they are still active but rather induce a “negative signal” that triggers caspase-dependent apoptosis [5]. Several studies have demonstrated that constitutive inhibition of the death signal induced by these receptors contributes to cell transformation. Conversely, their re-expression could represent a protective mechanism that limits tumor development through apoptosis induction of tumor cells, thus defining the members of the *UNC5* family as tumor suppressor genes. For example, in mice, inactivation of *UNC5C* is associated with increased intestinal tumor progression and decreased tumor cell apoptosis [8]. In human cancer cells, enforced expression of *UNC5A*, *UNC5B* and *UNC5C* inhibits cell-anchorage growth and invasion in a way related to their pro-apoptotic activity [7]. *UNC5A*, *UNC5B* and *UNC5D* are transcriptionally regulated by the tumor suppressor p53 and are involved in the p53-dependent apoptosis in response to DNA damages induced by conventional chemotherapeutic drugs like doxorubicin [39–42]. However, in an elegant paper, Paradisi et al. demonstrated, in a variety of cancer cell lines, that doxorubicin, 5-fluorouracil, paclitaxel and cisplatin treatments induced not only an increase of *UNC5* receptors but also a concomitant p53-dependent increase of Netrin-1 thus preventing the pro-apoptotic action of *UNC5* receptors [43]. In the same study, the authors also showed that interfering with Netrin-1 expression by siRNA or using two Netrin-1/Netrin-1 receptor inhibitors of interaction (TRAP-netrin<sup>DCC</sup>, TRAP-netrin<sup>UNC5A</sup>) potentiates doxorubicin induced cell death. According to these results, they proposed Netrin-1 upregulation as a survival mechanism of cancer cells in response to these drugs. Netrin-1 interference combined to conventional therapies has been then envisaged as a promising therapeutic approach for tumors resistant to chemotherapy. Interestingly, we observed that the siRNA knockdown of OGT led to increased *UNC5A* expression but had no effect on *Netrin-1* mRNA levels (data not shown). So, in the near future, it would be of great interest to go further into the mechanisms of transcriptional regulation of *UNC5A* by the *O*-GlcNAcylated form of EZH2 in response to chemotherapy and one could propose targeting with OGT/EZH2 interaction to enhance efficiency of chemotherapy in CRC.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. AOM/DSS-Induced CRC Model

All the procedures were carried out according to the French guidelines for the care of experimental animals and the experimental procedure was approved by the Animal Care Committee of the French Research Ministry (Autor. APAFiS #1879-2018121918307521). Male C57BL/6J mice (n = 28; 8 weeks old; Charles River Saint-Germain sur l'Arbresle) were maintained under controlled room temperature, humidity and light (12/12 h light/dark cycle) with free access to food and tap water. Half of the mice were subjected to a Normal Diet (ND; standard laboratory chow; 16.1% protein, 3.1% lipid, 60.4% NFE (Nitrogen-Free Extract), 4.6% minerals and 3.9% fibers; A04; SAFE) and the other half to a High Carbohydrate Diet (HCD; 13.5% protein, 3.2% lipid, 76.8% NFE, 3.6% minerals, 0.7% cellulose and 1.1%

starch; U8960P version 0002; SAFE) (Figure 1A). Thirty-nine days after the beginning of the two diets, we used the AOM/DSS method to induce inflammation-driven CRC [35]. Animals received a single intraperitoneal injection of azoxymethane (AOM, 10 mg/kg, A5486 Sigma) and they began to receive 2.5% dextran sulfate sodium (DSS, 0216011080 MP Biomedicals) in drinking water for 3 consecutive days followed by drinking water for 1 day. Mice were then submitted to three additional cycles of DSS (4 days with 2.5% DSS for the first one and 5 days with 1.5% DSS for the two others) with a resting period of 14 days between each cycle. Weight and blood glucose levels were monitored every 2 weeks during all the time course of the experiment. At the end of the experiment, tumor burden was monitored via endoscopy and colons were collected and washed in Phosphate Buffered Saline (PBS). Samples were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further RNA extraction. Part of the samples was also fixed in 10% buffered formalin overnight for further immunohistochemistry (IHC) analysis.

#### 4.2. Assessment of Tumorigenesis Using Colonoscopy

Tumor developments were assessed using a high-resolution Karl Storz colonoscope (1.9 mm outer diameter; Tuttlingen, Germany) at the end of protocol (day 124). Mice were anesthetized using isoflurane for the duration of the procedure and closely monitored. For tumors assessment we followed the method described by Becker et al. [44]. Tumors observed from colonoscopy videos were counted, measured and categorized into size: grade 1 (very small but detectable tumor), grade 2 (tumor covering up to one eighth of the colonic circumference), grade 3 (tumor covering up to a quarter of the colonic circumference), grade 4 (tumor covering up to half of the colonic circumference) and grade 5 (tumor covering more than half of the colonic circumference).

#### 4.3. Immunohistochemistry Staining and Quantification

After fixation, tissues were embedded in paraffin wax by automatic sample preparation system (LOGOS One, Milestone). Serial histological sections of  $4\ \mu\text{m}$  thickness were cut, deparaffinized and rehydrated. For antigen unmasking, sections were placed in 10 mM sodium citrate buffer pH 6.0 and incubated in a heat induced antigen retrieval chamber for 20 min at  $121^{\circ}\text{C}$ . After washing, sections were blocked for 30 min with 5% BSA (Bovine Serum Albumin) in PBS. The following primary antibody was then incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ : anti-O-GlcNAc (RL2) (NB300-524, Novus Biologicals) used at a concentration 1/1000. After washing, tissue sections were incubated 1 h at room temperature with the specified secondary antibody bound to HRP (Horseradish Peroxidase): Anti-Mouse IgG—Horseradish Peroxidase Linked Species—Specific Whole Antibody (from sheep) (#NA931, GE Healthcare). Samples were washed with PBS and the signal was subsequently revealed with DAB (Diaminobenzidine) (#8059, Cell Signaling). Finally, tissue sections were counterstained with hematoxylin. Images were acquired with a DM5500B microscope (Leica Microsystems, Nanterre, France) and mucosal layers were photographed at a magnification of  $\times 20$ . The assessment of staining was performed using ImageJ software and the IHC score = staining intensity score (low:1, medium:2 and high:3)  $\times$  % of surface staining.

#### 4.4. Cell Culture

HCT116 cells purchased from ATCC were maintained in Mc Coy's 5A (modified) medium with Glutamax (Thermofischer Scientific) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% ZellShield™ (Biovalley). Cells were cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  in water-saturated 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere.

#### 4.5. Inhibitors

The EZH2 inhibitor, GSK343 (Sigma-Aldrich), was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 10 mM as stock solution and used at a final concentration of  $5\ \mu\text{M}$ . The EZH2 destabilizing agent, DZNEP (Sigma-Aldrich), was dissolved in DMSO at 10 mM as stock solution and used at a final concentration of  $5\ \mu\text{M}$ . The OGA inhibitor, Thiamet G (TG, Sigma-Aldrich), was dissolved in PBS at 1 mM as stock solution and used at a final concentration of  $1\ \mu\text{M}$ . The OGT inhibitor, Ac5S-GlcNAc

(Ac5S, kind gift of GW. Hart and D. Vocadlo), was dissolved either in methanol or DMSO depending of their provenance at 50 mM as stock solution and used at a final concentration of 50  $\mu$ M. Inhibitors were added to the cell culture medium for 24 h or 48 h.

#### 4.6. Plasmids and Transfection

The expression vectors for Myc-EZH2, HA-EED and HA-SUZ12 have been previously described (24). Cells were seeded in 6 wells plates and transfected with 330 ng of each plasmid in 5 mL of complete culture medium by the Lipofectamine (Lipo2000, Invitrogen) method (4 $\mu$ L). Cells were harvested 48 h after transfection.

#### 4.7. Small Interfering RNA

HCT116 cells were reverse-transfected with Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to manufacturer's instructions using 5 nM small interfering RNA targeting OGT (siGENOME human OGT siRNA D-019111-01, Dharmacon), EZH2 (EZH2 siGENOME SMART Pool M-004218-03-0005, Dharmacon) or a scrambled control sequence (siCTRL; siGENOME RISC free control siRNA, Dharmacon) as previously described [19]. Seventy-two hours later, cells were harvested for RNA/protein extraction.

#### 4.8. Quantitative RT-PCR

RNA was isolated using Nucleospin<sup>®</sup> RNA mini spin kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. 1 $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed using random primers and MultiScribe<sup>™</sup> reverse transcriptase (Applied Biosystems). Real-time PCR analysis was performed by Power SYBR Green (Applied Biosystems) in a MX3005P fluorescence temperature cycler (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Results were normalized with respect to *RPLP0* mRNA used as internal control. The primers used for the RT-qPCR analyses are summarized in Supplementary Table S1.

#### 4.9. Total and Chromatin-Bound Proteins Extraction, Western Blotting and Antibodies

For total protein extraction, cells were lysed in RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) buffer (10 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and proteases inhibitors added at the time of preparation). For chromatin-bound proteins extraction, subcellular fractionation was performed as described in Füzesi-Levi et al. [45]. Protein concentration was determined using the Micro BCA (Bicinchoninic acid) Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific). Equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare). After 1 h of blocking in PBSM (PBS with 5% milk), the membranes were incubated overnight at 4 °C with specific primary antibodies in PBSTM (PBSM with 0.1% Tween) and washed three times with PBSN (PBS with 0.1% NP-40). The membranes were next incubated for 1 h at room temperature with secondary antibodies coupled to peroxidase (Amersham) in PBSM, washed three times in PBSN and revealed by chemiluminescence.

Mouse monoclonal anti-O-GlcNAc (RL2) was purchased from Life technologies (MA1072). Rabbit polyclonal anti-OGT (DM17) was purchased from Sigma-Aldrich (#O6264). Mouse monoclonal anti-tubulin (sc-23948), mouse monoclonal anti-GAPDH (sc-32223), rabbit polyclonal anti-lamin A/C (sc-20681), rabbit polyclonal anti-actin (sc-1616-R) and rabbit polyclonal anti-Myc (sc-789) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Rabbit polyclonal anti-EZH2 (#5246) and rabbit polyclonal anti-H3K27Me3 (#9733) were purchased from Cell signaling. Rabbit polyclonal anti-SUZ12 was purchased from Abcam (ab12073). Mouse monoclonal anti-HA was purchased from Biologend (MMS-101P). Anti-mouse IgG-HRP was purchased from GE Healthcare (NA931V). Donkey anti-rabbit IgG-HRP was purchased from Millipore (AP182P).

#### 4.10. Luciferase Promoter Activity Assays

The pGI3-UNC5A promoter construct has been kindly provided by A. Paradisi (P. Mehlen team, Cancer research center of Lyon, Lyon, France). HCT116 cells, seeded in 12-wells plates, were transfected with 200 ng of the *UNC5A* promoter activity reporter plasmid and 25 ng of  $\beta$ -galactosidase reporter using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Thus, 48 h after transfection, cells were lysed in Luciferase assay buffer (25 mM glycyl glycine [pH 7.8], 15 mM  $MgSO_4$ , 4 mM EGTA, 1% Triton X-100). Luciferase and  $\beta$ -galactosidase activities were measured by using, respectively, beetle luciferine (Promega) and the Galacto-light kit (Tropix) with a Berthold chemiluminometer. After normalization to the  $\beta$ -galactosidase activity, the data were expressed as the fold-change *UNC5A*-luciferase activity relative to control, which was given an arbitrary value of 1. A fraction of cell lysates was also subjected to Western Blot (WB) analyses to ensure efficiency of cells treatments with siRNA or inhibitors.

#### 4.11. Enrichment of O-GlcNAc-Bearing Proteins with sWGA Immobilized on Agarose BEADS

Cells were lysed in RIPA buffer and protein concentration was determined. For each condition, 2 mg of proteins were incubated either with 50  $\mu$ L of succinylated-Wheat Germ Agglutinin (sWGA) agarose beads (Vector Laboratories) for 2 h at 4 °C or with sWGA beads beforehand incubated with 0.5 M free GlcNAc (to control the specificity of the reaction). sWGA-bound proteins were collected and washed three times with washing buffer (10 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.2% SDS). Proteins were then eluted from the beads in 2X Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl pH6.5, 2.5% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol and a hint of bromophenol blue) and resolved by SDS-PAGE.

#### 4.12. Co-Immunoprecipitation

Twenty-four hours or 72 h respectively after Thiamet G treatment and siRNA transfection, cells were rinsed with cold PBS and lysed with 1 mL of cold IPH (Immunoprecipitation homogenization) buffer (50 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA and 0.5% NP40) supplemented with proteases inhibitors. Cells were put on ice for 15 min and scraped before being placed in rotation at 4 °C for 15 min. Cell lysates were briefly sonicated (22%—2 s). After a centrifugation at 14,000 rpm for 15 min at 4 °C, the supernatant was collected and the protein amount was determined with the Micro BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific). For each condition, 2 mg of proteins were then pre-cleared with 15  $\mu$ L of protein A/G sepharose beads (GE Healthcare) and placed in rotation at 4 °C at least 1 h. Following this pre-clearing stage, cells lysates were incubated with 4  $\mu$ g of SUZ12 antibody (ab12073, Abcam) or with 4  $\mu$ g of Normal Rabbit IgG (#2729, Cell Signaling) on a rotator overnight at 4 °C. Thereafter, 20  $\mu$ L of protein A/G sepharose beads were added and placed in rotation 1 h at 4 °C. After three washes with IPH buffer, bound proteins were eluted by boiling in 2X Laemmli buffer and resolved by SDS-PAGE.

#### 4.13. Cut&Run Experiments

Protein-DNA interactions were analyzed using the CUT&RUN (Cleavage Under Targets & Release Using Nuclease) Assay Kit (#86652, Cell Signaling Technology) following the supplier's instructions. For each reaction, 250,000 cells were used. Positive (H3K4Me3) and negative (Rabbit mAb IgG) controls were performed using the antibodies provided in the kit. The EZH2 (#5246, Cell Signaling Technology) antibody was used at a dilution of 1/100. For DNA purification, the High Pure PCR Template Preparation Kit (#11796828001, Roche) was used according to the manufacturer's procedures except for the elution which was done in 50  $\mu$ L buffer. Finally, binding of EZH2 and presence of the activating mark H3K4Me3 onto the *UNC5A* promoter was quantified by qPCR using the following primers: *UNC5A forward*: CCCTGACACCGTGATACATTCA, *UNC5A reverse*: TCACCACCTTCTGGTTTGGG.

## 5. Conclusions

In conclusion, we provided evidences that the nutritional sensor *O*-GlcNAcylation represents one of the molecular relays between nutritional disorders and the epigenetic downregulation of key tumor suppressor genes driving the progression of colorectal carcinogenesis including *UNC5A*. In the near future, it will therefore be interesting to investigate whether strategies targeting *O*-GlcNAcylation could represent a new therapeutic hope in the treatment of colorectal cancer.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/11/3168/s1>, Figure S1: Blood glucose levels; Figure S2: LS174T cells were maintained in EMEM (Lonza) supplemented with 10% fetal calf serum and 1% ZellShield™ (Biovalley). Cells were cultured at 37 °C in water-saturated 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. LS174T cells were transfected either with non-target siRNA control (siCTRL), OGT siRNA (siOGT), EZH2 siRNA (siEZH2) or with a combination of both for 72 h. Cells were harvested either for total proteins or RNA extraction; Table S1: RT-qPCR primers used in this study.

**Author Contributions:** Conceptualization: I.E.Y.-B. and V.D. Data curation: A.D., N.V., M.D., I.L., I.E.Y.-B. and V.D. Formal Analysis: A.D., N.V., M.D., I.L., J.T., E.L., O.C., D.L., I.E.Y.-B. and V.D. Funding acquisition: I.E.Y.-B. and V.D. Investigation: A.D., N.V., M.D., I.L. and J.T. Methodology: A.D., N.V., M.D., I.L., J.T., E.L., I.E.Y.-B. and V.D. Project Administration: I.E.Y.-B., V.D., O.C. and M.B.-M. Resources: I.E.Y.-B., V.D., E.L., O.C., M.B.-M. and D.L. Supervision: V.D. Validation: A.D., N.V., M.D., I.L., J.T., E.L., M.B.-M., O.C., D.L., I.E.Y.-B. and V.D. Visualization: A.D., I.L., M.D. and V.D. Writing—original draft: A.D., N.V., M.D., J.T., I.E.Y.-B. and V.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the “GEFLUC Flandres/Artois”, the “Ligue Contre le Cancer/Comité du Nord”, the “Cancéropôle Nord-Ouest” and the “Centre National de la Recherche Scientifique”. A.D. is the recipient of a fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”.

**Acknowledgments:** We thank Andrea Paradisi and Patrick Mehlen (Cancer research center of Lyon, Lyon, France) for the gift of the *UNC5A* promoter plasmid. We thank Gerald Hart (Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA) and David Voadlo (Simon Fraser University, Burnaby, Canada) for the gift of Ac5S-GlcNAc. This work has benefited from the facilities and expertise of the Platform for histology of Institute for translational research in inflammation (INFINITE U1286). This work was supported by the “GEFLUC Flandres/Artois”, the “Ligue Contre le Cancer/Comité du Nord”, the “Cancéropôle Nord-Ouest” and the “Centre National de la Recherche Scientifique”. A.D. is the recipient of a fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Bishop, K.S.; Ferguson, L.R. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. *Nutrients* **2015**, *7*, 922–947. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Sapienza, C.; Issa, J.-P. Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics. *Annu. Rev. Nutr.* **2016**, *36*, 665–681. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Daniel, M.; Tollefsbol, T.O. Epigenetic linkage of aging, cancer and nutrition. *J. Exp. Biol.* **2015**, *218*, 59–70. [[CrossRef](#)]
4. Boyer, N.P.; Gupton, S.L. Revisiting Netrin-1: One Who Guides (Axons). *Front. Cell. Neurosci.* **2018**, *12*, 221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Mehlen, P.; Tauszig-Delamasure, S. Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut* **2014**, *63*, 1821–1829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Shin, S.K.; Nagasaka, T.; Jung, B.H.; Matsubara, N.; Kim, W.H.; Carethers, J.M.; Boland, C.R.; Goel, A. Epigenetic and Genetic Alterations in Netrin-1 Receptors UNC5C and DCC in Human Colon Cancer. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 1849–1857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Thiébault, K.; Mazelin, L.; Pays, L.; Llambi, F.; Joly, M.-O.; Scoazec, J.-Y.; Saurin, J.-C.; Romeo, G.; Mehlen, P. The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 4173–4178. [[CrossRef](#)]
8. Bernet, A.; Mazelin, L.; Coissieux, M.; Gadot, N.; Ackerman, S.L.; Scoazec, J.; Mehlen, P. Inactivation of the UNC5C Netrin-1 Receptor Is Associated With Tumor Progression in Colorectal Malignancies. *Gastroenterology* **2007**, *133*, 1840–1848. [[CrossRef](#)]

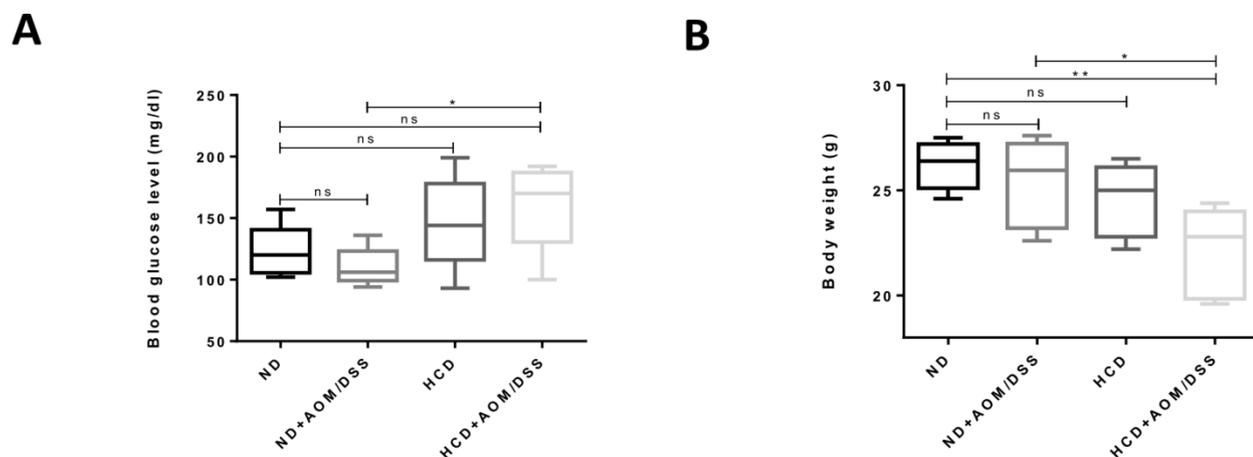
9. Hibi, K.; Mizukami, H.; Shirahata, A.; Goto, T.; Sakata, M.; Saito, M.; Ishibashi, K.; Kigawa, G.; Nemoto, H.; Sanada, Y. Aberrant methylation of the UNC5C gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer. Res.* **2009**, *29*, 271–273.
10. Wu, J.; Wang, G.; He, B.; Chen, X.; An, Y. Methylation of the UNC5C gene and its protein expression in colorectal cancer. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 1010428317697564. [[CrossRef](#)]
11. Dehennaut, V.; Leprince, D.; Lefebvre, T. O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, and Polycomb Group Proteins. *Front. Endocrinol.* **2014**, *5*, 155.
12. Decourcelle, A.; Leprince, D.; Edehennaut, V. Regulation of Polycomb Repression by O-GlcNAcylation: Linking Nutrition to Epigenetic Reprogramming in Embryonic Development and Cancer. *Front. Endocrinol.* **2019**, *10*, 117.
13. Leturcq, M.; Lefebvre, T.; Vercoutter-Edouart, A.-S. O-GlcNAcylation and chromatin remodeling in mammals: An up-to-date overview. *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, *45*, 323–338. [[PubMed](#)]
14. Hardivillé, S.; Hart, G.W. Nutrient regulation of gene expression by O-GlcNAcylation of chromatin. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *33*, 88–94.
15. Zachara, N.; Akimoto, Y.; Hart, G.W. The O-GlcNAc Modification. In *Essentials of Glycobiology*; Varki, A., Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, NY, USA, 2015.
16. Zheng, J.; Zhao, M.; Li, J.; Lou, G.; Yuan, Y.; Bu, S.; Xi, Y. Obesity-associated digestive cancers: A review of mechanisms and interventions. *Tumor Biol.* **2017**, *39*, 1010428317695020.
17. De Jong, R.G.; Peeters, P.J.; Burden, A.M.; De Bruin, M.L.; Haak, H.R.; Masclee, A.A.; De Vries, F.; Janssen-Heijnen, M.L. Gastrointestinal cancer incidence in type 2 diabetes mellitus; results from a large population-based cohort study in the UK. *Cancer Epidemiol.* **2018**, *54*, 104–111.
18. Pais, R.; Silaghi, H.; Silaghi, A.C.; Rusu, M.L.; Dumitrascu, D. Metabolic syndrome and risk of subsequent colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **2009**, *15*, 5141–5148.
19. Olivier-Van Stichelen, S.; Dehennaut, V.; Buzy, A.; Zachayus, J.-L.; Guinez, C.; Mir, A.-M.; El Yazidi-Belkoura, I.; Copin, M.-C.; Boureme, D.; Loyaux, D.; et al. O-GlcNAcylation stabilizes  $\beta$ -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J.* **2014**, *28*, 3325–3338.
20. Mi, W.; Gu, Y.; Han, C.; Liu, H.; Fan, Q.; Zhang, X.; Cong, Q.; Yu, W. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Basis Dis.* **2011**, *1812*, 514–519.
21. Yang, Y.R.; Kim, D.H.; Seo, Y.-K.; Park, D.; Jang, H.-J.; Choi, S.Y.; Lee, Y.H.; Lee, G.H.; Nakajima, K.; Taniguchi, N.; et al. Elevated O-GlcNAcylation promotes colonic inflammation and tumorigenesis by modulating NF- $\kappa$ B signaling. *Oncotarget* **2015**, *6*, 12529–12542.
22. Vasconcelos-Dos-Santos, A.; Loponte, H.F.B.R.; Mantuano, N.R.; Oliveira, I.A.; De Paula, I.F.; Teixeira, L.K.; De-Freitas-Junior, J.C.M.; Gondim, K.C.; Heise, N.; Mohana-Borges, R.; et al. Hyperglycemia exacerbates colon cancer malignancy through hexosamine biosynthetic pathway. *Oncogenesis* **2017**, *6*, e306.
23. Xu, D.; Wang, W.; Bian, T.; Yang, W.; Shao, M.; Yang, H. Increased expression of O-GlcNAc transferase (OGT) is a biomarker for poor prognosis and allows tumorigenesis and invasion in colon cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2019**, *12*, 1305–1314.
24. Steenackers, A.; Stichelen, S.O.-V.; Baldini, S.F.; Dehennaut, V.; Toillon, R.-A.; Le Bourhis, X.; El Yazidi-Belkoura, I.; Lefebvre, T. Silencing the Nucleocytoplasmic O-GlcNAc Transferase Reduces Proliferation, Adhesion, and Migration of Cancer and Fetal Human Colon Cell Lines. *Front. Endocrinol.* **2016**, *7*, 46.
25. Fardini, Y.; Dehennaut, V.; Lefebvre, T.; Issad, T. O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Front. Endocrinol.* **2013**, *4*, 99.
26. Fluge, Ø.; for the Norwegian Gastrointestinal Cancer Group; Gravdal, K.; Carlsen, E.; Vonen, B.; Kjelleevold, K.; Refsum, S.; Lilleng, R.; Eide, T.; Halvorsen, T.; et al. Expression of EZH2 and Ki-67 in colorectal cancer and associations with treatment response and prognosis. *Br. J. Cancer* **2009**, *101*, 1282–1289. [[PubMed](#)]
27. Benard, A.; Goossens-Beumer, I.J.; Van Hoesel, A.Q.; Horati, H.; Putter, H.; Zeestraten, E.C.M.; Van De Velde, C.J.H.; Kuppen, P.J.K. Prognostic Value of Polycomb Proteins EZH2, BMI1 and SUZ12 and Histone Modification H3K27me3 in Colorectal Cancer. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108265.
28. Liu, Y.-L.; Gao, X.; Jiang, Y.; Zhang, G.; Sun, Z.-C.; Cui, B.-B.; Yang, Y.-M. Expression and clinicopathological significance of EED, SUZ12 and EZH2 mRNA in colorectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2014**, *141*, 661–669.
29. Chu, C.-S.; Lo, P.-W.; Yeh, Y.-H.; Hsu, P.-H.; Peng, S.-H.; Teng, Y.-C.; Kang, M.-L.; Wong, C.-H.; Juan, L.-J. O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 1355–1360.

30. Inoue, D.; Fujino, T.; Sheridan, P.; Zhang, Y.-Z.; Nagase, R.; Horikawa, S.; Li, Z.; Matsui, H.; Kanai, A.; Saika, M.; et al. A novel ASXL1–OGT axis plays roles in H3K4 methylation and tumor suppression in myeloid malignancies. *Leukemia* **2018**, *32*, 1327–1337.
31. Jiang, M.; Xu, B.; Li, X.; Shang, Y.; Chu, Y.; Wang, W.; Chen, D.; Wu, N.; Hu, S.; Zhang, S.; et al. Correction: O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer metastasis via the miR-101-O-GlcNAc/EZH2 regulatory feedback circuit. *Oncogene* **2019**, *38*, 5744–5745. [PubMed]
32. Forma, E.; Józwiak, P.; Ciesielski, P.; Zaczek, A.; Starska, K.; Bryś, M.; Krześlak, A. Impact of OGT deregulation on EZH2 target genes FOXA1 and FOXC1 expression in breast cancer cells. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0198351.
33. Shi, H.; Munk, A.; Nielsen, T.S.; Daughtry, M.R.; Larsson, L.; Li, S.; Høyer, K.F.; Geisler, H.W.; Sulek, K.; Kjøbsted, R.; et al. Skeletal muscle O-GlcNAc transferase is important for muscle energy homeostasis and whole-body insulin sensitivity. *Mol. Metab.* **2018**, *11*, 160–177. [PubMed]
34. Guo, H.; Zhang, B.; Nairn, A.V.; Nagy, T.; Moremen, K.W.; Buckhaults, P.; Pierce, M. O-LinkedN-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Expression Levels Epigenetically Regulate Colon Cancer Tumorigenesis by Affecting the Cancer Stem Cell Compartment via Modulating Expression of Transcriptional Factor MYBL1. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 4123–4137.
35. Neufert, C.; Becker, C.; Neurath, M.F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1998–2004. [PubMed]
36. Plissonnier, M.-L.; Lahlali, T.; Raab, M.; Michelet, M.; Romero-López, C.; Rivoire, M.; Strebhardt, K.; Durantel, D.; Levrero, M.; Mehlen, P.; et al. Reciprocal antagonism between the netrin-1 receptor uncoordinated-phenotype-5A (UNC5A) and the hepatitis C virus. *Oncogene* **2017**, *36*, 6712–6724. [PubMed]
37. Barnault, R.; Lahlali, T.; Plissonnier, M.-L.; Romero-López, C.; Laverdure, N.; Ducarouge, B.; Rivoire, M.; Mehlen, P.; Zoulim, F.; Parent, R. Hepatocellular carcinoma-associated depletion of the netrin-1 receptor Uncoordinated Phenotype-5A (UNC5A) skews the hepatic unfolded protein response towards pro-survival outcomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *495*, 2425–2431. [PubMed]
38. Lo, P.-W.; Shie, J.-J.; Chen, C.-H.; Wu, C.-Y.; Hsu, T.-L.; Wong, C.-H. O-GlcNAcylation regulates the stability and enzymatic activity of the histone methyltransferase EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 7302–7307.
39. Miyamoto, Y.; Futamura, M.; Kitamura, N.; Nakamura, Y.; Baba, H.; Arakawa, H. Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis. *Int. J. Oncol.* **2010**, *36*, 1253–1260.
40. Tanikawa, C.; Matsuda, K.; Fukuda, S.; Nakamura, Y.; Arakawa, H. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *5*, 216–223.
41. Wang, H.; Ozaki, T.; Hossain, M.S.; Nakamura, Y.; Kamijo, T.; Xue, X.; Nakagawara, A. A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *370*, 594–598.
42. Zhu, Y.; Yu, M.; Chen, Y.; Wang, Y.; Wang, J.; Yang, C.; Bi, J. DNA damage-inducible gene, UNC5A, functions as a tumor-suppressor in bladder cancer. *Tumor Biol.* **2014**, *35*, 6887–6891.
43. Paradisi, A.; Creveaux, M.; Gibert, B.; Devailly, G.; Redoulez, E.; Neves, D.; Cleysac, E.; Treilleux, I.; Klein, C.; Niederfellner, G.; et al. Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol. Med.* **2013**, *5*, 1821–1834.
44. Becker, C.; Fantini, M.C.; Wirtz, S.; Nikolaev, A.; Kiesslich, R.; A Lehr, H.; Galle, P.R.; Neurath, M.F. In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut* **2005**, *54*, 950–954. [PubMed]
45. Füzesi-Levi, M.G.; Ben-Nissan, G.; Bianchi, E.; Zhou, H.; Deery, M.J.; Lilley, K.S.; Levin, Y.; Sharon, M. Dynamic Regulation of the COP9 Signalosome in Response to DNA Damage. *Mol. Cell. Biol.* **2014**, *34*, 1066–1076.

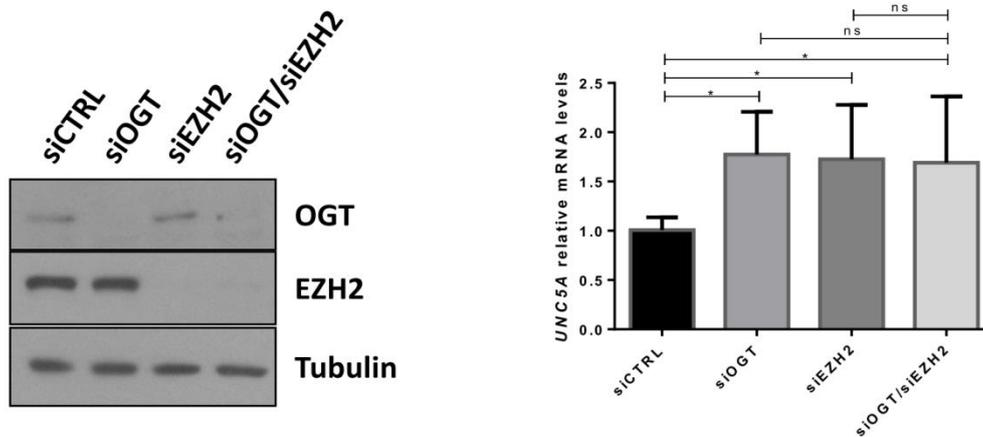
**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



**Supplementary Figure 1:** Blood glucose levels (**A**) and weight (**B**) of mice fed a Normal Diet (ND) or a High Carbohydrate Diet (HCD) and treated or not with AOM/DSS were assessed at day 124 just before the animals sacrifice. Each group contained the following number of animals: ND (n=5), ND+AOM/DSS (n=6), HCD (n=7) and HCD+AOM/DSS (n=9). ns: non-significant, \*p<0.05, \*\*p<0.01: Bonferroni's multiple comparisons test.



**Supplementary Figure 2:** LS174T cells were maintained in EMEM (Lonza) supplemented with 10% fetal calf serum and 1 % ZellShieldTM (Biovalley). Cells were cultured at 37°C in water-saturated 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. LS174T cells were transfected either with non-target siRNA control (siCTRL), OGT siRNA (siOGT), EZH2 siRNA (siEZH2) or with a combination of both for 72h. Cells were harvested either for total proteins or RNA extraction. *Left panel:* WB analyses were performed using the indicated antibodies. Data shown are representative of five independent experiments. *Right panel:* mRNA expression level of *UNC5A* was assessed by quantitative RT-qPCR. Values were normalized to *RPLP0*. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. ns: non-significant, \* $p < 0,05$ : Bonferroni's multiple comparisons test.

RT-qPCR primers used in this study

| HUMAN   |         |                           |
|---|---------|---------------------------|
| <b>RPLP0</b>                                    | forward | GTGATGTGCAGCTGATCAAGA     |
|   | reverse | GATGACCAGCCCAAAGGAGA      |
| <b>OGT</b>                                      | forward | TGGCTTCAGGAAGGCTATTG      |
|   | reverse | CAAGTCTTTTGGATGTTTCATATGG |
| <b>UNC5A</b>                                    | forward | CTTCTTCAAGTGCAACGGGG      |
|   | reverse | AGACATTAATGCGGACCTCCA     |
| <b>UNC5B</b>                                    | forward | AAACTCTAAGCGACCCCAAC      |
|   | reverse | GGATTGCCACGACCACGAA       |
| <b>UNC5C</b>                                    | forward | CCCTGCCACCCAGATCTATT      |
|   | reverse | TCAATGCTCACTTCCCGGAC      |
| <b>UNC5D</b>                                    | forward | GGACTTCCGGGTTCTGTGG       |
|   | reverse | TGAAATGAGGCAGTGTCCCAG     |
| MOUSE   |         |                           |
| <b>RPLP0</b>                                    | forward | CCTCGTTGGAGTGACATCGT      |
|   | reverse | TAGTTGACTTCCAGGTCGC       |
| <b>UNC5A</b>                                    | forward | GCCGGCTGATGATCCCTAAC      |
|   | reverse | ACCTCACGTCTTCTGGCTTG      |
| <b>UNC5B</b>                                    | forward | GTGTAATGGCGAGTGGGTCA      |
|   | reverse | ACACCTCGATCTGCACCTCT      |
| <b>UNC5C</b>                                    | forward | TTACTGGTGCCAGTGTGTGG      |
|   | reverse | CCAAGGGTTCTGCTCGAAT       |
| <b>UNC5D</b>                                    | forward | CAGCCAGGAATCTGAAAAGTGC    |
|   | reverse | TACAAAGCAATGTCGCTGGC      |
| <b>Cox-2</b>                                    | forward | AGCCAGGCAGCAAATCCTT       |
|   | reverse | CAGTCCGGGTACAGTCACAC      |
| <b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b> | forward | CGATGGTGCCATGAAATCCAG     |
|   | reverse | CTCCATTGCCAGAAGAGGCA      |
| <b>Cyclin D1</b>                                | forward | CAAATGCCAGAGGCGGATG       |
|   | reverse | CATGGAGGGTGGGTTGGAAA      |
| <b>c-myc</b>                                    | forward | GGATTCCTTTGGGCGTTGG       |
|   | reverse | GGCTGTACGGAGTCGTAGTC      |

## **Partie II :**

**Mise en évidence d'une  
régulation compensatoire de  
l'expression colique de l'OGT et  
de l'OGA en réponse à des  
perturbations de l'homéostasie  
de O-GlcNAcylation**

## **Partie II : Mise en évidence d'une régulation compensatoire de l'expression colique de l'OGT et de l'OGA en réponse à des perturbations de l'homéostasie de O-GlcNAcylation**

---

---

### **I. Introduction :**

Comme nous avons pu le mentionner dans la partie introductive, la O-GlcNAcylation est considérée comme un senseur nutritionnel régulant de nombreux processus cellulaires fondamentaux. Aussi le maintien de l'homéostasie de O-GlcNAcylation (la balance entre l'ajout et l'hydrolyse des résidus de GlcNAc) est essentiel pour l'exécution optimale des fonctions cellulaires et sa perte est à l'origine de nombreuses pathologies dont le cancer. Les mécanismes *via* lesquels la cellule maintient cette homéostasie ne sont pas à ce jour totalement compris mais un certain nombre d'études menées dans divers types cellulaires ont montré l'existence d'une régulation réciproque de l'expression de l'OGT et de l'OGA en réponse à des modulations des niveaux de O-GlcNAcylation.

Par exemple, la privation de glucose des cellules HepG2 et Neuro-2a induit une hausse de l'expression de l'OGT (Cheung and Hart 2008; Taylor et al. 2008, 2009). De plus, la diminution des niveaux de O-GlcNAcylation *via* l'inhibition pharmacologique de l'OGT (OSMI-1 et Ac5SGlcNAc) réduit l'expression de l'OGA dans les cellules CHO (Ortiz-Meoz et al. 2015). Inversement, l'inhibition pharmacologique de la O-GlcNAcase, avec le Thiamet-G ou le PUGNAc, augmente de manière compensatoire son expression dans les cellules HeLa, K562, SH-SY5Y et 3T3-L1 (Slawson et al. 2005; Zhang et al. 2014b). Cette hausse des niveaux de O-GlcNAcylation est également à l'origine d'une diminution de l'expression de l'OGT (Slawson et al. 2005; Zhang et al. 2014b).

D'un point de vue mécanistique, plusieurs hypothèses peuvent expliquer la régulation de l'expression de l'OGT et de l'OGA en réponse à des fluctuations des niveaux de O-GlcNAcylation. Par exemple, le facteur de transcription HNF1A est impliqué dans le contrôle de la transcription de l'OGT et est modifié par cette enzyme. L'ajout des résidus de

GlcNAc sur ce facteur de transcription pourrait représenter un premier mécanisme original expliquant le maintien de l'homéostasie de O-GlcNAcylation. En effet, en conditions d'hypo-O-GlcNAcylation, HNF1A promeut la transcription de l'OGT. Inversement, en conditions d'hyper-O-GlcNAcylation, la modification par GlcNAcylation de ce facteur de transcription le rend inactif et l'empêche donc de réguler positivement la transcription de l'OGT (**Figure 25**) (Zhang et al. 2019). Par ailleurs, Park et ses collaborateurs ont proposé que l'expression de l'OGT puisse être régulée par un processus de rétention d'intron (Park et al. 2017). L'inhibition de la O-GlcNAc transférase encouragerait un épissage performant et donc une hausse de l'expression de cette enzyme. A l'inverse, l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation conduirait à la rétention du quatrième intron et à une perte de l'expression de l'OGT (**Figure 26**). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus récemment par Tan et ses collaborateurs montrant une diminution de la rétention d'intron et une augmentation de la quantité de transcrits OGT lors de l'inhibition pharmacologique de la O-GlcNAc transférase (Tan et al. 2020). Enfin, une autre étude a démontré que l'OGA contrôle la transcription de l'OGT en collaborant avec l'histone acétyltransférase p300 et le facteur de transcription C/EBP $\beta$  (Qian et al. 2018). Dans ce sens, l'activité du promoteur de l'OGT augmente lors de la surexpression de l'OGA ou de p300 dans les cellules HEK293T. Cette hausse est d'autant plus importante lors de la surexpression simultanée de la O-GlcNAcase et de l'histone acétyltransférase. C/EBP $\beta$  serait un élément essentiel dans la régulation de la transcription de l'OGT dépendante de l'OGA et de p300. En effet, le dominant négatif de C/EBP $\beta$ , LIP (Liver-enriched Inhibitor Protein), abolit l'effet inducteur de l'OGA et/ou de p300 sur le promoteur de l'OGT et cet effet inducteur est amoindri par la mutation d'un site de fixation du facteur de C/EBP $\beta$  sur la région promotrice de l'OGT.

**En parallèle de mes principaux travaux de recherche portant sur la régulation de l'expression colique d'UNC5A par l'axe OGT-EZH2, j'ai également étudié la potentielle régulation de l'expression de l'OGT et de l'OGA en réponse à des fluctuations des niveaux de O-GlcNAcylation dans le colon. Ces expériences ont été menées *in vitro* dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 ainsi qu'*in vivo* dans un modèle murin et ont fait l'objet de la publication suivante :**

**Decourcelle A, Loison I, Baldini S, Leprince D, Dehennaut V. Evidence of a compensatory regulation of colonic O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase expression in response to disruption of O-GlcNAc homeostasis. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Jan 1;521(1):125-30.**

## II. Résultats :

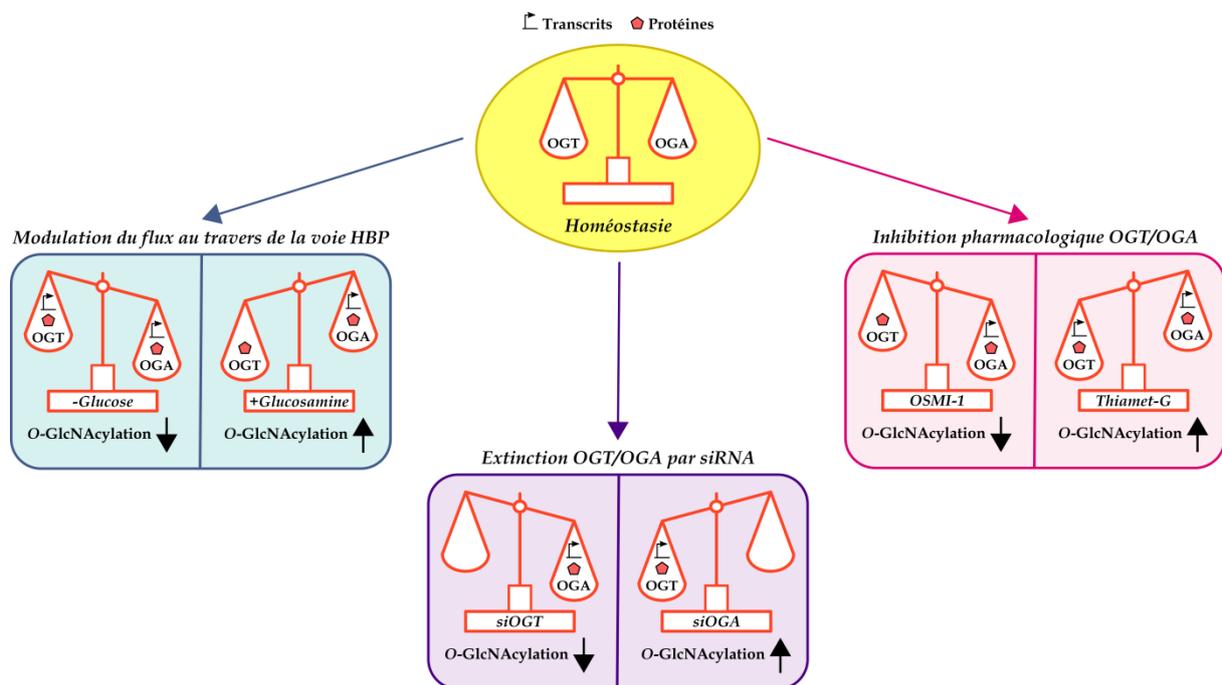
Pour tester si les altérations des niveaux de *O*-GlcNAcylation perturbent l'expression de l'OGT et de l'OGA, nous avons tout d'abord réalisé, dans les cellules HCT116, des modulations du flux au travers de la voie HBP en utilisant deux méthodes : la mise en culture des cellules dans un milieu (1) dépourvu de glucose ou (2) enrichi en glucosamine. Puis, la quantité de transcrits et de protéines de l'OGT et de l'OGA a été mesurée respectivement par RT-qPCR et Western Blot (**Figure 50**). Comme attendu, les niveaux de *O*-GlcNAcylation diminuent dans les cellules privées de glucose. Dans ces conditions, l'expression de l'OGT augmente, aussi bien d'un point de vue des transcrits que de la protéine, alors que l'expression de l'OGA est diminuée. A l'inverse, l'enrichissement du milieu de culture des cellules HCT116 avec de la glucosamine permet l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation et est corrélée à une baisse de l'expression protéique de l'OGT et à une hausse de l'OGA. Il est à noter que les ARNm de l'OGT ne varient pas dans ces conditions alors que la quantité de transcrits OGA augmente.

Dans un second temps, nous avons perturbé l'homéostasie de *O*-GlcNAcylation dans les cellules HCT116 en utilisant deux stratégies : (1) abolition de l'expression de l'OGT ou de l'OGA par siRNA et (2) inhibition pharmacologique de l'une ou l'autre de ces deux enzymes. De la même manière que précédemment, les niveaux d'expression de la *O*-GlcNAc transférase et de la *O*-GlcNAcase ont par la suite été étudiés par RT-qPCR et Western Blot. Le « knock-down » de l'OGT à l'aide de deux siRNA différents induit une diminution de l'expression protéique de l'OGA corrélée à une baisse de la quantité de transcrits. De manière réciproque, l'abolition de l'OGA diminue l'expression de l'OGT, d'un point de vue protéines et ARNm, mais dans une moindre mesure (**Figure 50**).

Nous avons ensuite diminué les niveaux de *O*-GlcNAcylation en inhibant l'OGT avec l'OSMI-1 et avons confirmé les résultats obtenus avec les siRNA à savoir une baisse d'expression de l'OGA. Il est intéressant de souligner que l'OSMI-1 provoque aussi une augmentation de l'expression protéique de l'OGT. Réciproquement, la hausse des niveaux de *O*-GlcNAcylation à l'aide du Thiamet-G diminue la quantité de transcrits et de protéines de l'OGT et de manière compensatoire, augmente celle de l'OGA (**Figure 50**). L'ensemble de ces résultats obtenus *in vitro* suggèrent donc, qu'en réponse à une perturbation de l'homéostasie

de O-GlcNAcylation, il existe une régulation réciproque de l'expression de l'OGT et de l'OGA dans les cellules cancéreuses coliques pour tenter de rétablir cette homéostasie.

Finalement, nous avons souhaité confirmer ces résultats *in vivo*. Pour ce faire, des souris ont reçu quotidiennement, pendant quinze jours, une injection de Thiamet-G. Les niveaux d'expression de l'OGT et de l'OGA ont ensuite été analysés par RT-qPCR et Western Blot dans le colon des animaux. Nous avons confirmé que le Thiamet-G était capable d'induire une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation colique chez ces souris et qu'il provoquait une baisse de l'expression de l'OGT et une hausse de l'OGA corroborant ainsi nos résultats obtenus *in vitro*.



**Figure 50 :** Les variations du flux de la voie HBP et l'inhibition de l'expression ou de l'activité de l'OGT et de l'OGA mènent à des variations d'expression compensatoire de ces deux enzymes.

### III. Conclusion et discussion :

Des niveaux aberrants de O-GlcNAcylation sont retrouvés dans de nombreuses pathologies dont le cancer colorectal. Comme nous l'avons mentionné dans la partie introductive de ce manuscrit, il existe une augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation

dans les tissus cancéreux coliques en comparaison aux tissus sains adjacents (Mi et al. 2011; Olivier-Van Stichelen et al. 2014b; Yu et al. 2019). Inversement, la baisse des niveaux de *O*-GlcNAcylation *via* l'abolition de l'OGT diminue notamment la prolifération, l'adhésion et la migration de cellules cancéreuses coliques (Steenackers et al. 2016). Les niveaux aberrants de *O*-GlcNAcylation semblent donc représenter une nouvelle « hallmark » du cancer colorectal. C'est pourquoi, il est intéressant de comprendre les mécanismes permettant le maintien ou la perte de l'homéostasie de *O*-GlcNAcylation dans le colon.

Nos travaux ont permis de montrer que la modulation des niveaux de *O*-GlcNAcylation mène à une régulation compensatoire de l'expression de l'OGT et de l'OGA dans le but de tenter de rétablir cette homéostasie. D'un point de vue mécanistique, nos résultats suggèrent que la régulation de l'expression de l'OGA en réponse à une modulation des niveaux de *O*-GlcNAcylation colique se ferait à l'échelle transcriptionnelle alors qu'elle semblerait principalement post-transcriptionnelle pour l'OGT. Ces derniers résultats sont contraires à ceux obtenus par Qian et ses collaborateurs montrant une augmentation de la quantité de transcrits de l'OGT en réponse à une surexpression de l'OGA dans des hépatocytes primaires (Qian et al. 2018). A l'inverse, nos résultats sont en accord avec des travaux menés par Zhang et ses collaborateurs démontrant que les niveaux d'ARNm de l'OGT ne varient pas dans les cellules SH-SY5Y, HeLa et K562 traitées avec du Thiamet-G (Zhang et al. 2014b). En fonction du type cellulaire et suite à des modulations des niveaux de *O*-GlcNAcylation, la régulation de l'expression de l'OGT pourrait donc être préférentiellement transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Concernant cette dernière, comme nous l'avons mentionné précédemment, la rétention d'intron pourrait être un moyen de réguler l'expression de l'OGT dans le colon. Par ailleurs, la *O*-GlcNAc transférase peut être *O*-GlcNAcylée. Le rôle de cette modification est peu compris mais nous pourrions imaginer, comme cela a déjà été montré pour d'autres cibles de l'OGT, que la *O*-GlcNAcylation régule la stabilité et la dégradation de l'OGT et participe donc à un mécanisme d'auto-régulation de l'enzyme.

En conclusion, notre étude renforce l'hypothèse selon laquelle la régulation réciproque de l'OGT et de l'OGA est un des mécanismes qui contribue au maintien de l'homéostasie de *O*-GlcNAcylation dans la plupart des types de cellules, y compris les cellules du colon. Aussi, d'autres travaux permettant de déterminer précisément comment l'OGT et l'OGA sont régulées dans les cellules du côlon et comment l'homéostasie de *O*-

GlcNAcylation est perdue dans ces cellules pour contribuer à mieux comprendre les mécanismes de la carcinogenèse colorectale.

## **Publication 2:**

**Evidence of a compensatory  
regulation of colonic *O*-GlcNAc  
transferase and *O*-GlcNAcase  
expression in response to  
disruption of *O*-GlcNAc  
homeostasis**

**Evidence of a compensatory regulation of colonic *O*-GlcNAc transferase and *O*-GlcNAcase expression in response to disruption of *O*-GlcNAc homeostasis.**

Amélie DECOURCELLE<sup>1</sup>, Ingrid LOISON<sup>1</sup>, Steffi BALDINI<sup>2</sup>, Dominique LEPRINCE<sup>1</sup> and Vanessa DEHENNAUT<sup>1,\*</sup>.

(1) *Université de Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR8161, M3T: Mechanisms of tumorigenesis and Targeted Therapies, F-59000 Lille, France.*

(2) *Université de Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France.*

**\* To whom correspondence should be addressed:**

*e-mail:* [vanessa.dehennaut@ibl.cnrs.fr](mailto:vanessa.dehennaut@ibl.cnrs.fr)

**Highlights:**

- In the colon cancer cell line HCT116, OGT and OGA expression are sensitive to flux modulations through the hexosamine biosynthetic pathway.
- Manipulating OGT or OGA expression or activity in this cell line induces a compensatory regulation of their expression mostly at the transcriptional level for OGA and mainly at the post-transcriptional level for OGT.
- The compensatory regulation of OGT and OGA expression in response to changes in *O*-GlcNAc homeostasis also occurs *in vivo* in mouse colon.

**ABSTRACT**

*O*-GlcNAcylation is a post-translational modification of thousands of intracellular proteins that dynamically regulates many fundamental cellular processes. Cellular *O*-GlcNAcylation levels are regulated by a unique couple of enzymes: *O*-GlcNAc transferase (OGT) and *O*-GlcNAcase (OGA), which adds and removes the GlcNAc residue, respectively. Maintenance of *O*-GlcNAc homeostasis is essential to ensure optimal cellular function and disruption of this homeostasis has been linked to the etiology of several human diseases including cancer. The mechanisms through which the cell maintains *O*-GlcNAc homeostasis are not fully understood but several studies have suggested that a reciprocal regulation of OGT and OGA expression could be one of them. In this study, we investigated the putative regulation of OGT and OGA expression in response to disruption in *O*-GlcNAc homeostasis in colon. We provide *in vitro* and *in vivo* evidences that in colon cells, modulation of *O*-GlcNAcylation levels leads to a compensatory regulation of OGT and OGA expression in an attempt to restore basal *O*-GlcNAcylation levels. Our results also suggests that the regulation of colonic OGA expression in response to changes in *O*-GlcNAc homeostasis occurs mostly at the transcriptional level whereas OGT regulation seems to rely mainly on post-transcriptional mechanisms.

**Key words:** *O*-GlcNAc transferase, *O*-GlcNAcase, *O*-GlcNAc homeostasis, colon

### 1. INTRODUCTION

*O*-linked  $\beta$ -N-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAcylation) is a reversible post translational modification of cytosolic, nuclear, and mitochondrial proteins that consists in the covalent linkage of a unique residue of N-acetylglucosamine (GlcNAc) to serine and threonine residues of targeted proteins. *O*-GlcNAcylation levels are regulated by a single pair of enzymes: *O*-GlcNAc Transferase (OGT) that catalyzes the transfer of GlcNAc from UDP-GlcNAc onto the protein and *O*-GlcNAcase (OGA) that hydrolyzes the residue. UDP-GlcNAc

is synthesized through the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) at the crossroad of glucose, amino acids, fatty acids and nucleotides metabolisms (**Figure 1A**). Therefore, *O*-GlcNAcylation is highly sensitive to nutrient availability and is considered as a nutritional sensor that dynamically regulates numerous fundamental cellular processes among which transcription, signal transduction, metabolism and chromatin remodeling [1,2]. Maintenance of *O*-GlcNAc homeostasis (the balance between *O*-GlcNAc addition and removal) appears to be critical to ensure proper cellular functions since disruption of this homeostasis has been linked to the etiology of several human diseases including diabetes, neurodegenerative disorders and cancer [1,3,4]. The mechanisms through which the cell maintains *O*-GlcNAc homeostasis are not fully understood but several studies have suggested that a reciprocal regulation of OGT and OGA expression could be one of them in numerous cell types. For instance, increasing overall *O*-GlcNAcylation levels through the pharmacological inhibition of OGA has been showed to promote a compensatory transcription of *Oga* in SH-SY5Y neuroblastoma cells, HeLa cervical cells and K562 leukemia cells [5]. Conversely, inhibition of OGT with OSMI-1 or Ac4-5S-GlcNAc decreases OGA levels in CHO cells [6]. A compensatory up-regulation of OGT has also been evidenced in the hepatic cell line HEPG2 and in Neuro-2a neuroblastoma cells in response to glucose deprivation [7–9]. By manipulating OGT or OGA activity or expression in a variety of cell types including mouse hepatocytes, CV-1 monkey kidney cells, HEK 293T cells and primary PDAC cells, Qian et al., demonstrated that OGT and OGA regulate each other at the transcriptional level [10]. Mechanistically the authors demonstrated that OGA promotes *Ogt* transcription through cooperation with the histone acetyltransferase p300 and transcription factor C/EBP $\beta$  [10]. In response to changes in *O*-GlcNAc levels, OGT expression is also post-transcriptionally regulated via a mechanism of intron retention involving a conserved intronic splicing silencer

(ISS): lowering *O*-GlcNAc levels induces efficient splicing and expression of OGT whereas increasing *O*-GlcNAcylation leads to intron four retention and loss of OGT mRNA [11].

In this study, we investigated the putative regulation of OGT and OGA expression in response to disruption in *O*-GlcNAc homeostasis in colon. We provide *in vitro* and *in vivo* evidences that in colon cells, modulation of *O*-GlcNAcylation levels leads to a compensatory regulation of OGT and OGA expression in an attempt to restore basal *O*-GlcNAcylation levels. These results strengthen the hypothesis that a reciprocal regulation of OGT and OGA contributes to the maintenance of *O*-GlcNAc homeostasis and that this phenomenon occurs in most cell types.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Cell culture

HCT116 cells purchased from ATCC were maintained in Mc Coy's 5A (modified) medium with Glutamax (Thermofischer Scientific) supplemented with 10% fetal calf serum and 1 % ZellShield™ (Biovalley). Cells were cultured at 37°C in water-saturated 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

For glucose deprivation experiments, cells were first maintained in DMEM + Glutamax medium (Thermofisher Scientific) containing 4,5 g/l glucose for 24h. Cells were then rinsed two times with PBS and placed in DMEM + Glutamax containing 1g/l glucose for 48h.

For glucosamine supplementation experiments, cells were first maintained in low glucose medium for 48h as described above and then treated with 5 mM Glucosamine (Sigma-Aldrich) for 24h.

### *O*-GlcNAc cycling enzymes inhibitors

The OGA inhibitor, Thiamet G (Sigma-Aldrich), was dissolved in phosphate buffered saline (PBS) at 1 mM as stock solution and used at a final concentration of 1  $\mu$ M. The OGT inhibitor, OSMI-1 (Sigma-Aldrich) was dissolved in DMSO at 25 mM as stock solution and used at a final concentration of 50  $\mu$ M. Inhibitors were added to the cell culture medium for 24h.

### ***2.2 Small Interfering RNA***

HCT116 cells were reverse-transfected with Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) according to manufacturer's instructions using 5 nM small interfering RNA targeting OGT (siGENOME human OGT siRNA D-019111-01 (si OGT#1) and D-019111-02 (si OGT#2), Dharmacon), OGA (siGENOME human OGA siRNA D-012805-01 (si OGA#1) and D-012805-02 (si OGT#2), Dharmacon) or a scrambled control sequence (si Ctrl; siGENOME RISC free control siRNA, Dharmacon) as previously described [12]. 72h later, cells were harvested for RNA/protein extraction.

### ***2.3 Quantitative RT-PCR***

RNA was isolated using Nucleospin® RNA mini spin kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. 1  $\mu$ g of total RNA was reverse transcribed using random primers and MultiScribe™ reverse transcriptase (Applied Biosystems). Real-time PCR analysis was performed by Power SYBR Green (Applied Biosystems) in a MX3005P fluorescence temperature cycler (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. Results were normalized with respect to RPLP0 RNA used as internal control. The primers used for the RT-qPCR analyses are summarized in supplementary table S1.

### ***2.4 Western blotting and antibodies.***

For total proteins extraction, cells were lysed in RiPA buffer (10 mM Tris [pH 7.4], 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and proteases inhibitors added at the time of preparation). Protein concentration was determined using the Micro BCA Protein Assay Kit (Thermofisher Scientific). Equal amount of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (GE healthcare). After 1h of blocking in PBSM (PBS with 5% milk), the membranes were incubating overnight at 4°C with specific primary antibodies in PBSTM (PBSM with 0.1% Tween) and washed three times with PBSN (PBS with 0.1% NP-40). The membranes were next incubated for 1h at room temperature with secondary antibodies coupled to peroxydase (Amersham) in PBSM, washed three times in PBSN and revealed by chemiluminescence.

Mouse monoclonal anti-O-GlcNAc (RL2) was purchased from Life technologies (MA1072). Rabbit polyclonal anti-OGT (DM17) was purchased from Sigma-Aldrich (#O6264). Antibodies for OGA (345) were gracious gifts from the laboratory of Gerald Hart (Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA). Mouse monoclonal anti-tubulin (sc-23948), mouse monoclonal anti-GAPDH (sc-32223) and goat anti-chicken IgY-HRP (sc-2428) were purchased from Santa Cruz biotechnologies. Anti-mouse IgG-HRP was purchased from GE healthcare (NA931V). Donkey anti-rabbit IgG-HRP was purchased from Millipore (AP182P).

### **2.5 *In vivo* experiments**

Eight-week-old male C57BL/6J mice were purchased from Charles River laboratories (Saint-Germain sur l'Arbresle) and adapted to the environment for 1 week before study. Mice were maintained in a 12h light/dark cycle with water and standard diet (65% carbohydrate, 11% fat, 24% protein). Mice were intraperitoneally injected daily with Thiamet-G (20 mg/kg/d in PBS) or with PBS during a 15 days period as previously described [12]. Procedures were carried out according to the French guidelines for the care of experimental animals. Colon were collected

and washed in PBS. Samples were immediately flash frozen in liquid nitrogen, reduced to powder with hand mortar and pestle and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further ARN/protein extraction.

### 2.6 Statistics

Experiments were performed at least thrice independently. Statistical analyses were performed by unpaired Student's t test. \* indicates  $p < 0.05$ , \*\* indicates  $p < 0.01$ , \*\*\* indicates  $p < 0.001$ .

## 3. RESULTS

### 3.1. *In the colon cancer cell line HCT116, OGT and OGA expression are sensitive to flux modulations through the hexosamine biosynthetic pathway.*

To test whether OGT and OGA expression are regulated in response to disruption in *O*-GlcNAc homeostasis in colon, we examined their expression both at the mRNA and protein level in the colon cancer cell line HCT116 under several different conditions that alter global *O*-GlcNAcylation levels (**Figure 1A**). First, we induced flux modulation through the HBP either by glucose deprivation or glucosamine supplementation. As expected, *O*-GlcNAcylation levels decreased in glucose-depleted cells (**Figure 1B**) whereas glucosamine treatment increased them (**Figure 1C**). OGT protein and mRNA expression raised after glucose depletion while both OGA protein and mRNA expression significantly decreased (**Figure 1B**). Conversely, glucosamine-mediated increase in *O*-GlcNAcylation concomitantly lowered OGT and augmented OGA proteins (**Figure 1C**). It is to note that in these two experimental conditions, OGA protein levels follow the levels of transcripts. This is not the case for OGT, for which the variations in transcript levels are weak or even non-existent while the protein expression varies markedly. This suggests that OGA expression is mainly

regulated at the transcriptional level in response to flux modulations through the HBP whereas OGT expression is regulated mainly at the post-transcriptional level.

### *3.2 Manipulating OGT or OGA expression or activity in this cell line induces a compensatory regulation of their expression.*

To further test the influence of changes in *O*-GlcNAc homeostasis on the regulation of OGT and OGA expression in HCT116 cells, we then modulated the *O*-GlcNAcylation levels upwards or downwards by inhibiting the expression of OGA or OGT by RNA interference, respectively and examined the levels of transcripts and proteins as described above (**Figure 2**). As shown in **figure 2A**, knocking-down OGT with 2 different siRNA induced a drastic loss of OGA protein expression that is highly correlated with a decrease in its transcripts. Conversely, the knock-down of OGA also brought about a decrease in OGT mRNA and protein but at a lesser extent. Next, we decreased *O*-GlcNAcylation levels by treating cells with OSMI-1, a specific OGT inhibitor [6] (**Figure 2B**). In agreement with our OGT siRNA results, we observed a sharp drop in OGA mRNA and protein in OGT inhibitor-treated cells. Furthermore, our results show that pharmacological inhibition of OGT also leads to a compensatory induction of its own expression. Inversely, increasing *O*-GlcNAcylation levels through the pharmacological inhibition of OGA with the potent inhibitor Thiamet G [14] led to a concomitant increase of OGA and a decrease of OGT (**Figure 2C**). As we observed in the conditions of modulations of the HBP flux (**Figure 1B** and **1C**), in response to OGT and OGA pharmacological inhibition, variations in OGT protein expression are poorly correlated to variations in the expression of its transcripts while OGA transcripts and proteins vary in the same range. This result strengthens the hypothesis that, in colon, regulation of OGT expression in response to changes in *O*-GlcNAc homeostasis might occur mostly through post-transcriptional mechanisms while OGA regulation seems to mainly occur at the transcriptional level.

*3.3 The compensatory regulation of OGT and OGA expression in response to changes in O-GlcNAc homeostasis also occurs in vivo in mouse colon.*

Taken together, our results demonstrate that in HCT116 cells, modulation of *O*-GlcNAcylation levels leads to a compensatory regulation of OGT and OGA expression in an attempt to restore basal *O*-GlcNAcylation levels. Finally, we wanted to confirm our *in vitro* results, *in vivo* in mice. We had previously demonstrated that a daily intraperitoneal injection of Thiamet G for 15 days was sufficient to induce an increase in colonic *O*-GlcNAcylation levels in mice [12] (**Figure 3**). In this model, we now demonstrated that Thiamet G led to a concomitant increase of OGA and a decrease of OGT both at the protein (**Figure 3A**) and mRNA levels (**Figure 3B**) thus confirming our *in vitro* observations.

#### **4. DISCUSSION**

More and more studies sustain the hypothesis that global *O*-GlcNAcylation levels must be retained to preserve normal cellular functions and that this maintenance of *O*-GlcNAc homeostasis is achieved in part through a reciprocal regulation of OGT and OGA expression [15]. Aberrant *O*-GlcNAcylation levels, resulting from disruption of *O*-GlcNAc homeostasis, have been linked to the development of several pathologies among which colorectal cancer. Indeed, we and others observed increased contents of *O*-GlcNAcylation in human colon cancer samples in comparison with normal tissues [12,16–18]. Contrary, reducing *O*-GlcNAcylation levels by silencing OGT reduces proliferation, adhesion, migration and anchorage-independent cell growth of colon cancer cell lines [16,19], defining aberrant *O*-GlcNAcylation levels as a new hallmark of colorectal cancer. Thus, understanding the mechanisms by which *O*-GlcNAc homeostasis is maintained or lost in the colon is of considerable interest. In this study, we provide evidences that in colon cells, modulation of *O*-GlcNAcylation levels leads to a compensatory regulation of OGT and OGA expression in an

attempt to restore basal *O*-GlcNAcylation levels (**Figure 4**). Our results also suggest that the regulation of colonic OGA expression in response to changes in *O*-GlcNAc homeostasis occurs mostly at the transcriptional level as it has been previously shown in a variety of cell types [5,10]. In contrast, for OGT, the regulation of its expression seems to be slightly related to a modulation of its transcription but rather seems to rely mainly on post-transcriptional mechanisms. These results are contrary to those obtained by Qian et al. showing that overexpression of OGA in primary hepatocytes produced a concomitant increase in OGT transcripts [10] and those from Taylor et al., which demonstrated that glucose deprivation in the hepatocyte cell line HEPG2 cells also induces a compensatory up-regulation of OGT at the mRNA level [7,8]. However, our results are in agreement with those obtained by Zhang et al. who showed that unlike OGA, OGT transcript levels varied very slightly following OGA inhibition with Thiamet G in SH-SY5Y neuroblastoma cells, HeLa cervical cells and K562 leukemia cells [5]. This suggests that the modulation of OGT expression in response to disruption in *O*-GlcNAc homeostasis should preferably be done either by transcriptional or post-transcriptional mechanisms, depending on the cell type. Regarding the post-transcriptional mechanisms that could be involved, it has been shown that OGT can be *O*-GlcNAcyated [20,21]. The role of OGT *O*-GlcNAcylation is still not known but it can be assumed that this could constitute a self-regulatory mechanism of the enzyme: *O*-GlcNAcylation could regulate the stability/degradation of OGT as it has already been shown for many other proteins such as  $\beta$ -catenin [12], Fatty Acid Synthase [22] or cyclin D1 [23].

To conclude, this study strengthens the hypothesis that a reciprocal regulation of OGT and OGA contributes to the maintenance of *O*-GlcNAc homeostasis in most cell types including colon cells. In the next future, determining precisely how *O*-GlcNAcylation regulates the expression of OGT and OGA in colon cells and how *O*-GlcNAc homeostasis is lost in these cells will be crucial to understanding the mechanisms of colorectal carcinogenesis.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Gerald Hart (Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, USA) for the gift of the anti-OGA (345) antibody. This work was supported by the “GEFLUC Flandres/Artois”, the “Ligue Contre le Cancer/Comité du Nord”, the “Canceropôle Nord-Ouest” and the “Centre National de la Recherche Scientifique”. A.D. is the recipient of a fellowship from the “Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche”

## 6. REFERENCES

- [1] G.W. Hart, Nutrient regulation of signaling and transcription, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 2211–2231. doi:10.1074/jbc.AW119.003226.
- [2] A. Decourcelle, D. Leprince, V. Dehennaut, Regulation of Polycomb Repression by O-GlcNAcylation: Linking Nutrition to Epigenetic Reprogramming in Embryonic Development and Cancer, *Front. Endocrinol.* 10 (2019) 117. doi:10.3389/fendo.2019.00117.
- [3] I. Akan, S. Olivier-Van Stichelen, M.R. Bond, J.A. Hanover, Nutrient-driven O-GlcNAc in proteostasis and neurodegeneration, *J. Neurochem.* 144 (2018) 7–34. doi:10.1111/jnc.14242.
- [4] Y. Fardini, V. Dehennaut, T. Lefebvre, T. Issad, O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark?, *Front. Endocrinol.* 4 (2013) 99. doi:10.3389/fendo.2013.00099.
- [5] Z. Zhang, E.P. Tan, N.J. VandenHull, K.R. Peterson, C. Slawson, O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis, *Front. Endocrinol.* 5 (2014) 206. doi:10.3389/fendo.2014.00206.
- [6] R.F. Ortiz-Meoz, J. Jiang, M.B. Lazarus, M. Orman, J. Janetzko, C. Fan, D.Y. Duveau, Z.-W. Tan, C.J. Thomas, S. Walker, A small molecule that inhibits OGT activity in cells, *ACS Chem. Biol.* 10 (2015) 1392–1397. doi:10.1021/acschembio.5b00004.
- [7] R.P. Taylor, G.J. Parker, M.W. Hazel, Y. Soesanto, W. Fuller, M.J. Yazzie, D.A. McClain, Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 6050–6057. doi:10.1074/jbc.M707328200.
- [8] R.P. Taylor, T.S. Geisler, J.H. Chambers, D.A. McClain, Up-regulation of O-GlcNAc transferase with glucose deprivation in HepG2 cells is mediated by decreased hexosamine pathway flux, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 3425–3432. doi:10.1074/jbc.M803198200.
- [9] W.D. Cheung, G.W. Hart, AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 13009–13020. doi:10.1074/jbc.M801222200.
- [10] K. Qian, S. Wang, M. Fu, J. Zhou, J.P. Singh, M.-D. Li, Y. Yang, K. Zhang, J. Wu, Y. Nie, H.-B. Ruan, X. Yang, Transcriptional regulation of O-GlcNAc homeostasis is disrupted in pancreatic cancer, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 13989–14000. doi:10.1074/jbc.RA118.004709.
- [11] S.-K. Park, X. Zhou, K.E. Pendleton, O.V. Hunter, J.J. Kohler, K.A. O'Donnell, N.K. Conrad, A Conserved Splicing Silencer Dynamically Regulates O-GlcNAc Transferase

- Intron Retention and O-GlcNAc Homeostasis, *Cell Rep.* 20 (2017) 1088–1099. doi:10.1016/j.celrep.2017.07.017.
- [12] S. Olivier-Van Stichelen, V. Dehennaut, A. Buzy, J.-L. Zachary, C. Guinez, A.-M. Mir, I. El Yazidi-Belkoura, M.-C. Copin, D. Boureme, D. Loyaux, P. Ferrara, T. Lefebvre, O-GlcNAcylation stabilizes  $\beta$ -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28 (2014) 3325–3338. doi:10.1096/fj.13-243535.
- [13] T.M. Gloster, W.F. Zandberg, J.E. Heinonen, D.L. Shen, L. Deng, D.J. Vocadlo, Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells, *Nat. Chem. Biol.* 7 (2011) 174–181. doi:10.1038/nchembio.520.
- [14] S.A. Yuzwa, M.S. Macauley, J.E. Heinonen, X. Shan, R.J. Dennis, Y. He, G.E. Whitworth, K.A. Stubbs, E.J. McEachern, G.J. Davies, D.J. Vocadlo, A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo, *Nat. Chem. Biol.* 4 (2008) 483–490. doi:10.1038/nchembio.96.
- [15] X. Yang, K. Qian, Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 452–465. doi:10.1038/nrm.2017.22.
- [16] W. Mi, Y. Gu, C. Han, H. Liu, Q. Fan, X. Zhang, Q. Cong, W. Yu, O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy, *Biochim. Biophys. Acta.* 1812 (2011) 514–519. doi:10.1016/j.bbadis.2011.01.009.
- [17] Y.R. Yang, D.H. Kim, Y.-K. Seo, D. Park, H.-J. Jang, S.Y. Choi, Y.H. Lee, G.H. Lee, K. Nakajima, N. Taniguchi, J.-M. Kim, E.-J. Choi, H.Y. Moon, I.S. Kim, J.H. Choi, H. Lee, S.H. Ryu, L. Cocco, P.-G. Suh, Elevated O-GlcNAcylation promotes colonic inflammation and tumorigenesis by modulating NF- $\kappa$ B signaling, *Oncotarget.* 6 (2015) 12529–12542. doi:10.18632/oncotarget.3725.
- [18] A. Vasconcelos-Dos-Santos, H.F.B.R. Loponte, N.R. Mantuano, I.A. Oliveira, I.F. de Paula, L.K. Teixeira, J.C.M. de-Freitas-Junior, K.C. Gondim, N. Heise, R. Mohana-Borges, J.A. Morgado-Díaz, W.B. Dias, A.R. Todeschini, Hyperglycemia exacerbates colon cancer malignancy through hexosamine biosynthetic pathway, *Oncogenesis.* 6 (2017) e306. doi:10.1038/oncsis.2017.2.
- [19] A. Steenackers, S. Olivier-Van Stichelen, S.F. Baldini, V. Dehennaut, R.-A. Toillon, X. Le Bourhis, I. El Yazidi-Belkoura, T. Lefebvre, Silencing the Nucleocytoplasmic O-GlcNAc Transferase Reduces Proliferation, Adhesion, and Migration of Cancer and Fetal Human Colon Cell Lines, *Front. Endocrinol.* 7 (2016) 46. doi:10.3389/fendo.2016.00046.
- [20] L.K. Kreppel, M.A. Blomberg, G.W. Hart, Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 9308–9315. doi:10.1074/jbc.272.14.9308.
- [21] K. Sakabe, G.W. Hart, O-GlcNAc transferase regulates mitotic chromatin dynamics, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 34460–34468. doi:10.1074/jbc.M110.158170.
- [22] S.F. Baldini, C. Wavelet, I. Hainault, C. Guinez, T. Lefebvre, The Nutrient-Dependent O-GlcNAc Modification Controls the Expression of Liver Fatty Acid Synthase, *J. Mol. Biol.* 428 (2016) 3295–3304. doi:10.1016/j.jmb.2016.04.035.
- [23] L. Masclef, V. Dehennaut, M. Mortuaire, C. Schulz, M. Leturcq, T. Lefebvre, A.-S. Vercoutter-Edouart, Cyclin D1 Stability Is Partly Controlled by O-GlcNAcylation, *Front. Endocrinol.* 10 (2019) 106. doi:10.3389/fendo.2019.00106.

## 7. LEGENDS

**Figure 1: OGT and OGA expression are sensitive to flux modulations through the Hexosamine Biosynthetic Pathway.**

(A) Scheme depicting the Hexosamine Biosynthetic Pathway and *O*-GlcNAcylation processes. The different molecules and inhibitors used in this study to modulate *O*-GlcNAcylation levels up or down are also indicated. GFAT1/2: Glutamine Fructose-6-Phosphate Amido Transferase 1/2 (rate limiting enzyme of the HBP), GK: Glucosamine Kinase, OGT: *O*-GlcNAc Transferase, OGA: *O*-GlcNAcase. (B) HCT116 cells were cultured either in high glucose (4,5 g/l) or in low-glucose (1g/l) containing medium for 48h. (C) After having been cultured in a low glucose medium for 48 hours, HCT116 cells were treated with 5mM glucosamine for 24 hours. (B-C) *Left*: Treatment efficiency was verified by Western Blot (WB) analyses of *O*-GlcNAcylation levels. OGT and OGA expression were also assessed. Tubulin was used as a loading control. Data shown are representative of three independent experiments. *Right*: Cells were harvested for total RNAs extraction. The mRNA expression levels of OGT and OGA were assessed by quantitative RT-PCR. Values were normalized to RPLP0. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. NS: Non Significant, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test.

**Figure 2: Manipulating OGT or OGA expression or activity in HCT116 cells induces a compensatory regulation of their expression.**

(A) HCT116 cells were transfected with non-target control siRNA (si Ctrl) or with either two different siRNAs targeting OGT (siOGT #1 and #2) or OGA (siOGA #1 and #2) for 72h. *left*: *O*-GlcNAcylation levels, OGT and OGA expression were assessed by Western Blot (WB) analyses. GAPDH was used as a loading control. Data shown are representative of three independent experiments. *Right*: Cells were also harvested for total RNAs extraction. The mRNA expression levels of OGT and OGA were assessed by quantitative RT-PCR. Values

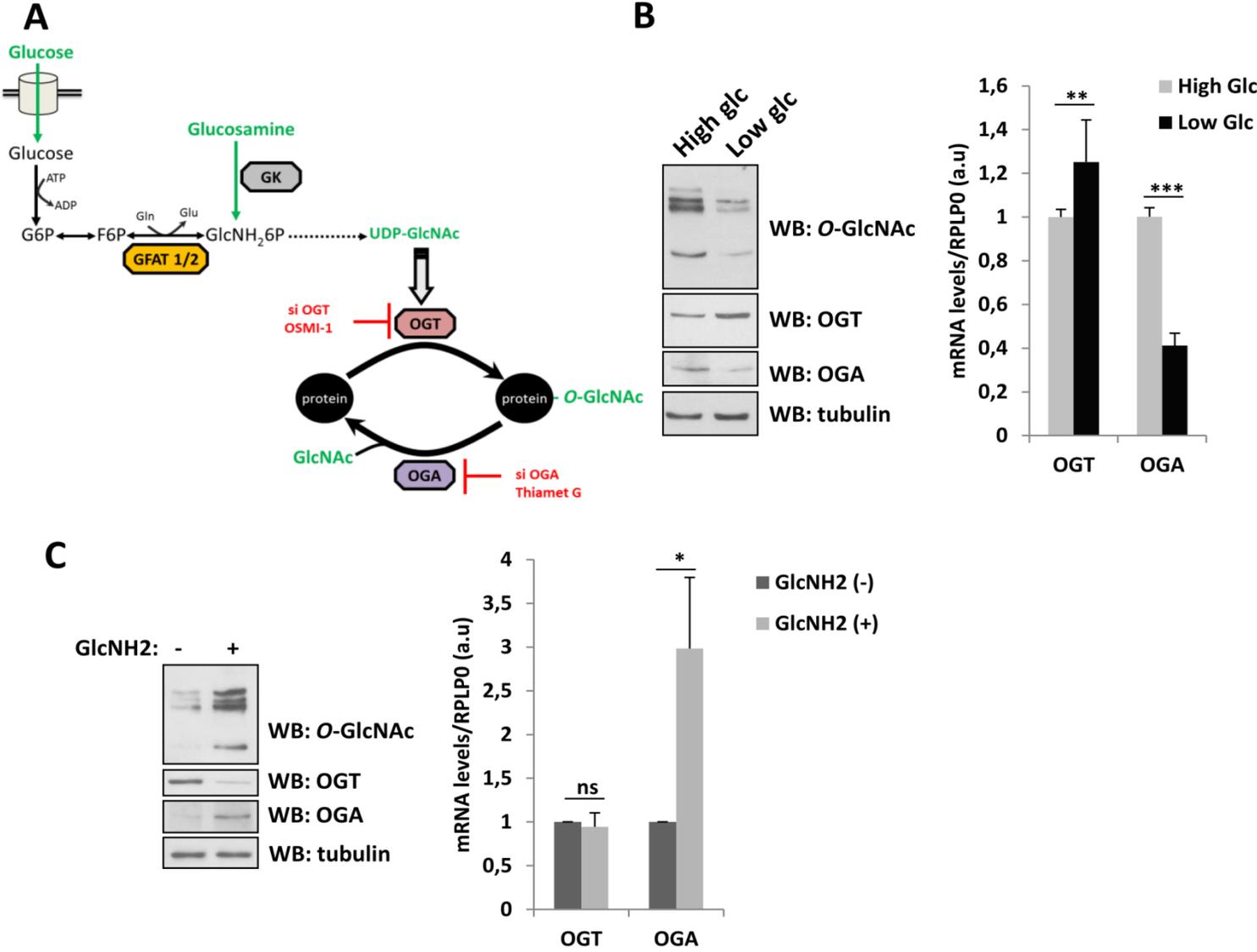
were normalized to RPLP0. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. NS: Non Significant, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test. **(B-C)**: HCT116 cells were treated either with the OGT inhibitor OSMI-1 **(B)** or with the OGA inhibitor Thiamet G **(C)** for 24h or the corresponding solvent as a negative control. *Left*: Treatment efficiency was ensured by Western Blot (WB) analyses of *O*-GlcNAcylation levels. OGT and OGA expression were also assessed. GAPDH was used as a loading control. Data shown are representative of three independent experiments. *Right*: Cells were harvested for total RNAs extraction. The mRNA expression levels of OGT and OGA were assessed by quantitative RT-PCR. Values were normalized to RPLP0. Data shown are the average  $\pm$  SD of three independent experiments. NS: Non Significant, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test.

**Figure 3: The compensatory regulation of OGT and OGA expression in response to changes in *O*-GlcNAc homeostasis occurs *in vivo* in the colon of mice.**

**(A)** A part of the colon homogenates from five mice treated with Thiamet G for two weeks or with PBS as a negative control were analyzed by Western Blot (WB) according to their *O*-GlcNAcylation, OGT and OGA contents. GAPDH was used as a loading control. The average ratios  $\pm$  S.D of *O*-GlcNAcylation/GAPDH, OGT/GAPDH and OGA/GAPDH are represented as histograms (\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 Student's t-test). **(B)** Another part of the colon homogenates were harvested for total RNAs extraction. The mRNA expression levels of OGT and OGA were assessed by quantitative RT-PCR. Values were normalized to RPLP0. Results are represented as box plots. The box area corresponds to the first and third quartile. The median is shown as a horizontal line in the box. The maximum and minimum of the values are indicated by the whiskers above and below the box.

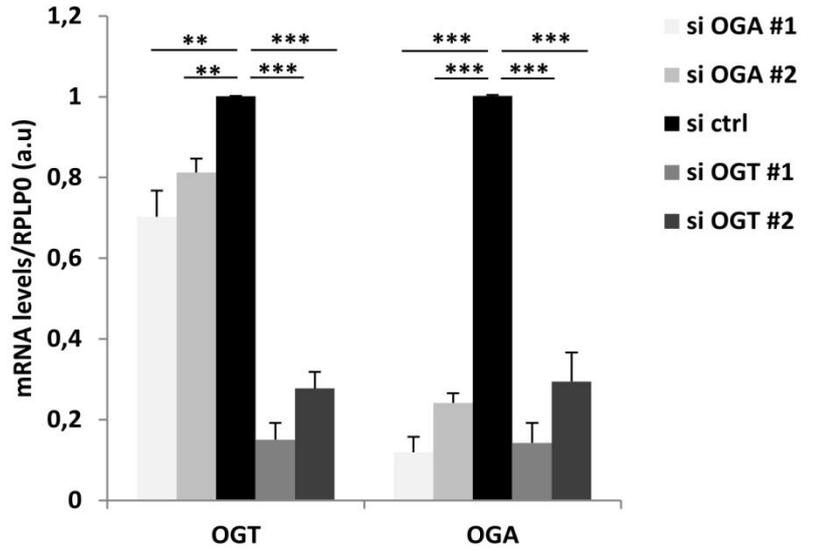
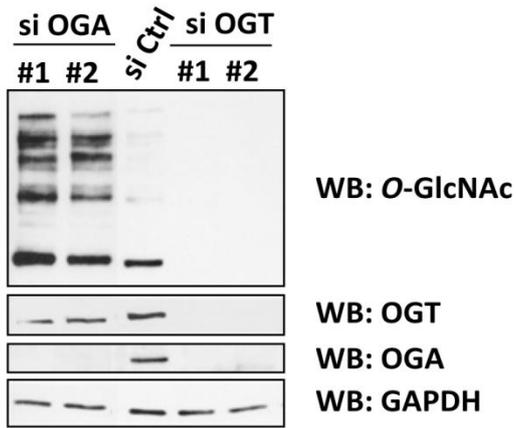
**Figure 4: Scheme depicting the main results of the study.**

*O*-GlcNAc homeostasis must be retained to preserve normal colonic cells functions. Indeed, aberrant *O*-GlcNAcylation levels, resulting from disruption of this *O*-GlcNAc homeostasis, have been linked to the development of several pathologies among which colorectal cancer. In this study, we provide evidences that in colon cells, modulation of *O*-GlcNAcylation levels leads to a compensatory regulation of OGT and OGA expression in an attempt to restore basal *O*-GlcNAcylation levels. The regulation of colonic OGA expression in response to changes in *O*-GlcNAc homeostasis occurs mostly at the transcriptional level whereas OGT regulation seems to rely mainly on post-transcriptional mechanisms.

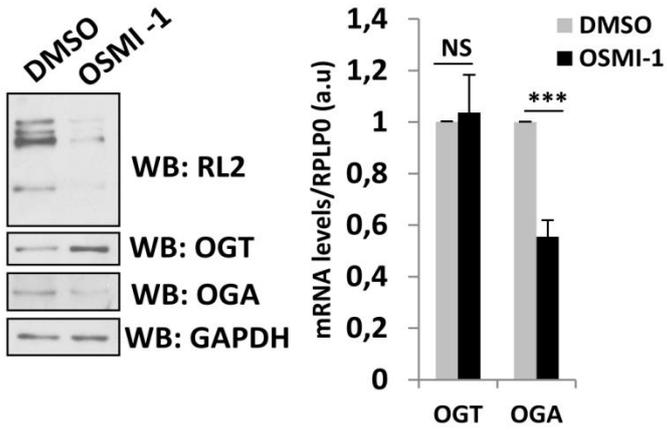


Decourcelle et al., Figure 1

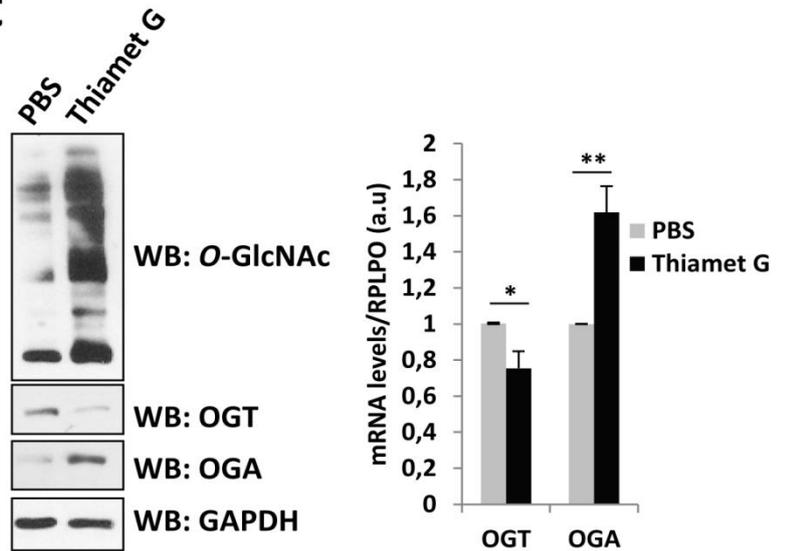
A



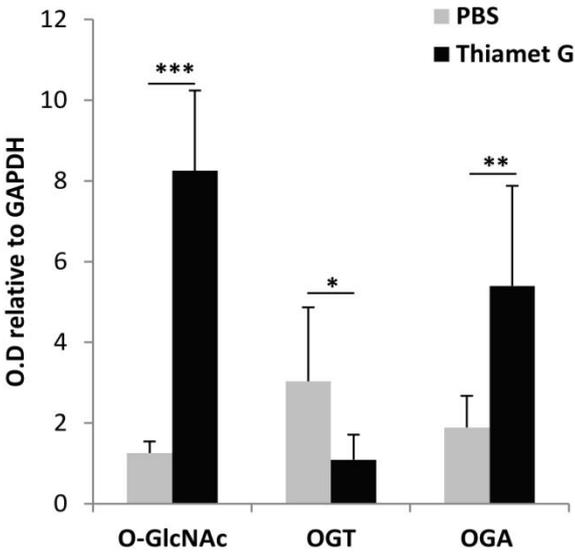
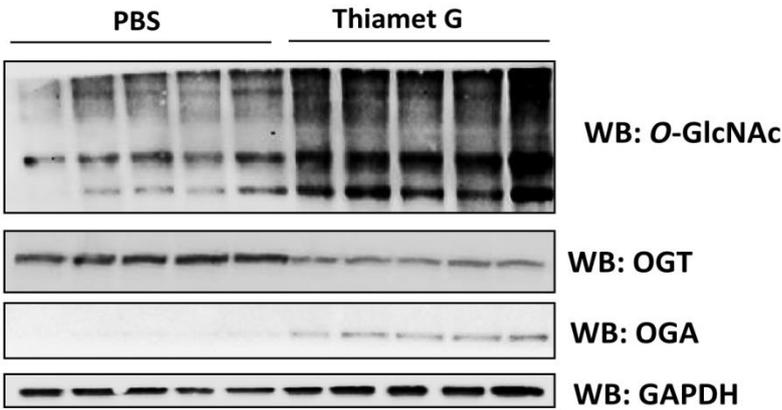
B



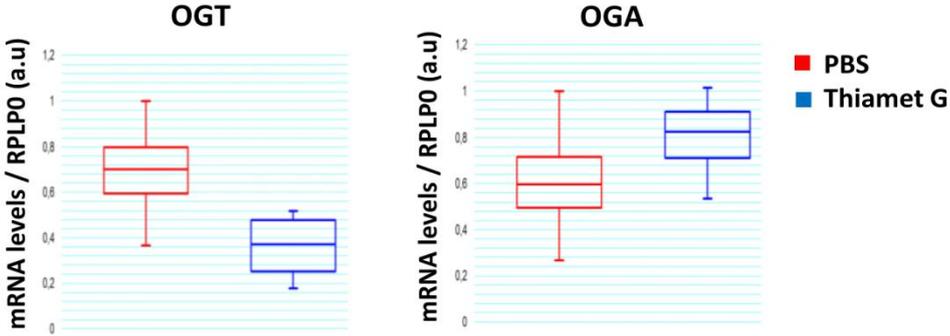
C

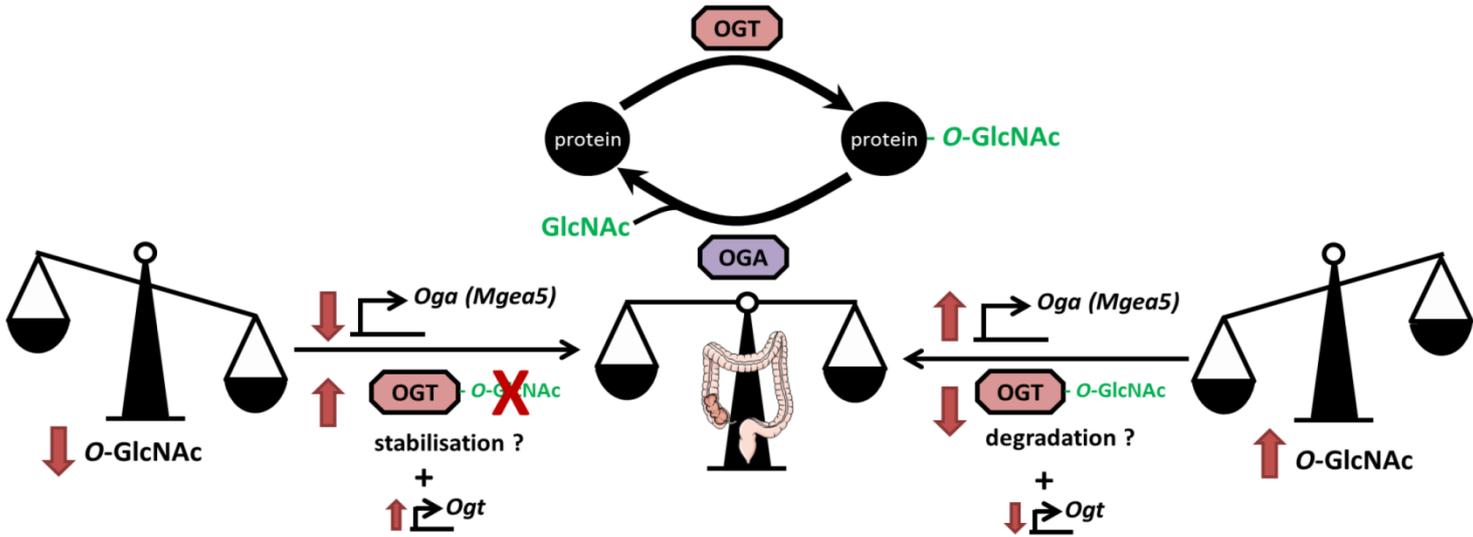


A



B





Decourcelle et al., Figure 4

# ***Annexe***

**Publication 3 :**

**Regulation of Polycomb  
Repression by *O*-GlcNAcylation:  
Linking Nutrition to Epigenetic  
Reprogramming in Embryonic  
Development and Cancer**



# Regulation of Polycomb Repression by O-GlcNAcylation: Linking Nutrition to Epigenetic Reprogramming in Embryonic Development and Cancer

Amélie Decourcelle, Dominique Leprince and Vanessa Dehennaut\*

Université de Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR8161, M3T: Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, Lille, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Tarik Issad,  
Institut National de la Santé et de la  
Recherche Médicale (INSERM),  
France

### Reviewed by:

Anna Krzeslak,  
University of Łódź, Poland  
Stéphanie Olivier-Van Stichelen,  
National Institutes of Health (NIH),  
United States

### \*Correspondence:

Vanessa Dehennaut  
vanessa.dehennaut@ibl.cnrs.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Molecular and Structural  
Endocrinology,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

**Received:** 10 December 2018

**Accepted:** 08 February 2019

**Published:** 27 February 2019

### Citation:

Decourcelle A, Leprince D and  
Dehennaut V (2019) Regulation of  
Polycomb Repression by  
O-GlcNAcylation: Linking Nutrition to  
Epigenetic Reprogramming in  
Embryonic Development and Cancer.  
*Front. Endocrinol.* 10:117.  
doi: 10.3389/fendo.2019.00117

Epigenetic modifications are major actors of early embryogenesis and carcinogenesis and are sensitive to nutritional environment. In recent years, the nutritional sensor O-GlcNAcylation has been recognized as a key regulator of chromatin remodeling. In this review, we summarize and discuss recent clues that OGT and O-GlcNAcylation intimately regulate the functions of the Polycomb group proteins at different levels especially during *Drosophila melanogaster* embryonic development and in human cancer cell lines. These observations define an additional connection between nutrition and epigenetic reprogramming associated to embryonic development and cancer.

**Keywords:** O-GlcNAcylation, Polycomb, epigenetic, drosophila development, cancer

## INTRODUCTION

Epigenetics refer to inherited changes in gene expression that do not involve changes in the underlying DNA sequence (a change in phenotype without a change in genotype). Actually, epigenetic modifications such as DNA methylation and histones post-translational modifications drive reading of the genes through the modulation of chromatin topology that governs DNA accessibility to transcriptional machinery. Epigenetic changes are a natural phenomenon: crucial epigenetic reprogramming events occur during germ cell development and early embryogenesis (1–3). Furthermore, the levels and turnover of epigenetic marks can be influenced directly and indirectly by several factors, including lifestyle and environment, which can lead to a modification of gene expression patterns and, consequently, affect our health for better or worse (4). In that sense, several studies have highlighted the key role of diet and nutritional compounds in the epigenetic regulation of gene expression, especially in the physiopathology of cancers. For instance, it was shown that resveratrol and grape seed proanthocyanidins found in red wine induced a decrease of cell viability and colony forming ability in two human breast cancer cell lines, MDA-MB-231 and MCF-7, with a decrease of histone deacetylase (HDAC) and DNA methyl transferase (DNMT) activities (5). Another study has demonstrated that EGCG (Epigallocatechin Gallate), a polyphenolic compound found in green tea, had the ability to inhibit Acute Promyelocytic Leukemia (APL) cells proliferation and to induce apoptosis by downregulating epigenetic modifiers such as DNMT1, HDAC1, HDAC2, the histone methyl transferase (HMT) G9a and some components of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) (6). These studies, among others, proved that food consumption can influence epigenetic modifications by directly affecting activities of “writers” and “erasers” of epigenetic modifications and have contributed to the emergence of the

concept of “epigenetic diet” which may have anti-cancer properties (7). On the contrary, many other studies support the hypothesis of a close link between nutritional disorders (obesity, metabolic syndrome, type 2 diabetes ...), well-known risk factors for many cancers, and epigenetic reprogramming linked to carcinogenesis (8). For example, hyperglycemia has been shown to increase the chemoresistance of several prostate cancer cell lines to chemotherapy through the increase of histone H3 and H4 acetylation on the promoter region of insulin like growth factor binding protein 2 (IGFB2), a key player of prostate cancer progression (9). Wu et al. recently reported a decrease in DNA cytosine hydroxymethylation (5hmC, the first step of DNA demethylation catalyzed by the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases) in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from diabetic individuals in comparison with healthy one (10). They demonstrated that this reduction of 5hmC was the result of glucose-regulated phosphorylation of TET2 by the nutrient and energy sensor AMPK (AMP-activated kinase) and that elevated glucose levels interfere with the expression of numerous cancer-associated genes in a TET2-dependent manner. Among the elements that could also connect nutrition to epigenetic reprogramming related to development and cancer, the nutritional sensor *O*-linked- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminylation (*O*-GlcNAcylation) has emerged, during the last decade as a key epigenetic regulator of gene expression (11, 12).

## O-GLCNACYLATION: A NUTRITIONAL SENSOR THAT REGULATES CHROMATIN REMODELING

Discovered in 1984 (13), *O*-GlcNAcylation is a reversible post-translational modification of cytosolic, nuclear, and mitochondrial proteins that consists in the covalent linkage of a unique residue of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) to serine and threonine moieties of target proteins (Figure 1). This post-translational modification is an important actor of cell signaling. *O*-GlcNAcylation targets and regulates thousands of proteins by monitoring their expression, stability, interaction with partners

**Abbreviations:** ASX, Additional Sex Combs; ASXL, Additional Sex Combs Like; BAP1, BRCA1 associated protein-1; BMI1 (PCGF4), B Lymphoma Mo-MLV insertion region-1; CARM1, Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1; CBX2, Chromobox Homolog 2; DNMT, DNA Methyl Transferase; EED, Embryonic Ectoderm Development; ESC, Extra Sex Combs; E(Z), Enhancer of Zeste; EZH2, Enhancer of Zeste Homolog 2; HAT, Histone Acetyl Transferase; HBP, Hexosamine Biosynthetic Pathway; HCF1, Host Cell Factor 1; HDAC, Histone Deacetylase; HIC1, Hypermethylated In Cancer 1; MLL5, Mixed Lineage Leukemia 5; NuRD, Nucleosome Remodeling and Deacetylase; NURF55, Nucleosome Remodeling Factor 55; OGA, *O*-GlcNAcase; *O*-GlcNAcylation, *O*-linked  $\beta$ -*N*-acetylglucosaminylation; OGT, *O*-GlcNAc Transferase; PC, Polycomb; PcG, Polycomb; PCGF, Polycomb group ring fingers; PER2, Period Circadian Regulator 2; PH, Polyhomeotic; PHO, Pleiohomeotic; PhoRC, Pho-Repressive Complex; PRC1, Polycomb Repressive Complex 1; PRC2, Polycomb Repressive Complex 2; PR-DUB, Pc-Repressive deubiquitinase; PRE, Polycomb Response Element; PSC, Posterior Sex Combs; RbAp46/48, Retinoblastoma Associated protein 46/48; RING1A/B, RING Finger Protein 1A/B; RNF2 (RING1B), Ring Finger Protein 2; Sce, Sex Comb Extra; SU(Z)12, Suppressor of Zeste 12; sxc, Super sex combs; TET, Ten Eleven Translocation; UDP-GlcNAc, Uridine Diphosphate *N*-acetylglucosamine; YY1, Yin Yang 1.

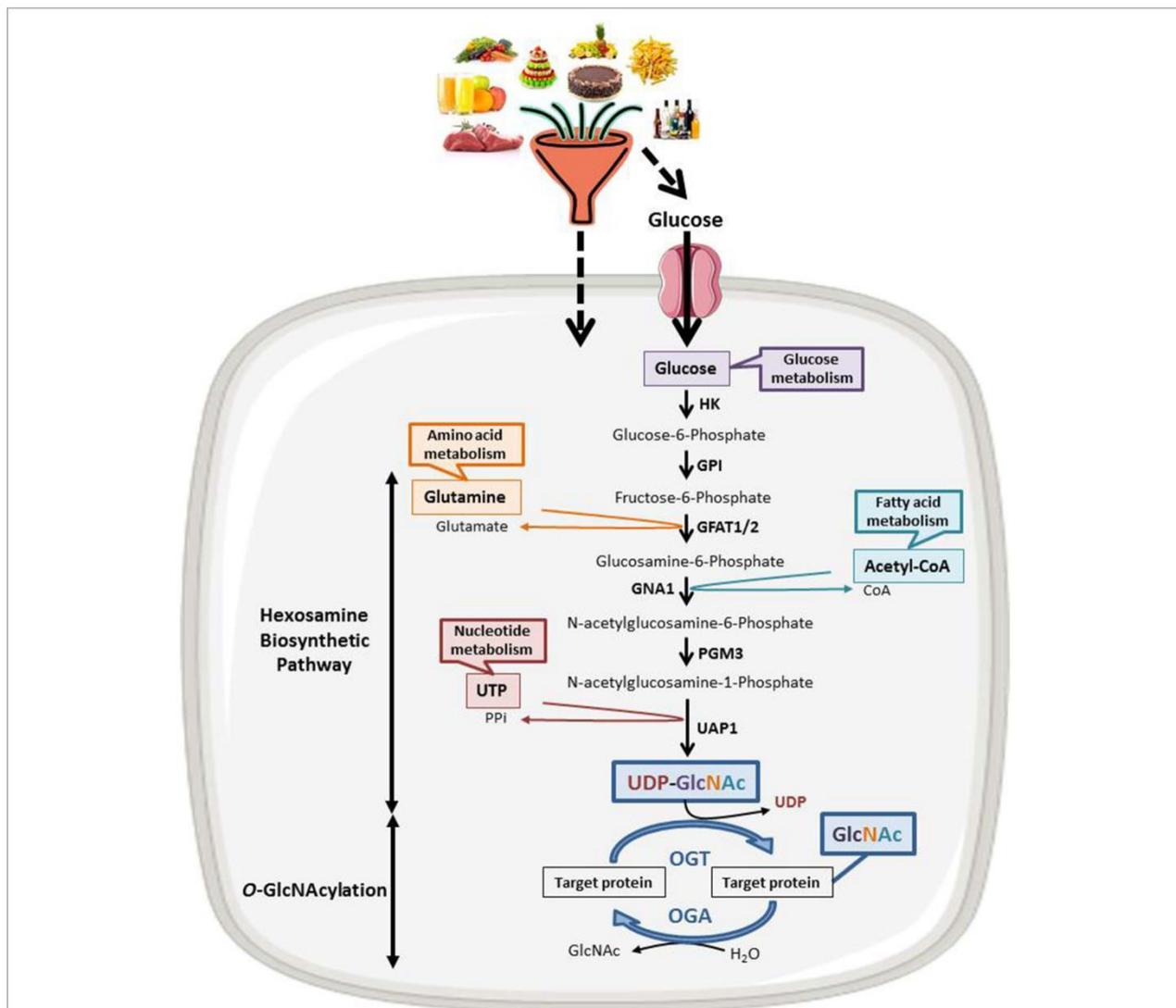
and subcellular localization (14). *O*-GlcNAcylation levels are regulated by a unique couple of enzymes: OGT (*O*-GlcNAc Transferase) catalyzes the transfer of GlcNAc from UDP-GlcNAc onto targeted proteins and OGA (*O*-GlcNAcase) hydrolyzes the residue (15). OGT activity and thus *O*-GlcNAcylation levels are closely dependent upon the concentration of the nucleotide sugar donor UDP-GlcNAc. UDP-GlcNAc is synthesized through the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) at the crossroad of carbohydrates, amino-acids, fatty acids, and nucleotides metabolisms (Figure 1) and thus concentration of UDP-GlcNAc in cells is highly responsive to nutrients flux. Consistently, cell culture in high concentration of glucose or glucosamine is sufficient to increase *O*-GlcNAcylation levels in numerous cancer cell lines including HT29, HCT116, MCF7 and HepG2 (16–18). *In vivo*, increased *O*-GlcNAcylation has also been evidenced in the colon and the liver of mice refed or force-fed with glucose or glucosamine in comparison with fasting mice (18–20), in mice fed with a high carbohydrate diet and in obese mice (*ob/ob*) compared, respectively, to the normal diet and the wild-type mice (21, 22). Taken together, these studies, amongst others, sustain the hypothesis that UDP-GlcNAc and *O*-GlcNAcylation can be considered as nutritional sensors that can relay the effects of excessive food supply, obesity, and any other metabolic disorders associated to increased risk of cancers. Many studies have also clearly shown that a disruption in *O*-GlcNAcylation homeostasis is found in many cancers; moreover, aberrant *O*-GlcNAcylation contributes to the etiology of cancers at several levels. The role of *O*-GlcNAcylation in cancer emergence and progression has been extensively reviewed (23, 24). In recent years, *O*-GlcNAcylation has emerged as a novel epigenetic modifier affecting chromatin remodeling and gene expression. In that respect, *O*-GlcNAcylation is itself part of the histone code and regulates the occurrence of other PTMs defining this code and more particularly methylation by modulating the function of several methyltransferases like CARM1 and MLL5. OGT interacts in a complex interplay with the DNA demethylase TET family and regulates the activity of several co-repressor complexes among which NuRD and mSin3A. These different aspects of the role of *O*-GlcNAcylation in the epigenetic regulation of gene expression has been reviewed elsewhere (11, 12, 25, 26) and will not be discussed here.

This mini-review will summarize and discuss recent data focusing on how OGT and *O*-GlcNAcylation influence directly and indirectly the function of the Polycomb group (PcG) proteins, master regulators of embryogenesis and actors of human carcinogenesis.

## O-GLCNACYLATION REGULATES PCG PROTEINS FUNCTIONS DURING DROSOPHILA MELANOGASTER DEVELOPMENT

### Organization of the PcG Proteins in *Drosophila Melanogaster*

The polycomb group (PcG) proteins form a diverse and conserved group of epigenetic modifiers and transcriptional



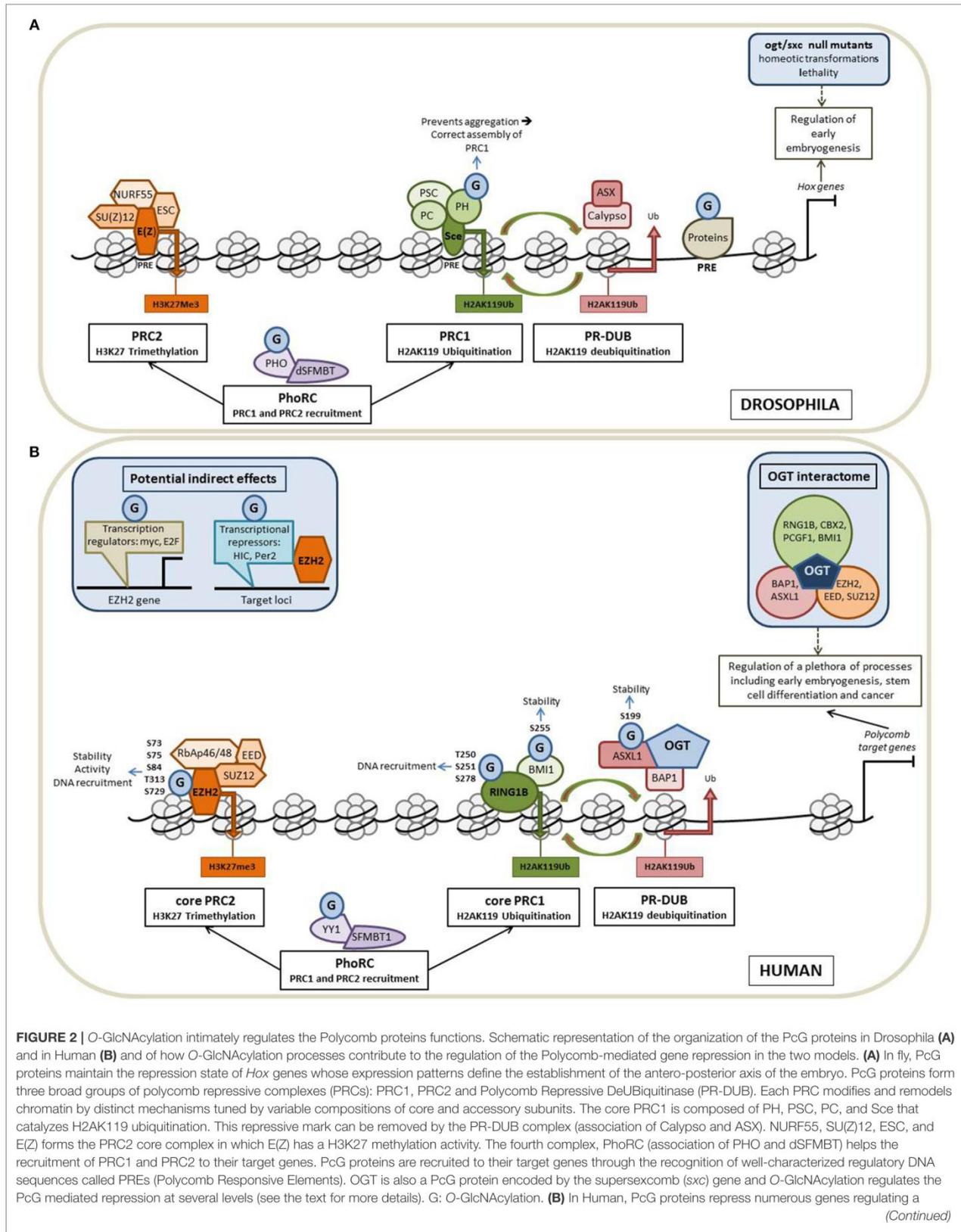
**FIGURE 1** | The nutritional sensing O-GlcNAcylation. UDP-GlcNAc, OGT's nucleotide sugar donor, is provided by the Hexosamine Biosynthetic Pathway (HBP) at the crossroad of glucose, amino acids, fatty acids and nucleotides metabolisms. UDP-GlcNAc levels are thus tightly correlated to the nutritional status of the organism. O-GlcNAcylation levels are regulated by a unique couple of enzymes: OGT that catalyzes the transfer of GlcNAc from UDP-GlcNAc onto the target protein and OGA that hydrolyzes the residue. HK, hexokinase; GPI, glucose-6-phosphate isomerase; GFAT, fructose-6-phosphate amidotransferase; GNA1, Glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase; PGM3, phosphoacetylglucosamine mutase; UAP1, UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase.

regulators. PcG proteins were initially discovered in *Drosophila melanogaster* (27). In fly, PcG proteins maintain the repression state of *Hox* genes whose expression patterns define the establishment of the antero-posterior axis of the embryo. PcG proteins form three broad groups of polycomb repressive complexes (PRCs) known as PRC1, PRC2, and Polycomb Repressive Deubiquitinase (PR-DUB). Each PRC modifies and remodels chromatin by distinct mechanisms tuned by variable compositions of core and accessory subunits (Figure 2A). The PRC1 is composed of Sce, PH, PSC and PC. Sce harbors a H2AK119 ubiquitination activity. This H2AK119Ub repressive

mark can be removed by the PR-DUB complex which is composed of Calypso and ASX. The association of NURF55, SU(Z)12, ESC and E(Z) leads to the formation of the PRC2. E(Z) has a H3K27 methylation activity. A fourth complex, PhoRC, allows the recruitment of PRC1 and PRC2 to their target genes and includes PHO and dSFMFT (28).

### Fruit Fly OGT Is a Polycomb Protein Essential to Early Embryogenesis

Intriguingly, two independent studies published in 2009 showed that the fruit fly O-GlcNAc transferase was encoded by the



**FIGURE 2** | plethora of cellular processes, including early embryogenesis, stem cell differentiation and cancer. As in fly, Human Polycomb proteins are organized into four main complexes. The core PRC1 is composed of RING1 proteins (RING1A or RING1B), which display E3 ubiquitin ligase activity and one of the six Polycomb group ring-finger domain proteins (PCGF1–PCGF6). The PR-DUB is composed of BAP1 and ASXL 1 or 2. The association of RbAp46/48, EED, SUZ12, and EZH2 leads to the formation of the PRC2 core complex. PhoRC includes YY1 and SFMBT1. As in fly, OGT interacts and modifies several Human PcG proteins to regulate their functions and O-GlcNAcylation could also play a more indirect role through the modification of factors regulating the expression of PcG (see the text for details).

*Super sex combs* (*sxc*) gene (29, 30) characterized for the first time 25 years earlier as a gene belonging to the Polycomb family (31). Therefore, with rapid generation time and genetic manipulation facilities, *Drosophila* has been a model of choice for understanding the role of O-GlcNAcylation in development. Several studies have highlighted homeotic transformations and lethality phenotypes of various null *sxc/ogt* mutants (29–34) and have been ascribed to the glycosyltransferase activity of *Drosophila* OGT (33, 34) thus demonstrating the crucial role of *ogt/sxc* and O-GlcNAcylation processes in early development. Consistent with these results, in an elegant approach consisting of probing O-GlcNAcylation by harnessing the O-GlcNAc binding properties of a catalytic mutant of a bacterial O-GlcNAcase (*CpOGA*<sup>D298N</sup>), Mariappa et al. demonstrated that the O-GlcNAcome was dynamic during the time course of *Drosophila* embryonic development (35). This OGA mutant was then used as a trap to enrich O-GlcNAcylation proteins from *Drosophila* embryo lysates and allowed the identification of the O-GlcNAcome associated with *Drosophila* embryogenesis (36). The authors identified more than 2,000 putative O-GlcNAcylation proteins, the majority of which being chromatin-associated proteins that include the HDACs Rpd3 and HDAC3, the putative HAT Enok, the bromodomain containing homeotic protein female sterile [*fs(1)h*; *Brd2* ortholog] and several transcription factors among which *Dp*, *Taf6*, *Cand1*, and *fkh*. The authors were also able to map several O-GlcNAcylation sites on 43 proteins whose half of which are involved in anatomical structure development and morphogenesis according to gene ontology enrichment analysis.

### Regulation of PcG Mediated Repression by O-GlcNAcylation

In *Drosophila*, PcG proteins are recruited to their target genes through the recognition of well-characterized regulatory DNA sequences called PREs (Polycomb Responsive Elements) (37). By CHIP-seq experiments performed in imaginal disc cells from *Drosophila* larvae, Gambetta and collaborators identified 1,138 sites occupied by O-GlcNAcylation proteins among which 490 colocalized with PREs suggesting that O-GlcNAcylation regulates the PcG mediated repression of *HOX* genes (29). Such a binding of O-GlcNAcylation proteins onto PREs has also been evidenced in two other independent studies (38, 39). This binding of O-GlcNAcylation proteins to PREs is in line with the results from Ingham showing that *ogt/sxc* is required for the selective repression of *HOX* genes in different larval segments (31). The Pho repressive complex (PhoRC) is involved in the recruitment of PRC1 and PRC2 (Figure 2A), thus the presence of Pho at genomic loci is often considered as a marker for identification of PREs. By CHIP-chip experiments conducted in S2 cells,

Akan et al. demonstrated that O-GlcNAc and Pho co-occupied many chromatin regions including the *HOX* genes clusters thus reinforcing the hypothesis of the role of O-GlcNAcylation in PcG mediated repression (38). Nonetheless, *ogt/sxc* null mutants do not present either any binding modification of PHO and E(Z) to PREs or any difference in H3K27me3 in comparison with wild-type *Drosophila* suggesting that *ogt/sxc* is not essential for PRC2 recruitment to target genes and H3K27me3 activity (29). However, in the same study, the authors demonstrated that PH (Polyhomeotic) is O-GlcNAcylation and observed a decrease of its binding on the majority of the PREs in *sxc/ogt* null mutants, underlying the role of O-GlcNAcylation in the interaction of PH with DNA. The same team demonstrated that O-GlcNAcylation prevents the self-aggregation of PH and is required for the correct assembly of PRC1 (32). Lastly, it was also demonstrated that PHO is O-GlcNAcylation but the role of the glycosylation on PHO properties has not been so far investigated (39). However, this post-translational modification does not seem to modify its DNA recruitment according to the results from Gambetta et al. (29).

### O-GLCNACYLATION REGULATES THE POLYCOMB PROTEINS FUNCTIONS IN HUMAN CANCER CELL LINES

#### Organization of the Polycomb Group Proteins in Mammals

Numerous orthologs of *Drosophila* PcG proteins have been identified in mammals and revealed that the PcG system is much more complex in mammals than in fly (40) (Figure 2B). In mammals, PRC1 is subdivided into canonical (cPRC1) and non-canonical complexes (ncPRC1). These two PRC1 complexes share a core complex that is composed of RING1 proteins (RING1A or RING1B), which display E3 ubiquitin ligase activity mediating ubiquitylation of histone H2A on lysine 119 (H2AK119Ub), and one of the six Polycomb group ring-finger domain proteins (PCGF1–PCGF6). The repressive mark H2AK119Ub can be removed by the PR-DUB complex which is composed of BAP1 and ASXL. The association of RbAp46/48, EED, SUZ12 and EZH2 leads to the formation of the mammalian PRC2 core complex. The association of several accessory proteins with the core PRC2 complex defined two subtypes of PRC2: PRC2.1 and PRC2.2. PRC2.1 is defined by its mutually exclusive binding of one of the three Polycomb-like homologs (PCLs) PHF1, PHF19, or MTF2; PRC2.2 is defined by the presence of the zinc-finger proteins AEBP2 and JARID2, which enhance enzymatic activity of the complex and regulate its chromatin binding affinity. Finally, the PhoRC includes YY1 and SFMBT1, and allows the recruitment of PRC1 and PRC2 to their target genes (28, 41).

In mammals, PcG proteins repress *Hox* genes but also control the expression of numerous other genes regulating a plethora of cellular processes, including X chromosome inactivation, genomic imprinting, cell cycle control and stem cell biology (40). Furthermore, misexpression or mutation of many PcG components has been evidenced in several cancers. Many studies have demonstrated that PcG proteins can play an oncogenic role. For example, high levels of EZH2 and the H3K27me3 mark often correlate with a poor prognosis in prostate tumors (42). In colorectal cancer, elevated expression of EZH2, BMI1, and SUZ12 in correlation with advanced stages of the disease and poor prognosis has also been evidenced (43). In line of this, the development of PcG-specific inhibitors, particularly compounds targeting EZH2, is an active area of investigation for the treatment of cancers (44) and the in-depth understanding of how PcG functions are regulated, such as by post-translational modifications, is a real challenge to improve the development of such therapeutic tools.

### Regulation of PcG Mediated Repression by O-GlcNAcylation

Recent data collected from proteomic analyses aiming at identifying the OGT interactome in HeLa cells revealed that the glycosyltransferase interacts with lots of PcG proteins belonging to PRC1, PRC2, PR-DUB, and PhoRC complexes: EZH2, EED, SUZ12, RNF2 (also called RING1B), CBX2, PCGF1, BMI1, BAP1, and ASXL1, thus suggesting that O-GlcNAcylation is also a master regulator of PcG functions in mammals (45). Another recent study, dedicated to mapping the human Polycomb complexome, showed that OGT is also an accessory protein of the PR-DUB complex (H2AK119Ub eraser) reinforcing the involvement of O-GlcNAcylation in the regulation of PcG (46). In the same way, ChIP Seq experiments performed in the colon cancer cell line HT29 demonstrated that O-GlcNAcylated proteins and H3K27 trimethylation were found together at the promoter region of 61 genes among which *MYBL* whose epigenetic regulation by O-GlcNAcylation affects the population of cancer stem cells (47). ChIP assays performed in the breast cancer cell line MCF7 indicated that the promoter regions of 16 potential tumor suppressor genes were bound by OGT and were enriched in EZH2 and H3K27me3 in an OGT-dependent manner (48), also arguing for a role of O-GlcNAcylation in the regulation of the PRC2-mediated repression in the context of cancer. Interestingly, recent data from Jiang et al. revealed that OGT and EZH2 expression were both post-transcriptionally repressed by miRNA-101 (49). The authors also showed that miRNA-101 was epigenetically silenced by OGT and EZH2 in several colorectal cancer cell lines resulting in the upregulation of the two enzymes in metastatic colorectal cancer in a vicious cycle fashion.

### OGT Interacts With and Modifies Several PcG Proteins

To date, among the OGT-interacting PcG proteins, five have been demonstrated to be O-GlcNAcylated in Human: EZH2,

BMI1 (also called PCGF4), RING1B, ASXL1, and YY1. O-GlcNAcylation of EZH2 was first evidenced in breast cancer MCF7 cells (48). In this study, the authors identified the serine 75 of EZH2 as the major O-GlcNAc site regulating the stability of the enzyme. Very recently, the same team performed further mass spectrometry analysis of EZH2-FLAG overexpressed in HEK 293T cells and identified four additional O-GlcNAcylation sites: S73, S84, T313, and S729 (50). By analyzing O-GlcNAcylation site mutants, the authors concluded that O-GlcNAcylation in the N-terminal region of EZH2 stabilizes the enzyme whereas the O-GlcNAcylation at S279 in the catalytic domain is essential for its methyltransferase activity. However, the role of O-GlcNAc modification on EZH2 is not so clear. While some studies confirm the role of O-GlcNAcylation in the regulation of EZH2 stability and catalytic activity (49, 51), others propose that the glycosylation regulates rather EZH2 recruitment to some of its target genes such as *FOXC1* (52). BMI1 was found to be O-GlcNAcylated at serine 255 in prostate cancer cells (53). O-GlcNAcylation of BMI1 prevents its proteasomal degradation and promotes its oncogenic activity. O-GlcNAcylation of RING1B was evidenced in human embryonic stem cells and mapped at residues threonine 250, serine 251 and serine 278 (54). By ChIP Seq experiments, the authors demonstrated that the non-GlcNAcylated form of RING1B preferentially binds to genes related to metabolism and cell cycle processes whereas O-GlcNAcylated-RING1B was found to the promoter region of genes related to neuronal differentiation. This means that O-GlcNAcylation might regulate RING1B DNA recruitment and targeting of the PRC1 complex to specific loci. It has been recently shown that OGT interacts also with ASXL1, a PR-DUB component, and drives its O-GlcNAcylation at serine 199 to regulate its stability (51). Finally the O-GlcNAcylation of YY1 has been demonstrated in muscle cells but its potential influence on the recruitment of PRC1 and PRC2 has not been yet investigated (55).

### Potential Indirect Regulation of PcG Functions by O-GlcNAcylation

Beyond the direct regulation of PcG functions by their own O-GlcNAcylation, the glycosylation could play a more distant role through the modification of factors regulating the expression of PcG even if it has not been demonstrated to date. For example, two transcriptional regulators of EZH2: *c-myc* (56) and *E2F* (57) are O-GlcNAcylated (58, 59). Although the mode of recruitment of the Polycomb proteins to their target genes is well-known in *Drosophila*, this mechanism is not clear in humans and remains to be clarified. Nevertheless, it involves several partners that direct the PcG proteins to specific loci. For example, the tumor suppressor gene *HIC1* (60) and the co-repressor *PER2* (61) allow the recruitment of PRC2 to some target genes. In the same vein, RING1B and EZH2 have been identified as Snail-interacting proteins (62, 63). Interestingly, these three PRC partners are O-GlcNAcylated (64–66); it can be therefore hypothesized, although not yet studied, that O-GlcNAcylation influences the interaction of the PRC complexes with these proteins.

## CONCLUSION

O-GlcNAcylation processes and epigenetic modifications are both sensitive to nutritional environment and have been evidenced as key regulators of embryogenesis and carcinogenesis. In this review, we summarized evidences that OGT and O-GlcNAcylation intimately regulate the functions of the Polycomb group proteins at different levels especially during *Drosophila melanogaster* embryonic development and in human cancer cell lines (Figure 2). Although, further works are required to clarify the roles of O-GlcNAcylation in PcG mediated repression, especially during cancer emergence and progression, all the data collected here sustain the hypothesis that O-GlcNAcylation is a new link between nutrition and epigenetic reprogramming of cancer cells. These observations could explain in part why nutritional disorders like diabetes or metabolic syndromes are often associated with the risk of cancer. Indeed, one can easily hypothesize that nutritional disorders, by increasing cellular levels of UDP-GlcNAc and O-GlcNAcylation leads to

aberrant activity of PcG proteins misregulating genes driving carcinogenesis. Thus, in the next future, the O-GlcNAcylated forms of PcG proteins may be envisaged as diagnostic or prognostic tools in cancer and their targeting may also be studied as new therapeutic approaches.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AD and VD conceived the plan and wrote the review. DL revised it critically for important intellectual content.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Prof. Tony Lefebvre for the critical reading of our manuscript. Our work is supported by the GEFLUC Flandres/Artois, the Ligue Contre le Cancer/Comité du Nord, the Canceropôle Nord-Ouest and the Centre National de la Recherche Scientifique. AD is the recipient of a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

## REFERENCES

- Shi L, Wu J. Epigenetic regulation in mammalian preimplantation embryo development. *Reprod Biol Endocrinol.* (2009) 7:59. doi: 10.1186/1477-7827-7-59
- Weaver JR, Susiarjo M, Bartolomei MS. Imprinting and epigenetic changes in the early embryo. *Mamm Genome* (2009) 20:532–43. doi: 10.1007/s00335-009-9225-2
- Nestorov P, Tardat M, Peters AHFM. H3K9/HP1 and Polycomb: two key epigenetic silencing pathways for gene regulation and embryo development. *Curr Top Dev Biol.* (2013) 104:243–91. doi: 10.1016/B978-0-12-416027-9.00008-5
- Tiffon C. The impact of nutrition and environmental epigenetics on human health and disease. *Int J Mol Sci.* (2018) 19:3425. doi: 10.3390/ijms19113425
- Gao Y, Tollefsbol TO. Combinational proanthocyanidins and resveratrol synergistically inhibit human breast cancer cells and impact epigenetic-mediating machinery. *Int J Mol Sci.* (2018) 19:2204. doi: 10.3390/ijms19082204
- Borutinskaite V, Virkšaitė A, Gudelyte G, Navakauskienė R. Green tea polyphenol EGCG causes anti-cancerous epigenetic modulations in acute promyelocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* (2018) 59:469–78. doi: 10.1080/10428194.2017.1339881
- Hardy TM, Tollefsbol TO. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. *Epigenomics* (2011) 3:503–18. doi: 10.2217/epi.11.71
- Bishop KS, Ferguson LR. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. *Nutrients* (2015) 7:922–47. doi: 10.3390/nu7020922
- Biernacka KM, Uzoh CC, Zeng L, Persad RA, Bahl A, Gillatt D, et al. Hyperglycaemia-induced chemoresistance of prostate cancer cells due to IGF2BP2. *Endocr Relat Cancer* (2013) 20:741–51. doi: 10.1530/ERC-13-0077
- Wu D, Hu D, Chen H, Shi G, Fetahu IS, Wu F, et al. Glucose-regulated phosphorylation of TET2 by AMPK reveals a pathway linking diabetes to cancer. *Nature* (2018) 559:637. doi: 10.1038/s41586-018-0350-5
- Dehennaut V, Leprince D, Lefebvre T. O-GlcNAcylation, an epigenetic mark. focus on the histone code, TET family proteins, and polycomb group proteins. *Front Endocrinol.* (2014) 5:155. doi: 10.3389/fendo.2014.00155
- Leturcq M, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart A-S. O-GlcNAcylation and chromatin remodeling in mammals: an up-to-date overview. *Biochem Soc Trans.* (2017) 45:323–38. doi: 10.1042/BST20160388
- Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem.* (1984) 259:3308–17.
- Bond MR, Hanover JA. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol.* (2015) 208:869–80. doi: 10.1083/jcb.201501101
- Vocadlo DJ. O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation. *Curr Opin Chem Biol.* (2012) 16:488–97. doi: 10.1016/j.cbpa.2012.10.021
- Guinez C, Losfeld M-E, Cacan R, Michalski JC, Lefebvre T. Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology* (2006) 16:22–8. doi: 10.1093/glycob/cwj041
- Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, Baldini SF, Dehennaut V, Toillon RA, Le Bourhis X, et al. Silencing the nucleocytoplasmic O-GlcNAc transferase reduces proliferation, adhesion, and migration of cancer and fetal human colon cell lines. *Front Endocrinol.* (2016) 7:46. doi: 10.3389/fendo.2016.00046
- Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir A-M, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski J-C, et al. The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of  $\beta$ -catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2012) 302:E417–24. doi: 10.1152/ajpendo.00390.2011
- Guinez C, Filhoulaud G, Rayah-Benhamed F, Marmier S, Dubuquoy C, Dentin R, et al. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes* (2011) 60:1399–413. doi: 10.2337/db10-0452
- Baldini SF, Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, Mir A-M, Mortuaire M, Lefebvre T, et al. Glucokinase expression is regulated by glucose through O-GlcNAc glycosylation. *Biochem Biophys Res Commun.* (2016) 478:942–8. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.056
- Olivier-Van Stichelen S, Dehennaut V, Buzy A, Zacharyus JL, Guinez C, Mir A-M, et al. O-GlcNAcylation stabilizes  $\beta$ -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J.* (2014) 28:3325–38. doi: 10.1096/fj.13-243535
- Very N, Steenackers A, Dubuquoy C, Vermuse J, Dubuquoy L, Lefebvre T, et al. Cross regulation between mTOR signaling and O-GlcNAcylation. *J Bioenerg Biomembr.* (2018) 50:213–22. doi: 10.1007/s10863-018-9747-y
- Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. O-GlcNAcylation: a new cancer hallmark? *Front Endocrinol.* (2013) 4:99. doi: 10.3389/fendo.2013.00099
- de Queiroz RM, Carvalho E, Dias WB. O-GlcNAcylation: the sweet side of the cancer. *Front Oncol.* (2014) 4:132. doi: 10.3389/fonc.2014.00132
- Hardivillé S, Hart GW. Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation. *Cell Metab.* (2014) 20:208–13. doi: 10.1016/j.cmet.2014.07.014
- Wu D, Cai Y, Jin J. Potential coordination role between O-GlcNAcylation and epigenetics. *Protein Cell.* (2017) 8:713–23. doi: 10.1007/s13238-017-0416-4

27. Lewis PH. *New Mutants Report*. Drosophila Information Service (1947).
28. Lanzuolo C, Orlando V. Memories from the polycomb group proteins. *Annu Rev Genet.* (2012) 46:561–89. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155603
29. Gambetta MC, Oktaba K, Müller J. Essential role of the glycosyltransferase *sxc/Ogt* in polycomb repression. *Science* (2009) 325:93–6. doi: 10.1126/science.1169727
30. Sinclair DAR, Syrzycka M, Macauley MS, Rastgardani T, Komljenovic I, Vocadlo DJ, et al. Drosophila O-GlcNAc transferase (OGT) is encoded by the Polycomb group (PcG) gene, super sex combs (*sxc*). *Proc Natl Acad Sci USA.* (2009) 106:13427–32. doi: 10.1073/pnas.0904638106
31. Ingham PW. A gene that regulates the bithorax complex differentially in larval and adult cells of Drosophila. *Cell* (1984) 37:815–23. doi: 10.1016/0092-8674(84)90416-1
32. Gambetta MC, Müller J. O-GlcNAcylation prevents aggregation of the polycomb group repressor polyhomeotic. *Dev Cell* (2014) 31:629–39. doi: 10.1016/j.devcel.2014.10.020
33. Mariappa D, Zheng X, Schimpl M, Raimi O, Ferenbach AT, Müller HAJ, et al. Dual functionality of O-GlcNAc transferase is required for Drosophila development. *Open Biol* (2015) 5:150234. doi: 10.1098/rsob.150234
34. Mariappa D, Ferenbach AT, van Aalten DMF. Effects of hypo-O-GlcNAcylation on Drosophila development. *J Biol Chem.* (2018) 293:7209–21. doi: 10.1074/jbc.RA118.002580
35. Mariappa D, Selvan N, Borodkin V, Alonso J, Ferenbach AT, Shepherd C, et al. A mutant O-GlcNAcase as a probe to reveal global dynamics of the Drosophila O-GlcNAc developmental proteome. *Biochem J.* (2015) 470:255–62. doi: 10.1042/BJ20150610
36. Selvan N, Williamson R, Mariappa D, Campbell DG, Gourlay R, Ferenbach AT, et al. A mutant O-GlcNAcase enriches Drosophila developmental regulators. *Nat Chem Biol.* (2017) 13:882–7. doi: 10.1038/nchembio.2404
37. Kassis JA, Brown JL. Polycomb group response elements in Drosophila and vertebrates. *Adv Genet.* (2013) 81:83–118. doi: 10.1016/B978-0-12-407677-8.00003-8
38. Akan I, Love DC, Harwood KR, Bond MR, Hanover JA. Drosophila O-GlcNAcase deletion globally perturbs chromatin O-GlcNAcylation. *J Biol Chem.* (2016) 291:9906–19. doi: 10.1074/jbc.M115.704783
39. Liu T-W, Myschysyn M, Sinclair DA, Cecioni S, Beja K, Honda BM, et al. Genome-wide chemical mapping of O-GlcNAcylated proteins in *Drosophila melanogaster*. *Nat Chem Biol.* (2017) 13:161–7. doi: 10.1038/nchembio.2247
40. Schuettengruber B, Bourbon HM, Di Croce L, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax: 70 years and counting. *Cell* (2017) 171:34–57. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.002
41. Chittock EC, Latwiel S, Miller TCR, Müller CW. Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochem Soc Trans.* (2017) 45:193–205. doi: 10.1042/BST20160173
42. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* (2002) 419:624–9. doi: 10.1038/nature01075
43. Benard A, Goossens-Beumer IJ, van Hoesel AQ, Horati H, Putter H, Zeestraten ECM, et al. Prognostic value of polycomb proteins EZH2, BMI1 and SUZ12 and histone modification H3K27me3 in colorectal cancer. *PLoS ONE* (2014) 9:e108265. doi: 10.1371/journal.pone.0108265
44. Kim KH, Roberts CWM. Targeting EZH2 in cancer. *Nat Med.* (2016) 22:128–34. doi: 10.1038/nm.4036
45. Gao J, Yang Y, Qiu R, Zhang K, Teng X, Liu R, et al. Proteomic analysis of the OGT interactome: novel links to epithelial-mesenchymal transition and metastasis of cervical cancer. *Carcinogenesis* (2018) 39:1222–34. doi: 10.1093/carcin/bgy097
46. Hauri S, Comoglio F, Seimiya M, Gerstung M, Glatter T, Hansen K, et al. A high-density map for navigating the human polycomb complexome. *Cell Rep.* (2016) 17:583–95. doi: 10.1016/j.celrep.2016.08.096
47. Guo H, Zhang B, Nairn AV, Nagy T, Moremen KW, Buckhaults P, et al. O-Linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) expression levels epigenetically regulate colon cancer tumorigenesis by affecting the cancer stem cell compartment via modulating expression of transcriptional factor MYBL1. *J Biol Chem.* (2017) 292:4123–37. doi: 10.1074/jbc.M116.763201
48. Chu CS, Lo PW, Yeh YH, Hsu PH, Peng SH, Teng YC, et al. O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2014) 111:1355–60. doi: 10.1073/pnas.1323226111
49. Jiang M, Xu B, Li X, Shang Y, Chu Y, Wang W, et al. O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer metastasis via the miR-101-O-GlcNAc/EZH2 regulatory feedback circuit. *Oncogene* (2019) 38:301–16. doi: 10.1038/s41388-018-0435-5
50. Lo PW, Shie JJ, Chen CH, Wu CY, Hsu TL, Wong CH. O-GlcNAcylation regulates the stability and enzymatic activity of the histone methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2018) 115:7302–7. doi: 10.1073/pnas.1801850115
51. Inoue D, Fujino T, Sheridan P, Zhang Y, Nagase R, Horikawa S, et al. A novel ASXL1-OGT axis plays roles in H3K4 methylation and tumor suppression in myeloid malignancies. *Leukemia* (2018) 32:1327–37. doi: 10.1038/s41375-018-0083-3
52. Forma E, Józwiak P, Ciesielski P, Zaczek A, Starska K, Bryś M, et al. Impact of OGT deregulation on EZH2 target genes FOXA1 and FOXC1 expression in breast cancer cells. *PLoS ONE* (2018) 13:e0198351. doi: 10.1371/journal.pone.0198351
53. Li Y, Wang L, Liu J, Zhang P, An M, Han C, et al. O-GlcNAcylation modulates Bmi-1 protein stability and potential oncogenic function in prostate cancer. *Oncogene* (2017) 36:6293–305. doi: 10.1038/ncr.2017.223
54. Maury JJP, El Farran CA, Ng D, Loh YH, Bi X, Bardor M, et al. RING1B O-GlcNAcylation regulates gene targeting of polycomb repressive complex 1 in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res.* (2015) 15:182–9. doi: 10.1016/j.scr.2015.06.007
55. Hiromura M, Choi CH, Sabourin NA, Jones H, Bachvarov D, Usheva A. YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation). *J Biol Chem.* (2003) 278:14046–52. doi: 10.1074/jbc.M300789200
56. Koh CM, Iwata T, Zheng Q, Bethel C, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget* (2011) 2:669–83. doi: 10.18632/oncotarget.327
57. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* (2003) 22:5323–35. doi: 10.1093/emboj/cdg542
58. Wells L, Slawson C, Hart GW. The E2F-1 associated retinoblastoma-susceptibility gene product is modified by O-GlcNAc. *Amino Acids* (2011) 40:877–83. doi: 10.1007/s00726-010-0709-x
59. Itkonen HM, Minner S, Guldvik IJ, Sandmann MJ, Tsourlakis MC, Berge V, et al. O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* (2013) 73:5277–87. doi: 10.1158/0008-5472.CCR-13-0549
60. Boulay G, Dubuissez M, Van Rechem C, Forget A, Helin K, Ayrault O, et al. Hypermethylated in cancer 1 (HIC1) recruits polycomb repressive complex 2 (PRC2) to a subset of its target genes through interaction with human polycomb-like (hPCL) proteins. *J Biol Chem.* (2012) 287:10509–24. doi: 10.1074/jbc.M111.320234
61. Hwang-Verslues WW, Chang PH, Jeng YM, Kuo WH, Chiang PH, Chang YC, et al. Loss of corepressor PER2 under hypoxia up-regulates OCT1-mediated EMT gene expression and enhances tumor malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2013) 110:12331–6. doi: 10.1073/pnas.1222684110
62. Tong ZT, Cai MY, Wang XG, Kong LL, Mai SJ, Liu YH, et al. EZH2 supports nasopharyngeal carcinoma cell aggressiveness by forming a co-repressor complex with HDAC1/HDAC2 and Snail to inhibit E-cadherin. *Oncogene* (2012) 31:583–94. doi: 10.1038/ncr.2011.254
63. Chen J, Xu H, Zou X, Wang J, Zhu Y, Chen H, et al. Snail recruits Ring1B to mediate transcriptional repression and cell migration in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* (2014) 74:4353–63. doi: 10.1158/0008-5472.CCR-14-0181

64. Lefebvre T, Pinte S, Guérardel C, Deltour S, Martin-Soudant N, Slomianny M-C, et al. The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is O-GlcNAc glycosylated. *Eur J Biochem.* (2004) 271:3843–54. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04316.x
65. Kaasik K, Kivimäe S, Allen JJ, Chalkley RJ, Huang Y, Baer K, et al. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab.* (2013) 17:291–302. doi: 10.1016/j.cmet.2012.12.017
66. Park SY, Kim HS, Kim NH, Ji S, Cha SY, Kang JG, et al. Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *EMBO J.* (2010) 29:3787–96. doi: 10.1038/emboj.2010.254

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Decourcelle, Leprince and Dehennaut. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# **Bibliographie**

**BIBLIOGRAPHIE :**

~ **A** ~

---

- Adhikari A**, Mainali P, Davie JK. JARID2 and the PRC2 complex regulate the cell cycle in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2019 Dec 20;294(51):19451-64.
- Ahmed I**, Roy BC, Subramaniam D, Ganie SA, Kwatra D, Dixon D, et al. An ornamental plant targets epigenetic signaling to block cancer stem cell-driven colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 2016 Apr 1;37(4):385-96.
- Akella NM**, Ciraku L, Reginato MJ. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC Biol*. 2019 Dec;17(1):52.
- Alfaro JF**, Gong C-X, Monroe ME, Aldrich JT, Clauss TRW, Purvine SO, 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 May 8;109(19):7280-5.
- Ali A**, Kim SH, Kim MJ, Choi MY, Kang SS, Cho GJ, et al. O-GlcNAcylation of NF- $\kappa$ B Promotes Lung Metastasis of Cervical Cancer Cells via Upregulation of CXCR4 Expression. *Mol Cells*. 2017 Jul 31;40(7):476-84.
- Allan RK**, Ratajczak T. Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperones*. 2011 Jul;16(4):353-67.
- Allison DF**, Wamsley JJ, Kumar M, Li D, Gray LG, Hart GW, et al. Modification of RelA by O-linked N-acetylglucosamine links glucose metabolism to NF- $\kappa$ B acetylation and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 16;109(42):16888-93.
- Al-Sohaily S**, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012 Sep;27(9):1423-31.
- Andreoli F**, Del Rio A. Physicochemical modifications of histones and their impact on epigenomics. *Drug Discov Today*. 2014 Sep 1;19(9):1372-9.
- Antonyamy S**, Condon B, Druzina Z, Bonanno JB, Gheyi T, Zhang F, et al. Structural Context of Disease-Associated Mutations and Putative Mechanism of Autoinhibition Revealed by X-Ray Crystallographic Analysis of the EZH2-SET Domain. *PLoS ONE*. 2013 Dec 19;8(12).
- Aquino-Gil M**, Pierce A, Perez-Cervera Y, Zenteno E, Lefebvre T. OGT: a short overview of an enzyme standing out from usual glycosyltransferases. *Biochem Soc Trans*. 2017 Apr 15;45(2):365-70.
- Arafeh R**, Samuels Y. PIK3CA in cancer: The past 30 years. *Semin Cancer Biol*. 2019 Dec 1;59:36-49.

~ **B** ~

---

- Balacescu O**, Sur D, Cainap C, Visan S, Cruceriu D, Manzat-Saplacan R, et al. The Impact of miRNA in Colorectal Cancer Progression and Its Liver Metastases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(12).
- Banerjee PS**, Lagerlöf O, Hart GW. Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol Aspects Med.* 2016 Oct 1;51:1-15.
- Barrett C**, Guthrie S. Expression patterns of the netrin receptor UNC5H1 among developing motor neurons in the embryonic rat hindbrain. *Mech Dev.* 2001 Aug 1;106(1):163-6.
- Bauer C**, Göbel K, Nagaraj N, Colantuoni C, Wang M, Müller U, et al. Phosphorylation of TET Proteins Is Regulated via O-GlcNAcylation by the O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase (OGT). *J Biol Chem.* 2015 Feb 20;290(8):4801-12.
- Beausoleil SA**, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li J, et al. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proc Natl Acad Sci.* 2004 Aug 17;101(33):12130-5.
- Beishline K**, Azizkhan-Clifford J. Sp1 and the 'hallmarks of cancer.' *FEBS J.* 2015;282(2):224-58.
- Benninghoff AD**, Hintze KJ, Monsanto SP, Rodriguez DM, Hunter AH, Phatak S, et al. Consumption of the Total Western Diet Promotes Colitis and Inflammation-Associated Colorectal Cancer in Mice. *Nutrients.* 2020 Feb 20;12(2).
- Benoit YD**, Laursen KB, Witherspoon MS, Lipkin SM, Gudas LJ. Inhibition of PRC2 histone methyltransferase activity increases TRAIL-mediated apoptosis sensitivity in human colon cancer cells. *J Cell Physiol.* 2013a Apr;228(4):764-72.
- Benoit YD**, Witherspoon MS, Laursen KB, Guezguez A, Beauséjour M, Beaulieu J-F, et al. Pharmacological inhibition of polycomb repressive complex-2 activity induces apoptosis in human colon cancer stem cells. *Exp Cell Res.* 2013b Jun 10;319(10).
- Bernet A**, Mazelin L, Coissieux M-M, Gadot N, Ackerman SL, Scoazec J-Y, et al. Inactivation of the UNC5C Netrin-1 receptor is associated with tumor progression in colorectal malignancies. *Gastroenterology.* 2007 Dec;133(6):1840-8.
- Bernet A**, Mehlen P. La Nétrine-1 et ses récepteurs à dépendance: rôle dans les cancers colorectaux. *Pathol Biol.* 2005 Jul 1;53(6):328-33.
- Bishop KS**, Ferguson LR. The interaction between epigenetics, nutrition and the development of cancer. *Nutrients.* 2015 Jan 30;7(2):922-47.
- Blackledge NP**, Farcas AM, Kondo T, King HW, McGouran JF, Hanssen LLP, et al. Variant PRC1 Complex-Dependent H2A Ubiquitylation Drives PRC2 Recruitment and Polycomb Domain Formation. *Cell.* 2014 Jun 5;157(6):1445-59.

- Bond MR**, Hanover JA. A little sugar goes a long way: The cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol.* 2015 Mar 30;208(7):869–80.
- Borodkin VS**, Schimpl M, Gundogdu M, Rafie K, Dorfmüller HC, Robinson DA, et al. Bisubstrate UDP-peptide conjugates as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *Biochem J.* 2014 Feb 1;457(Pt 3):497–502.
- Bos JL**, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature.* 1987 Jun 28;327(6120):293–7.
- Bouazzi H**, Lesca G, Trujillo C, Alwasayah MK, Munnich A. Nonsyndromic X-linked intellectual deficiency in three brothers with a novel MED12 missense mutation [c.5922G>T (p.Glu1974His)]. *Clin Case Rep.* 2015 Jul;3(7):604–9.
- Boulay G**, Dubuissez M, Van Rechem C, Forget A, Helin K, Ayrault O, et al. Hypermethylated in cancer 1 (HIC1) recruits polycomb repressive complex 2 (PRC2) to a subset of its target genes through interaction with human polycomb-like (hPCL) proteins. *J Biol Chem.* 2012 Mar 23;287(13):10509–24.
- Boussios S**, Ozturk MA, Moschetta M, Karathanasi A, Zakyntinakis-Kyriakou N, Katsanos KH, et al. The Developing Story of Predictive Biomarkers in Colorectal Cancer. *J Pers Med.* 2019 Feb 7;9(1).
- Boussouar A**, Tortereau A, Manceau A, Paradisi A, Gadot N, Vial J, et al. Netrin-1 and Its Receptor DCC Are Causally Implicated in Melanoma Progression. *Cancer Res.* 2020 Feb 15;80(4):747–56.
- Bowman GD**, Poirier MG. Post-Translational Modifications of Histones That Influence Nucleosome Dynamics. *Chem Rev.* 2015 Mar 25;115(6):2274–95.
- Boyer NP**, Gupton SL. Revisiting Netrin-1: One Who Guides (Axons). *Front Cell Neurosci.* 2018 Jul 31;12.
- Bracken AP**, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, Pasini D, Gargiulo G, Beekman C, et al. The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev.* 2007 Mar 1;21(5):525–30.
- Bracken AP**, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* 2003 Oct 15;22(20):5323–35.
- Bremer SCB**, Conradi L-C, Mechie N-C, Amanzada A, Mavropoulou E, Kitz J, et al. Enhancer of Zeste Homolog 2 in Colorectal Cancer Development and Progression. *Digestion.* 2019 Nov 6;1–9.
- Brien GL**, Gambero G, O’Connell DJ, Jerman E, Turner SA, Egan CM, et al. Polycomb PHF19 binds H3K36me3 and recruits PRC2 and demethylase NO66 to embryonic stem cell genes during differentiation. *Nat Struct Mol Biol.* 2012 Dec;19(12):1273–81.
- Britto-Borges T**, Barton GJ. A study of the structural properties of sites modified by the O-linked 6-N-acetylglucosamine transferase. *PLoS ONE.* 2017 Sep 8;12(9).

- Bullen JW**, Balsbaugh JL, Chanda D, Shabanowitz J, Hunt DF, Neumann D, et al. Cross-talk between Two Essential Nutrient-sensitive Enzymes. *J Biol Chem.* 2014 Apr 11;289(15):10592–606.
- Bushweller JH**. Targeting transcription factors in cancer – from undruggable to reality. *Nat Rev Cancer.* 2019 Nov;19(11):611–24.
- Butkinaree C**, Cheung WD, Park S, Park K, Barber M, Hart GW. Characterization of  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase Cleavage by Caspase-3 during Apoptosis. *J Biol Chem.* 2008 Aug 29;283(35):23557–66.
- Butler AA**, Sanchez RG, Jarome TJ, Webb WM, Lubin FD. O-GlcNAc and EZH2-mediated epigenetic regulation of gene expression during consolidation of fear memories. *Learn Mem Cold Spring Harb N.* 2019 Sep;26(9):373–9.



- Cai F**, Xiao X, Niu X, Zhong Y. Association between promoter methylation of DAPK gene and HNSCC: A meta-analysis. *PLoS ONE.* 2017 Mar 1;12(3).
- Cai L**, Rothbart SB, Lu R, Xu B, Chen W-Y, Tripathy A, et al. An H3K36 methylation engaging Tudor motif of polycomb-like proteins mediates PRC2 complex targeting. *Mol Cell.* 2013 Feb 7;49(3):571–82.
- Cao R**, Zhang Y. SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex. *Mol Cell.* 2004 Jul;15(1):57–67.
- Capotosti F**, Guernier S, Lammers F, Waridel P, Cai Y, Jin J, et al. O-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell.* 2011 Feb 4;144(3):376–88.
- Carvalho S**, Freitas M, Antunes L, Monteiro-Reis S, Vieira-Coimbra M, Tavares A, et al. Prognostic value of histone marks H3K27me3 and H3K9me3 and modifying enzymes EZH2, SETDB1 and LSD-1 in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2018 Nov 1;144(11):2127–37.
- Cassier P**, Eberst L, Garin G, Courbebaisse Y, Terret C, Robert M, et al. A first in human, phase I trial of NP137, a first-in-class antibody targeting netrin-1, in patients with advanced refractory solid tumors. *Ann Oncol.* 2019 Oct 1;30:v159.
- Castets M**, Broutier L, Molin Y, Brevet M, Chazot G, Gadot N, et al. DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature.* 2012 Feb;482(7386):534–7.
- Cetinbaş N**, Macauley MS, Stubbs KA, Drapala R, Vocadlo DJ. Identification of Asp174 and Asp175 as the key catalytic residues of human O-GlcNAcase by functional analysis of site-directed mutants. *Biochemistry.* 2006 Mar 21;45(11):3835–44.
- Chai Y**, Du Y, Zhang S, Xiao J, Luo Z, He F, et al. MicroRNA-485-5p reduces O-GlcNAcylation of Bmi-1 and inhibits colorectal cancer proliferation. *Exp Cell Res.* 2018 Jul 1;368(1):111–8.

- Chaiyawat P**, Netsirisawan P, Svasti J, Champattanachai V. Aberrant O-GlcNAcylated Proteins: New Perspectives in Breast and Colorectal Cancer. *Front Endocrinol.* 2014;5:193.
- Chalkley RJ**, Thalhammer A, Schoepfer R, Burlingame AL. Identification of protein O-GlcNAcylation sites using electron transfer dissociation mass spectrometry on native peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 2;106(22):8894–9.
- Chammas P**, Mocavini I, Di Croce L. Engaging chromatin: PRC2 structure meets function. *Br J Cancer.* 2019 Nov 11;
- Chen H-Y**, Lin Y-M, Chung H-C, Lang Y-D, Lin C-J, Huang J, et al. miR-103/107 Promote Metastasis of Colorectal Cancer by Targeting the Metastasis Suppressors DAPK and KLF4. *Cancer Res.* 2012 Jul 15;72(14):3631–41.
- Chen J-F**, Luo X, Xiang L-S, Li H-T, Zha L, Li N, et al. EZH2 promotes colorectal cancer stem-like cell expansion by activating p21cip1-Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Oncotarget.* 2016 Jul 5;7(27):41540–58.
- Chen J-Y**, He X-X, Ma C, Wu X-M, Wan X-L, Xing Z-K, et al. Netrin-1 promotes glioma growth by activating NF- $\kappa$ B via UNC5A. *Sci Rep.* 2017a 14;7(1):5454.
- Chen L-G**, Xia Y-J, Cui Y. Upregulation of miR-101 enhances the cytotoxic effect of anticancer drugs through inhibition of colon cancer cell proliferation. *Oncol Rep.* 2017b Jul;38(1):100–8.
- Chen P-H**, Chi J-T, Boyce M. Functional crosstalk among oxidative stress and O-GlcNAc signaling pathways. *Glycobiology.* 2018a Apr 3;28(8):556–64.
- Chen Q**, Chen Y, Bian C, Fujiki R, Yu X. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature.* 2013 Jan 24;493(7433):561–4.
- Chen Z**, Yang P, Li W, He F, Wei J, Zhang T, et al. Expression of EZH2 is associated with poor outcome in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2018b Mar;15(3):2953–61.
- Cheng X**, Xu X, Chen D, Zhao F, Wang W. Therapeutic potential of targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother.* 2019 Feb 1;110:473–81.
- Cheung WD**, Hart GW. AMP-activated Protein Kinase and p38 MAPK Activate O-GlcNAcylation of Neuronal Proteins during Glucose Deprivation. *J Biol Chem.* 2008 May 9;283(19):13009–20.
- Cheung WD**, Sakabe K, Housley MP, Dias WB, Hart GW. O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosaminyltransferase Substrate Specificity Is Regulated by Myosin Phosphatase Targeting and Other Interacting Proteins. *J Biol Chem.* 2008 Dec 5;283(49):33935–41.
- Chou TY**, Dang CV, Hart GW. Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995a May 9;92(10):4417–21.

- Chou T-Y**, Hart GW, Dang CV. c-Myc Is Glycosylated at Threonine 58, a Known Phosphorylation Site and a Mutational Hot Spot in Lymphomas. *J Biol Chem*. 1995b Nov 8;270(32):18961-5.
- Chu C-S**, Lo P-W, Yeh Y-H, Hsu P-H, Peng S-H, Teng Y-C, et al. O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jan 28;111(4):1355-60.
- Chuh KN**, Zaro BW, Piller F, Piller V, Pratt MR. Changes in Metabolic Chemical Reporter Structure Yield a Selective Probe of O-GlcNAc Modification. *J Am Chem Soc*. 2014 Sep 3;136(35):12283-95.
- Cioci G**, Mitchell EP, Chazalet V, Debray H, Oscarson S, Lahmann M, et al. Beta-propeller crystal structure of Psathyrella velutina lectin: an integrin-like fungal protein interacting with monosaccharides and calcium. *J Mol Biol*. 2006 Apr 14;357(5):1575-91.
- Clarke AJ**, Hurtado-Guerrero R, Pathak S, Schüttelkopf AW, Borodkin V, Shepherd SM, et al. Structural insights into mechanism and specificity of O-GlcNAc transferase. *EMBO J*. 2008 Oct 22;27(20):2780-8.
- Clevers H**, Nusse R. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling and Disease. *Cell*. 2012 Jun 8;149(6):1192-205.
- Cohen I**, Silberstein E, Perez Y, Landau D, Elbedour K, Langer Y, et al. Autosomal recessive Adams-Oliver syndrome caused by homozygous mutation in EOGT, encoding an EGF domain-specific O-GlcNAc transferase. *Eur J Hum Genet*. 2014 Mar;22(3):374-8.
- Collinson A**, Collier AJ, Morgan NP, Sienerth AR, Chandra T, Andrews S, et al. Deletion of the Polycomb-Group Protein EZH2 Leads to Compromised Self-Renewal and Differentiation Defects in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Rep*. 2016 Dec 6;17(10):2700-14.
- Comer FI**, Vosseller K, Wells L, Accavitti MA, Hart GW. Characterization of a Mouse Monoclonal Antibody Specific for O-Linked N-Acetylglucosamine. *Anal Biochem*. 2001 Jun;293(2):169-77.
- Comtesse N**, Maldener E, Meese E. Identification of a Nuclear Variant of MGEA5, a Cytoplasmic Hyaluronidase and a  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 May;283(3):634-40.
- Cooper S**, Dienstbier M, Hassan R, Schermelleh L, Sharif J, Blackledge NP, et al. Targeting Polycomb to Pericentric Heterochromatin in Embryonic Stem Cells Reveals a Role for H2AK119u1 in PRC2 Recruitment. *Cell Rep*. 2014 May 22;7(5):1456-70.
- Cooper S**, Grijzenhout A, Underwood E, Ancelin K, Zhang T, Nesterova TB, et al. Jarid2 binds mono-ubiquitylated H2A lysine 119 to mediate crosstalk between Polycomb complexes PRC1 and PRC2. *Nat Commun*. 2016 Nov 28;7.
- Coutinho PM**, Deleury E, Davies GJ, Henrissat B. An Evolving Hierarchical Family Classification for Glycosyltransferases. *J Mol Biol*. 2003 Apr 25;328(2):307-17.

~ **D** ~

---

- Dai W**, Dierschke SK, Toro AL, Dennis MD. Consumption of a high fat diet promotes protein O-GlcNAcylation in mouse retina via NR4A1-dependent GFAT2 expression. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864(12):3568–76.
- Das AK**, Cohen PW, Barford D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J.* 1998 Mar 2;17(5):1192–9.
- Davies H**, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002 Jun 27;417(6892):949–54.
- Decourcelle A**, Leprince D, Dehennaut V. Regulation of Polycomb Repression by O-GlcNAcylation: Linking Nutrition to Epigenetic Reprogramming in Embryonic Development and Cancer. *Front Endocrinol.* 2019;10:117.
- Decourcelle A**, Loison I, Baldini S, Leprince D, Dehennaut V. Evidence of a compensatory regulation of colonic O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase expression in response to disruption of O-GlcNAc homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020 Jan 1;521(1):125–30.
- Dehennaut V**, Hanouille X, Bodart J-F, Vilain J-P, Michalski J-C, Landrieu I, et al. Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates *Xenopus* oocytes M-phase entry. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 May 2;369(2):539–46.
- Dehennaut V**, Lefebvre T, Sellier C, Leroy Y, Gross B, Walker S, et al. O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase Inhibition Prevents G2/M Transition in *Xenopus laevis* Oocytes. *J Biol Chem.* 2007 Apr 27;282(17):12527–36.
- Dehennaut V**, Leprince D, Lefebvre T. O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, and Polycomb Group Proteins. *Front Endocrinol.* 2014 Sep 26;5.
- Derks S**, Bosch LJW, Niessen HEC, Moerkerk PTM, van den Bosch SM, Carvalho B, et al. Promoter CpG island hypermethylation- and H3K9me3 and H3K27me3-mediated epigenetic silencing targets the deleted in colon cancer (DCC) gene in colorectal carcinogenesis without affecting neighboring genes on chromosomal region 18q21. *Carcinogenesis.* 2009 Jun 1;30(6):1041–8.
- Dey A**, Seshasayee D, Noubade R, French DM, Liu J, Chaurushiya MS, et al. Loss of the tumor suppressor BAP1 causes myeloid transformation. *Science.* 2012 Sep 21;337(6101):1541–6.
- Di W**, Weinan X, Xin L, Zhiwei Y, Xinyue G, Jinxue T, et al. Long noncoding RNA SNHG14 facilitates colorectal cancer metastasis through targeting EZH2-regulated EPHA7. *Cell Death Dis.* 2019 Jul 4;10(7).
- Dias WB**, Cheung WD, Wang Z, Hart GW. Regulation of Calcium/Calmodulin-dependent Kinase IV by O-GlcNAc Modification. *J Biol Chem.* 2009 Aug 7;284(32):21327–37.

- Ding S**, Li G, Dang J, Zhao X. The association of UNC5A expression with the clinicopathologic features and prognosis of radiotherapy in patients with non-small-cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018;11(8):3835–45.
- Ding X**, Jiang W, Zhou P, Liu L, Wan X, Yuan X, et al. Mixed Lineage Leukemia 5 (MLL5) Protein Stability Is Cooperatively Regulated by O-GlcNac Transferase (OGT) and Ubiquitin Specific Protease 7 (USP7). *PLoS ONE*. 2015 Dec 17;10(12).
- Dominici C**, Moreno-Bravo JA, Puiggros SR, Rappeneau Q, Rama N, Vieugue P, et al. Floor plate-derived netrin-1 is dispensable for commissural axon guidance. *Nature*. 2017 May 18;545(7654):350–4.
- Dong D**, Zhang L, Bai C, Ma N, Ji W, Jia L, et al. UNC5D, suppressed by promoter hypermethylation, inhibits cell metastasis by activating death-associated protein kinase 1 in prostate cancer. *Cancer Sci*. 2019 Apr;110(4):1244–55.
- Dong DL**, Hart GW. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem*. 1994 Jul 29;269(30):19321–30.
- Donovan K**, Alekseev O, Qi X, Cho W, Azizkhan-Clifford J. O-GlcNAc Modification of Transcription Factor Sp1 Mediates Hyperglycemia-Induced VEGF-A Upregulation in Retinal Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014 Dec;55(12):7862–73.
- Dorfmueller HC**, Borodkin VS, Schimpl M, Shepherd SM, Shpiro NA, van Aalten DMF. GlcNAcstatin: a picomolar, selective O-GlcNAcase inhibitor that modulates intracellular O-glcNAcylation levels. *J Am Chem Soc*. 2006 Dec 27;128(51):16484–5.
- Drougat L**, Olivier-Van Stichelen S, Mortuaire M, Foulquier F, Lacoste A-S, Michalski J-C, et al. Characterization of O-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Dec;1820(12):1839–48.
- Du J**, Kirk B, Zeng J, Ma J, Wang Q. Three classes of response elements for human PRC2 and MLL1/2-Trithorax complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018 Sep 28;46(17):8848–64.

~ E ~

- 
- Ealey KN**, Lu S, Archer MC. Development of aberrant crypt foci in the colons of ob/ob and db/db mice: evidence that leptin is not a promoter. *Mol Carcinog*. 2008 Sep;47(9):667–77.
- Egloff S**, Murphy S. Role of the C-terminal domain of RNA polymerase II in expression of small nuclear RNA genes. *Biochem Soc Trans*. 2008 Jun 1;36(3):537–9.
- Engelkamp D**. Cloning of three mouse Unc5 genes and their expression patterns at mid-gestation. *Mech Dev*. 2002 Oct;118(1–2):191–7.

**Etchegaray J-P**, Yang X, DeBruyne JP, Peters AHFM, Weaver DR, Jenuwein T, et al. The Polycomb Group Protein EZH2 Is Required for Mammalian Circadian Clock Function. *J Biol Chem*. 2006 Jul 28;281(30):21209–15.

~ **F** ~

---

**Fang DC**, Jass JR, Wang DX. Loss of heterozygosity and loss of expression of the DCC gene in gastric cancer. *J Clin Pathol*. 1998 Aug;51(8):593–6.

**Farooqi AA**, de la Roche M, Djamgoz MBA, Siddik ZH. Overview of the oncogenic signaling pathways in colorectal cancer: Mechanistic insights. *Semin Cancer Biol*. 2019 Oct 1;58:65–79.

**Fearon ER**, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990 Jun 1;61(5):759–67.

**Ferrari KJ**, Scelfo A, Jammula S, Cuomo A, Barozzi I, Stützer A, et al. Polycomb-Dependent H3K27me1 and H3K27me2 Regulate Active Transcription and Enhancer Fidelity. *Mol Cell*. 2014 Jan 9;53(1):49–62.

**Ferraro A**, Boni T, Pintzas A. EZH2 Regulates Cofilin Activity and Colon Cancer Cell Migration by Targeting ITGA2 Gene. *PLoS ONE*. 2014 Dec 30;9(12).

**Ferraro A**, Mourtzoukou D, Kosmidou V, Avlonitis S, Kontogeorgos G, Zografos G, et al. EZH2 is regulated by ERK/AKT and targets integrin alpha2 gene to control Epithelial-Mesenchymal Transition and anoikis in colon cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Feb;45(2):243–54.

**Ferrer CM**, Sodi VL, Reginato MJ. O-GlcNAcylation in Cancer Biology: Linking Metabolism and Signaling. *J Mol Biol*. 2016 Aug 14;428(16):3282–94.

**Fitamant J**, Guenebeaud C, Coissieux M-M, Guix C, Treilleux I, Scoazec J-Y, et al. Netrin-1 expression confers a selective advantage for tumor cell survival in metastatic breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 25;105(12):4850–5.

**Fong JJ**, Nguyen BL, Bridger R, Medrano EE, Wells L, Pan S, et al.  $\beta$ -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a novel regulator of mitosis-specific phosphorylations on histone H3. *J Biol Chem*. 2012 Apr 6;287(15):12195–203.

**Forma E**, Józwiak P, Bryś M, Krześlak A. The potential role of O-GlcNAc modification in cancer epigenetics. *Cell Mol Biol Lett*. 2014 Aug 20;19(3):438–60.

**Forma E**, Józwiak P, Ciesielski P, Zaczek A, Starska K, Bryś M, et al. Impact of OGT deregulation on EZH2 target genes FOXA1 and FOXC1 expression in breast cancer cells. *PloS One*. 2018;13(6):e0198351.

**Fujiki R**, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, et al. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature*. 2011 Dec 22;480(7378):557–60.

**Fussbroich B**, Wagener N, Macher-Goeppinger S, Benner A, Fälth M, Sültmann H, et al. EZH2 depletion blocks the proliferation of colon cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(7):e21651.

---

~ **G** ~

---

**Gambetta MC**, Müller J. O-GlcNAcylation prevents aggregation of the Polycomb group repressor polyhomeotic. *Dev Cell*. 2014 Dec 8;31(5):629–39.

**Gambetta MC**, Oktaba K, Müller J. Essential role of the glycosyltransferase *sxc/Ogt* in polycomb repression. *Science*. 2009 Jul 3;325(5936):93–6.

**Gammons M**, Bienz M. Multiprotein complexes governing Wnt signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 2018 Apr 1;51:42–9.

**Gao J**, Yang Y, Qiu R, Zhang K, Teng X, Liu R, et al. Proteomic analysis of the OGT interactome: novel links to epithelial-mesenchymal transition and metastasis of cervical cancer. *Carcinogenesis*. 2018 Jul 23;

**Gao Y**, Parker GJ, Hart GW. Streptozotocin-Induced  $\beta$ -Cell Death Is Independent of Its Inhibition of O-GlcNAcase in Pancreatic Min6 Cells. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Nov;383(2):296–302.

**Gao Y**, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem*. 2001 Mar 30;276(13):9838–45.

**Geisbrecht BV**, Dowd KA, Barfield RW, Longo PA, Leahy DJ. Netrin Binds Discrete Subdomains of DCC and UNC5 and Mediates Interactions between DCC and Heparin. *J Biol Chem*. 2003 Aug 29;278(35):32561–8.

**Gloster TM**, Zandberg WF, Heinonen JE, Shen DL, Deng L, Vocadlo DJ. Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nat Chem Biol*. 2011 Mar;7(3):174–81.

**Gnagnarella P**, Gandini S, La Vecchia C, Maisonneuve P. Glycemic index, glycemic load, and cancer risk: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2008 Jun 1;87(6):1793–801.

**Goel A**, Arnold CN, Niedzwiecki D, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, et al. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res*. 2004 May 1;64(9):3014–21.

**Goel A**, Boland CR. Epigenetics of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2012 Dec;143(6):1442–1460.e1.

**Grandin M**, Meier M, Delcros JG, Nikodemus D, Reuten R, Patel TR, et al. Structural Decoding of the Netrin-1/UNC5 Interaction and its Therapeutic Implications in Cancers. *Cancer Cell*. 2016 Feb 8;29(2):173–85.

- Gröschel C**, Prinz-Wohlgenannt M, Mesteri I, Karuthedom George S, Trawnicek L, Heiden D, et al. Switching to a Healthy Diet Prevents the Detrimental Effects of Western Diet in a Colitis-Associated Colorectal Cancer Model. *Nutrients*. 2019 Dec 23;12(1).
- Groves JA**, Lee A, Yildirim G, Zachara NE. Dynamic O-GlcNAcylation and its roles in the cellular stress response and homeostasis. *Cell Stress Chaperones*. 2013 Sep;18(5):535–58.
- Guenebeaud C**, Goldschneider D, Castets M, Guix C, Chazot G, Delloye-Bourgeois C, et al. The Dependence Receptor UNC5H2/B Triggers Apoptosis via PP2A-Mediated Dephosphorylation of DAP Kinase. *Mol Cell*. 2010 Dec 22;40(6):863–76.
- Guinez C**, Filhoulaud G, Rayah-Benhamed F, Marmier S, Dubuquoy C, Dentin R, et al. O-GlcNAcylation Increases ChREBP Protein Content and Transcriptional Activity in the Liver. *Diabetes*. 2011 May;60(5):1399–413.
- Guinez C**, Losfeld M-E, Cacan R, Michalski J-C, Lefebvre T. Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology*. 2006 Jan;16(1):22–8.
- Guinney J**, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015 Nov 1;21(11):1350–6.
- Gundogdu M**, Llabrés S, Gorelik A, Ferenbach AT, Zachariae U, van Aalten DMF. The O-GlcNAc Transferase Intellectual Disability Mutation L254F Distorts the TPR Helix. *Cell Chem Biol*. 2018 May 17;25(5):513–518.e4.
- Guo H**, Zhang B, Nairn AV, Nagy T, Moremen KW, Buckhaults P, et al. O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Expression Levels Epigenetically Regulate Colon Cancer Tumorigenesis by Affecting the Cancer Stem Cell Compartment via Modulating Expression of Transcriptional Factor MYBL1. *J Biol Chem*. 2017 10;292(10):4123–37.
- Guroo SA**, Malik AA, Afroze D, Ali S, Pandith AA, Yusuf A. Significant Pattern of Promoter Hypermethylation of UNC5C Gene in Colorectal Cancer and Its Implication in Late Stage Disease. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 2018 May 26;19(5):1185–8.

~ H ~

- 
- Hahne H**, Gholami AM, Kuster B. Discovery of O-GlcNAc-modified Proteins in Published Large-scale Proteome Data. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2012 Oct;11(10):843–50.
- Haltiwanger RS**, Blomberg MA, Hart GW. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem*. 1992 May 5;267(13):9005–13.
- Haltiwanger RS**, Grove K, Philipsberg GA. Modulation of O-Linked N-Acetylglucosamine Levels on Nuclear and Cytoplasmic Proteins in Vivo Using the Peptide O-GlcNAc-β-

- N-acetylglucosaminidase Inhibitor O-(2-Acetamido-2-deoxy-dglucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J Biol Chem.* 1998 Jun 2;273(6):3611-7.
- Haltiwanger RS**, Holt GD, Hart GW. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem.* 1990 Feb 15;265(5):2563-8.
- Han D-L**, Wang L-L, Zhang G-F, Yang W-F, Chai J, Lin H-M, et al. MiRNA-485-5p, inhibits esophageal cancer cells proliferation and invasion by down-regulating O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019 Apr;23(7):2809-16.
- Hanover JA**, Cohen CK, Willingham MC, Park MK. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *J Biol Chem.* 1987 Jul 15;262(20):9887-94.
- Hanover JA**, Krause MW, Love DC. The Hexosamine Signaling Pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Feb;1800(2):80.
- Hanover JA**, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J, et al. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch Biochem Biophys.* 2003 Jan 15;409(2):287-97.
- Harosh-Davidovich SB**, Khalaila I. O-GlcNAcylation affects  $\beta$ -catenin and E-cadherin expression, cell motility and tumorigenicity of colorectal cancer. *Exp Cell Res.* 2018 Mar 1;364(1):42-9.
- Hart GW**. Nutrient regulation of signaling and transcription. *J Biol Chem.* 2019 Feb 15;294(7):2211-31.
- Hart GW**, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature.* 2007 Apr;446(7139):1017-22.
- He S-B**, Zhou H, Zhou J, Zhou G-Q, Han T, Wan D-W, et al. Inhibition of EZH2 expression is associated with the proliferation, apoptosis, and migration of SW620 colorectal cancer cells in vitro. *Exp Biol Med.* 2015 Apr;240(4):458-66.
- Heckel D**, Comtesse N, Brass N, Blin N, Zang KD, Meese E. Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum Mol Genet.* 1998 Nov;7(12):1859-72.
- Heidemann M**, Hintermair C, Voß K, Eick D. Dynamic phosphorylation patterns of RNA polymerase II CTD during transcription. *Biochim Biophys Acta BBA - Gene Regul Mech.* 2013 Jan 1;1829(1):55-62.
- Herzog K**, Bandiera S, Pernot S, Fauvelle C, Jühling F, Weiss A, et al. Functional microRNA screen uncovers O-linked N-acetylglucosamine transferase as a host factor modulating hepatitis C virus morphogenesis and infectivity. *Gut.* 2020 Feb 1;69(2):380-92.

- Hibi K**, Mizukami H, Shirahata A, Goto T, Sakata M, Saito M, et al. Aberrant methylation of the UNC5C gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res.* 2009a Jan;29(1):271-3.
- Hibi K**, Mizukami H, Shirahata A, Goto T, Sakata M, Sanada Y. Aberrant Methylation of the Netrin-1 Receptor Genes UNC5C and DCC Detected in Advanced Colorectal Cancer. *World J Surg.* 2009b May;33(5):1053-7.
- Hibi K**, Sakata M, Sakuraba K, Kitamura Y-H, Shirahata A, Goto T, et al. Changes in UNC5C Gene Methylation during Human Gastric Carcinogenesis. *Anticancer Res.* 2009c Jan 11;29(11):4397-9.
- Hibi K**, Sakuraba K, Shirahata A, Goto T, Saito M, Ishibashi K, et al. Methylation of the UNC5C gene is frequently detected in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology.* 2012 Dec;59(120):2573-5.
- Hiromura M**, Choi CH, Sabourin NA, Jones H, Bachvarov D, Usheva A. YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosaminylation (O-glcNAcylation). *J Biol Chem.* 2003 Apr 18;278(16):14046-52.
- Hirosawa M**, Hayakawa K, Yoneda C, Arai D, Shiota H, Suzuki T, et al. Novel O-GlcNAcylation on Ser40 of canonical H2A isoforms specific to viviparity. *Sci Rep.* 2016 Sep 12;6:31785.
- Hirose Y**. Enhancement of development of azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/KsJ-db/db mice. *Carcinogenesis.* 2003 Dec 19;25(5):821-5.
- Ho**, Kalle, Lo, Lam, Tang. Reduced expression of APC and DCC gene protein in breast cancer. *Histopathology.* 1999 Sep;35(3):249-56.
- Højfeldt JW**, Laugesen A, Willumsen BM, Damhofer H, Hedehus L, Tvardovskiy A, et al. Accurate H3K27 methylation can be established de novo by SUZ12-directed PRC2. *Nat Struct Mol Biol.* 2018 Mar;25(3):225-32.
- Holoch D**, Margueron R. Mechanisms Regulating PRC2 Recruitment and Enzymatic Activity. *Trends Biochem Sci.* 2017 Jul 1;42(7):531-42.
- Holt GD**, Snow CM, Senior A, Haltiwanger RS, Gerace L, Hart GW. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J Cell Biol.* 1987 May;104(5):1157-64.
- Hong S**, Cho Y-W, Yu L-R, Yu H, Veenstra TD, Ge K. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 20;104(47):18439-44.
- Huang K-B**, Zhang S-P, Zhu Y-J, Guo C-H, Yang M, Liu J, et al. Hotair mediates tumorigenesis through recruiting EZH2 in colorectal cancer. *J Cell Biochem.* 2019;120(4):6071-7.
- Huang W**, Su G, Huang X, Zou A, Wu J, Yang Y, et al. Long noncoding RNA PCAT6 inhibits colon cancer cell apoptosis by regulating anti-apoptotic protein ARC expression via EZH2. *Cell Cycle.* 2018 Dec 30;18(1):69-83.

~ | ~

---

- Ingham PW.** A gene that regulates the bithorax complex differentially in larval and adult cells of *Drosophila*. *Cell*. 1984 Jul;37(3):815–23.
- Inoue D,** Fujino T, Sheridan P, Zhang Y, Nagase R, Horikawa S, et al. A novel ASXL1-OGT axis plays roles in H3K4 methylation and tumor suppression in myeloid malignancies. *Leukemia*. 2018 Jun;32(6):1327–37.
- Isono T.** O-GlcNAc-specific antibody CTD110.6 cross-reacts with N-GlcNAc2-modified proteins induced under glucose deprivation. *PLoS One*. 2011 Apr 19;6(4):e18959.
- Itkonen HM,** Minner S, Guldvik IJ, Sandmann MJ, Tsourlakis MC, Berge V, et al. O-GlcNAc Transferase Integrates Metabolic Pathways to Regulate the Stability of c-MYC in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Res*. 2013 Aug 15;73(16):5277–87.
- Ito R,** Katsura S, Shimada H, Tsuchiya H, Hada M, Okumura T, et al. TET3-OGT interaction increases the stability and the presence of OGT in chromatin. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. 2014 Jan;19(1):52–65.
- Iyer SPN,** Hart GW. Roles of the Tetratricopeptide Repeat Domain in O-GlcNAc Transferase Targeting and Protein Substrate Specificity. *J Biol Chem*. 2003 Apr 7;278(27):24608–16.

~ J ~

---

- Janetzko J,** Walker S. The Making of a Sweet Modification: Structure and Function of O-GlcNAc Transferase. *J Biol Chem*. 2014 Dec 12;289(50):34424–32.
- Jass JR.** Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007 Jan;50(1):113–30.
- Jeronimo C,** Collin P, Robert F. The RNA Polymerase II CTD: The Increasing Complexity of a Low-Complexity Protein Domain. *J Mol Biol*. 2016 Jun 19;428(12):2607–22.
- Jia W,** Yu T, Cao X, An Q, Yang H. Clinical effect of DAPK promoter methylation in gastric cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Oct 28;95(43).
- Jiang M,** Wu N, Xu B, Chu Y, Li X, Su S, et al. Fatty acid-induced CD36 expression via O-GlcNAcylation drives gastric cancer metastasis. *Theranostics*. 2019 Jul 9;9(18):5359–73.
- Jiang M,** Xu B, Li X, Shang Y, Chu Y, Wang W, et al. O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer metastasis via the miR-101-O-GlcNAc/EZH2 regulatory feedback circuit. *Oncogene*. 2018 Aug 9;
- Jin X,** Yang C, Fan P, Xiao J, Zhang W, Zhan S, et al. CDK5/FBW7-dependent ubiquitination and degradation of EZH2 inhibits pancreatic cancer cell migration and invasion. *J Biol Chem*. 2017 Apr 14;292(15):6269–80.

- Jínek M**, Rehwinkel J, Lazarus BD, Izaurralde E, Hanover JA, Conti E. The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin  $\alpha$ . *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Oct;11(10):1001-7.
- Jochmann R**, Pfannstiel J, Chudasama P, Kuhn E, Konrad A, Stürzl M. O-GlcNAc transferase inhibits KSHV propagation and modifies replication relevant viral proteins as detected by systematic O-GlcNAcylation analysis. *Glycobiology.* 2013 Oct;23(10):1114-30.
- Joiner CM**, Levine ZG, Aonbangkhen C, Woo CM, Walker S. Aspartate Residues Far from the Active Site Drive O-GlcNAc Transferase Substrate Selection. *J Am Chem Soc.* 2019a Aug 21;141(33):12974-8.
- Joiner CM**, Li H, Jiang J, Walker S. Structural characterization of the O-GlcNAc cycling enzymes: insights into substrate recognition and catalytic mechanisms. *Curr Opin Struct Biol.* 2019b Jun 1;56:97-106.
- de Jong RGPJ**, Peeters PJHL, Burden AM, de Bruin ML, Haak HR, Masclee AAM, et al. Gastrointestinal cancer incidence in type 2 diabetes mellitus; results from a large population-based cohort study in the UK. *Cancer Epidemiol.* 2018 Jun;54:104-11.
- Jung H-Y**, Jun S, Lee M, Kim H-C, Wang X, Ji H, et al. PAF and EZH2 Induce Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Hyperactivation. *Mol Cell.* 2013 Oct 24;52(2):193-205.

---

### ~ K ~

---

- Kaasik K**, Kivimäe S, Allen JJ, Chalkley RJ, Huang Y, Baer K, et al. Glucose sensor O-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metab.* 2013 Feb 5;17(2):291-302.
- Kalb R**, Latwiel S, Baymaz HI, Jansen PWTC, Müller CW, Vermeulen M, et al. Histone H2A monoubiquitination promotes histone H3 methylation in Polycomb repression. *Nat Struct Mol Biol.* 2014 Jun;21(6):569-71.
- Kamemura K**, Hayes BK, Comer FI, Hart GW. Dynamic Interplay between O -Glycosylation and O -Phosphorylation of Nucleocytoplasmic Proteins: ALTERNATIVE GLYCOSYLATION/PHOSPHORYLATION OF THR-58, A KNOWN MUTATIONAL HOT SPOT OF c-Myc IN LYMPHOMAS, IS REGULATED BY MITOGENS. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):19229-35.
- Kaneko S**, Li G, Son J, Xu C-F, Margueron R, Neubert TA, et al. Phosphorylation of the PRC2 component Ezh2 is cell cycle-regulated and up-regulates its binding to ncRNA. *Genes Dev.* 2010 Dec 1;24(23):2615-20.
- Kang JG**, Park SY, Ji S, Jang I, Park S, Kim HS, et al. O-GlcNAc Protein Modification in Cancer Cells Increases in Response to Glucose Deprivation through Glycogen Degradation. *J Biol Chem.* 2009 Dec 11;284(50):34777-84.
- Kassis JA**, Brown JL. Polycomb Group Response Elements in Drosophila and Vertebrates. *Adv Genet.* 2013;81:83-118.

- Kassis JA**, Kennison JA, Tamkun JW. Polycomb and Trithorax Group Genes in *Drosophila*. *Genetics*. 2017 Aug;206(4):1699–725.
- Kawauchi K**, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. Loss of p53 enhances catalytic activity of IKK $\beta$  through O-linked  $\beta$ -N-acetyl glucosamine modification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 3;106(9):3431–6.
- Keembiyehetty CN**, Krzeslak A, Love DC, Hanover JA. A lipid-droplet-targeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *J Cell Sci*. 2011 Aug 15;124(Pt 16):2851–60.
- Khalil AM**, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, et al. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 14;106(28):11667–72.
- Khidekel N**, Ficarro SB, Clark PM, Bryan MC, Swaney DL, Rexach JE, et al. Probing the dynamics of O -GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat Chem Biol*. 2007 Jun;3(6):339–48.
- Kim H**, Kim B-H, Lee D, Shin E. Genomic alterations in signet ring and mucinous patterned colorectal carcinoma. *Pathol - Res Pract*. 2019 Oct 1;215(10):152566.
- Ko SY**, Dass CR, Nurgali K. Netrin-1 in the developing enteric nervous system and colorectal cancer. *Trends Mol Med*. 2012 Sep;18(9):544–54.
- Kogo R**, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, et al. Long Noncoding RNA HOTAIR Regulates Polycomb-Dependent Chromatin Modification and Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancers. *Cancer Res*. 2011 Oct 15;71(20):6320–6.
- Koh CM**, Iwata T, Zheng Q, Bethel C, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. Myc enforces overexpression of EZH2 in early prostatic neoplasia via transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Oncotarget*. 2011 Sep;2(9):669–83.
- Kong C**, Zhan B, Piao C, Zhang Z, Zhu Y, Li Q. Overexpression of UNC5B in bladder cancer cells inhibits proliferation and reduces the volume of transplantation tumors in nude mice. *BMC Cancer*. 2016a Nov 15;16.
- Konrad RJ**, Zhang F, Hale JE, Knierman MD, Becker GW, Kudlow JE. Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Apr 26;293(1):207–12.
- Kreppel LK**, Blomberg MA, Hart GW. Dynamic Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins CLONING AND CHARACTERIZATION OF A UNIQUE O-GlcNAc TRANSFERASE WITH MULTIPLE TETRATRICOPEPTIDE REPEATS. *J Biol Chem*. 1997 Apr 4;272(14):9308–15.
- Kreppel LK**, Hart GW. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):32015–22.

- Kronlage Mariya**, Dewenter Matthias, Grosso Johannes, Fleming Thomas, Oehl Ulrike, Lehmann Lorenz H., et al. O-GlcNAcylation of Histone Deacetylase 4 Protects the Diabetic Heart From Failure. *Circulation*. 2019 Aug 13;140(7):580–94.
- Kruger RP**, Lee J, Li W, Guan K-L. Mapping Netrin Receptor Binding Reveals Domains of Unc5 Regulating Its Tyrosine Phosphorylation. *J Neurosci*. 2004 Dec 1;24(48):10826–34.
- Ku M**, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, et al. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet*. 2008 Oct;4(10):e1000242.
- Kubota Y**, Fujioka K, Takekawa M. WGA-based lectin affinity gel electrophoresis: A novel method for the detection of O-GlcNAc-modified proteins. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180714.
- Kupferschmid M**, Aquino-Gil MO, Shams-Eldin H, Schmidt J, Yamakawa N, Krzewinski F, et al. Identification of O-GlcNAcylated proteins in *Plasmodium falciparum*. *Malar J*. 2017 29;16(1):485.
- ~   **L**   ~
- 
- van der Laarse SAM**, Leney AC, Heck AJR. Crosstalk between phosphorylation and O-GlcNAcylation: friend or foe. *FEBS J*. 2018;285(17):3152–67.
- Lai C-Y**, Liu H, Tin KX, Huang Y, Yeh K-H, Peng HW, et al. Identification of UAP1L1 as a critical factor for protein O -GlcNAcylation and cell proliferation in human hepatoma cells. *Oncogene*. 2019 Jan;38(3):317–31.
- Lairson LL**, Henrissat B, Davies GJ, Withers SG. Glycosyltransferases: structures, functions, and mechanisms. *Annu Rev Biochem*. 2008;77:521–55.
- Lanza C**, Tan EP, Zhang Z, Machacek M, Brinker AE, Azuma M, et al. Reduced O-GlcNAcase expression promotes mitotic errors and spindle defects. *Cell Cycle Georget Tex*. 2016 18;15(10):1363–75.
- Lanzuolo C**, Orlando V. Memories from the polycomb group proteins. *Annu Rev Genet*. 2012;46:561–89.
- Laugesen A**, Højfeldt JW, Helin K. Molecular Mechanisms Directing PRC2 Recruitment and H3K27 Methylation. *Mol Cell*. 2019 Apr 4;74(1):8–18.
- Lazarus BD**, Roos MD, Hanover JA. Mutational Analysis of the Catalytic Domain of O-Linked N-Acetylglucosaminyl Transferase. *J Biol Chem*. 2005 Oct 21;280(42):35537–44.
- Lazarus MB**, Jiang J, Kapuria V, Bhuiyan T, Janetzko J, Zandberg WF, et al. HCF-1 is cleaved in the active site of O-GlcNAc transferase. *Science*. 2013 Dec 6;342(6163):1235–9.
- Lazarus MB**, Nam Y, Jiang J, Sliz P, Walker S. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature*. 2011 Jan 27;469(7331):564–7.

- Lee C-H**, Holder M, Grau D, Saldaña-Meyer R, Yu J-R, Ganai RA, et al. Distinct Stimulatory Mechanisms Regulate the Catalytic Activity of Polycomb Repressive Complex 2. *Mol Cell*. 2018 May;70(3):435-448.e5.
- Lee TN**, Alborn WE, Knierman MD, Konrad RJ. Alloxan is an inhibitor of O-GlcNAc-selective N-acetyl- $\beta$ -d-glucosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Dec 1;350(4):1038-43.
- Lefebvre T**, Baert F, Bodart J-F, Flament S, Michalski J-C, Vilain J-P. Modulation of O-GlcNAc glycosylation during *Xenopus* oocyte maturation. *J Cell Biochem*. 2004a;93(5):999-1010.
- Lefebvre T**, Pinte S, Guérardel C, Deltour S, Martin-Soudant N, Slomianny M-C, et al. The tumor suppressor HIC1 (hypermethylated in cancer 1) is O-GlcNAc glycosylated. *Eur J Biochem*. 2004b Oct;271(19):3843-54.
- Leney AC**, El Atmioui D, Wu W, Ovaa H, Heck AJR. Elucidating crosstalk mechanisms between phosphorylation and O-GlcNAcylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 29;114(35):E7255-61.
- Leonardo ED**, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature*. 1997 Apr;386(6627):833-8.
- Leturcq M**, Mortuaire M, Hardivillé S, Schulz C, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart A-S. O-GlcNAc transferase associates with the MCM2-7 complex and its silencing destabilizes MCM-MCM interactions. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(23):4321-39.
- Levine ZG**, Fan C, Melicher MS, Orman M, Benjamin T, Walker S. O-GlcNAc Transferase Recognizes Protein Substrates Using an Asparagine Ladder in the Tetratricopeptide Repeat (TPR) Superhelix. *J Am Chem Soc*. 2018 14;140(10):3510-3.
- Lewis BA**, Burlingame AL, Myers SA. Human RNA Polymerase II Promoter Recruitment in Vitro Is Regulated by O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase (OGT). *J Biol Chem*. 2016 Jul 1;291(27):14056-61.
- Lewis BA**, Hanover JA. O-GlcNAc and the Epigenetic Regulation of Gene Expression. *J Biol Chem*. 2014 Dec 12;289(50):34440-8.
- Li B**, Li H, Hu C-W, Jiang J. Structural insights into the substrate binding adaptability and specificity of human O-GlcNAcase. *Nat Commun*. 2017a 22;8(1):666.
- Li B**, Li H, Lu L, Jiang J. Structures of human O-GlcNAcase and its complexes reveal a new substrate recognition mode. *Nat Struct Mol Biol*. 2017b;24(4):362-9.
- Li F**, Zhang J, Arfuso F, Chinnathambi A, Zayed ME, Alharbi SA, et al. NF- $\kappa$ B in cancer therapy. *Arch Toxicol*. 2015 May 1;89(5):711-31.
- Li M-D**, Ruan H-B, Singh JP, Zhao L, Zhao T, Azarhoush S, et al. O-GlcNAc Transferase Is Involved in Glucocorticoid Receptor-mediated Transrepression. *J Biol Chem*. 2012 Apr 13;287(16):12904-12.

- Li Y**, Wang L, Liu J, Zhang P, An M, Han C, et al. O-GlcNAcylation modulates Bmi-1 protein stability and potential oncogenic function in prostate cancer. *Oncogene*. 2017c 09;36(45):6293–305.
- Li Z**, Li X, Nai S, Geng Q, Liao J, Xu X, et al. Checkpoint kinase 1-induced phosphorylation of O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine transferase regulates the intermediate filament network during cytokinesis. *J Biol Chem*. 2017d 01;292(48):19548–55.
- Lim K**, Chang H-I. O-GlcNAc inhibits interaction between Sp1 and sterol regulatory element binding protein 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Mar 5;393(2):314–8.
- Lim K**, Yoon BH, Ha CH. O-Linked N-acetylglucosaminylation of Sp1 interferes with Sp1 activation of glycolytic genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Dec 4;468(1–2):349–53.
- Liu H**, Wang Z, Yu S, Xu J. Proteasomal degradation of O-GlcNAc transferase elevates hypoxia-induced vascular endothelial inflammatory response. *Cardiovasc Res*. 2014 Jul 1;103(1):131–9.
- Liu J**, Li J. PKC $\alpha$  and Netrin-1/UNC5B positive feedback control in relation with chemical therapy in bladder cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Feb;24(4):1712–7.
- Liu J**, Zhang Z, Li Z, Kong C-Z. Clinical significance of UNC5B expression in bladder cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2013 Aug;34(4):2099–108.
- Liu K**, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE. Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic  $\beta$  cells: Linkage of O-linked GlcNAc to  $\beta$  cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 14;97(6):2820–5.
- Liu T-W**, Myschyshyn M, Sinclair DA, Cecioni S, Beja K, Honda BM, et al. Genome-wide chemical mapping of O-GlcNAcylated proteins in *Drosophila melanogaster*. *Nat Chem Biol*. 2017a Feb;13(2):161–7.
- Liu T-W**, Zandberg WF, Gloster TM, Deng L, Murray KD, Shan X, et al. Metabolic Inhibitors of O-GlcNAc Transferase That Act In Vivo Implicate Decreased O-GlcNAc Levels in Leptin-Mediated Nutrient Sensing. *Angew Chem Int Ed*. 2018a;57(26):7644–8.
- Liu X**, Cui L, Hua D. Long Noncoding RNA XIST Regulates miR-137&#8208;EZH2 Axis to Promote Tumor Metastasis in Colorectal Cancer. *Cognizant Communication Corporation*; 2018b.
- Liu Y**, Huang H, Cao Y, Wu Q, Li W, Zhang J. Suppression of OGT by microRNA24 reduces FOXA1 stability and prevents breast cancer cells invasion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017b Jun 3;487(3):755–62.
- Liu Y**, Huang H, Liu M, Wu Q, Li W, Zhang J. MicroRNA-24-1 suppresses mouse hepatoma cell invasion and metastasis via directly targeting O-GlcNAc transferase. *Biomed Pharmacother*. 2017c Jul 1;91:731–8.
- Liu Y-L**, Gao X, Jiang Y, Zhang G, Sun Z-C, Cui B-B, et al. Expression and clinicopathological significance of EED, SUZ12 and EZH2 mRNA in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015 Apr;141(4):661–9.

- Lj W**, Dm B, Zy W, Bc L. Upregulated lncRNA CACNA1G-AS1 aggravates the progression of colorectal cancer by downregulating p53. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020 Jan 1;24(1):130–6.
- Llambi F**, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J*. 2001 Jun 1;20(11):2715–22.
- Llambi F**, Lourenço FC, Gozuacik D, Guix C, Pays L, Del Rio G, et al. The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. *EMBO J*. 2005 Mar 23;24(6):1192–201.
- Lo P-W**, Shie J-J, Chen C-H, Wu C-Y, Hsu T-L, Wong C-H. O-GlcNAcylation regulates the stability and enzymatic activity of the histone methyltransferase EZH2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018a Jul 10;115(28):7302–7.
- Lo W-Y**, Yang W-K, Peng C-T, Pai W-Y, Wang H-J. MicroRNA-200a/200b Modulate High Glucose-Induced Endothelial Inflammation by Targeting O-linked N-Acetylglucosamine Transferase Expression. *Front Physiol*. 2018b Apr 18;9.
- Love DC**, Kochan J, Cathey RL, Shin S-H, Hanover JA, Kochran J. Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J Cell Sci*. 2003 Feb 15;116(Pt 4):647–54.
- Lu D**, Dong D, Zhou Y, Lu M, Pang X-W, Li Y, et al. The Tumor-Suppressive Function of UNC5D and Its Repressed Expression in Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2013 Jun 1;19(11):2883–92.
- Lubas WA**, Hanover JA. Functional Expression of O-linked GlcNAc Transferase DOMAIN STRUCTURE AND SUBSTRATE SPECIFICITY. *J Biol Chem*. 2000 Apr 14;275(15):10983–8.
- Luo P**, He T, Jiang R, Li G. MicroRNA-423-5p targets O-GlcNAc transferase to induce apoptosis in cardiomyocytes. *Mol Med Rep*. 2015 Jul 1;12(1):1163–8.
- Lv D**, Zhao W, Dong D, Qian X-P, Zhang Y, Tian X-J, et al. Genetic and epigenetic control of UNC5C expression in human renal cell carcinoma. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2011 Sep;47(13):2068–76.
- Lv J**, Sun X, Ma J, Ma X, Zhang Y, Li F, et al. Netrin-1 induces the migration of Schwann cells via p38 MAPK and PI3K-Akt signaling pathway mediated by the UNC5B receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Aug 14;464(1):263–8.

---

### ~ M ~

- 
- Ma J**, Hart GW. O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. *Clin Proteomics*. 2014 Mar 5;11(1):8.
- Ma Z**, Vosseller K. Cancer Metabolism and Elevated O-GlcNAc in Oncogenic Signaling. *J Biol Chem*. 2014 Dec 12;289(50):34457–65.

- Machon O**, Baldini SF, Ribeiro JP, Steenackers A, Varrot A, Lefebvre T, et al. Recombinant fungal lectin as a new tool to investigate O-GlcNAcylation processes. *Glycobiology*. 2017;27(2):123–8.
- Machon O**, Varrot A. Expression, Purification, and Applications of the Recombinant Lectin PVL from *Psathyrella velutina* Specific for Terminal N-Acetyl-Glucosamine. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2020;2132:421–36.
- Maenner S**, Blaud M, Fouillen L, Savoye A, Marchand V, Dubois A, et al. 2-D Structure of the A Region of Xist RNA and Its Implication for PRC2 Association. *PLoS Biol*. 2010 Jan 5;8(1).
- Maisse C**, Rossin A, Cahuzac N, Paradisi A, Klein C, Haillet M-L, et al. Lipid raft localization and palmitoylation: identification of two requirements for cell death induction by the tumor suppressors UNC5H. *Exp Cell Res*. 2008 Aug 15;314(14):2544–52.
- Makwana V**, Ryan P, Patel B, Dukie S-A, Rudrawar S. Essential role of O-GlcNAcylation in stabilization of oncogenic factors. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2019 Aug 1;1863(8):1302–17.
- Males A**, Davies GJ. Structural studies of a surface-entropy reduction mutant of O-GlcNAcase. *Acta Crystallogr Sect Struct Biol*. 2019 Jan 8;75(Pt 1):70–8.
- Margueron R**, Justin N, Ohno K, Sharpe ML, Son J, Drury WJ, et al. Role of the polycomb protein Eed in the propagation of repressive histone marks. *Nature*. 2009 Oct 8;461(7265):762–7.
- Margueron R**, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, et al. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell*. 2008 Nov 21;32(4):503–18.
- Maryan N**, Statkiewicz M, Mikula M, Goryca K, Paziewska A, Strzałkowska A, et al. Regulation of the expression of claudin 23 by the enhancer of zeste 2 polycomb group protein in colorectal cancer. *Mol Med Rep*. 2015 Jul 1;12(1):728–36.
- Masclef L**, Dehennaut V, Mortuaire M, Schulz C, Leturcq M, Lefebvre T, et al. Cyclin D1 Stability Is Partly Controlled by O-GlcNAcylation. *Front Endocrinol*. 2019 Feb 22;10.
- Matsuo K**, Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Sugawara Y, Sasazuki S, et al. Association between body mass index and the colorectal cancer risk in Japan: pooled analysis of population-based cohort studies in Japan. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2012 Feb;23(2):479–90.
- Matsuura A**, Ito M, Sakaidani Y, Kondo T, Murakami K, Furukawa K, et al. O-linked N-acetylglucosamine is present on the extracellular domain of notch receptors. *J Biol Chem*. 2008 Dec 19;283(51):35486–95.
- Maury JJP**, El Farran CA, Ng D, Loh Y-H, Bi X, Bardor M, et al. RING1B O-GlcNAcylation regulates gene targeting of polycomb repressive complex 1 in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res*. 2015 Jul;15(1):182–9.

- Mazelin L**, Bernet A, Bonod-Bidaud C, Pays L, Arnaud S, Gespach C, et al. Netrin-1 controls colorectal tumorigenesis by regulating apoptosis. *Nature*. 2004 Sep;431(7004):80–4.
- Mehdy A**, Morelle W, Rosnoblet C, Legrand D, Lefebvre T, Duvet S, et al. PUGNAc treatment leads to an unusual accumulation of free oligosaccharides in CHO cells. *J Biochem (Tokyo)*. 2012 Apr 1;151(4):439–46.
- Mehlen P**, Bredesen DE. The dependence receptor hypothesis. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2004 Jan;9(1):37–49.
- Mehlen P**, Guenebeaud C. Netrin-1 and its dependence receptors as original targets for cancer therapy: *Curr Opin Oncol*. 2010 Jan;22(1):46–54.
- Mehlen P**, Llambi F. Role of netrin-1 and netrin-1 dependence receptors in colorectal cancers. *Br J Cancer*. 2005 Jul 11;93(1):1–6.
- Mehlen P**, Rabizadeh S, Snipas SJ, Assa-Munt N, Salvesen GS, Bredesen DE. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature*. 1998 Oct;395(6704):801–4.
- Mehlen P**, Tauszig-Delamasure S. Dependence receptors and colorectal cancer. *Gut*. 2014 Nov;63(11):1821–9.
- Meimei L**, Peiling L, Baoxin L, Changmin L, Rujin Z, Chunjie H. Lost expression of DCC gene in ovarian cancer and its inhibition in ovarian cancer cells. *Med Oncol*. 2011 Mar;28(1):282–9.
- Mi W**, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Apr;1812(4):514–9.
- Mierlo G van**, Veenstra GJC, Vermeulen M, Marks H. The Complexity of PRC2 Subcomplexes. *Trends Cell Biol*. 2019 Aug 1;29(8):660–71.
- Mille F**, Llambi F, Guix C, Delloye-Bourgeois C, Guenebeaud C, Castro-Obregon S, et al. Interfering with multimerization of netrin-1 receptors triggers tumor cell death. *Cell Death Differ*. 2009 Oct;16(10):1344–51.
- Mittag F**, Kuester D, Vieth M, Peters B, Stolte B, Roessner A, et al. DAPK promoter methylation is an early event in colorectal carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2006 Aug 18;240(1):69–75.
- Miyamoto Y**, Futamura M, Kitamura N, Nakamura Y, Baba H, Arakawa H. Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis. *Int J Oncol*. 2010 May;36(5):1253–60.
- Mizuguchi-Hata C**, Ogawa Y, Oka M, Yoneda Y. Quantitative regulation of nuclear pore complex proteins by O-GlcNAcylation. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Dec;1833(12):2682–9.
- Monsigny M**, Roche A-C, Sene C, Maget-Dana R, Delmotte F. Sugar-Lectin Interactions: How Does Wheat-Germ Agglutinin Bind Sialoglycoconjugates? *Eur J Biochem*. 1980;104(1):147–53.

**Monsigny M**, Sene C, Obrenovitch A, Roche A-C, Delmotte F, Boschetti E. Properties of Succinylated Wheat-Germ Agglutinin. *Eur J Biochem.* 1979;98(1):39-45.

**Montgomery ND**, Yee D, Chen A, Kalantry S, Chamberlain SJ, Otte AP, et al. The Murine Polycomb Group Protein Eed Is Required for Global Histone H3 Lysine-27 Methylation. *Curr Biol.* 2005 May 24;15(10):942-7.

**Muthusamy S**, DeMartino AM, Watson LJ, Brittan KR, Zafir A, Dassanayaka S, et al. MicroRNA-539 Is Up-regulated in Failing Heart, and Suppresses O-GlcNAcase Expression. *J Biol Chem.* 2014 Oct 24;289(43):29665-76.

**Muthusamy S**, Hong KU, Dassanayaka S, Hamid T, Jones SP. E2F1 Transcription Factor Regulates O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Transferase and O-GlcNAcase Expression. *J Biol Chem.* 2015 Dec 25;290(52):31013-24.

---

### ~ N ~

**Nam S**, Choi YJ, Kim DW, Park E-C, Kang J-G. Risk Factors for Colorectal Cancer in Korea: A Population-Based Retrospective Cohort Study. *Ann Coloproctology.* 2019 Dec;35(6):347-56.

**Negulescu A-M**, Mehlen P. Dependence receptors - the dark side awakens. *FEBS J.* 2018;285(21):3909-24.

**Nie H**, Yi W. O-GlcNAcylation, a sweet link to the pathology of diseases. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2019 May;20(5):437-48.

**Ning Y**, Wang L, Giovannucci EL. A quantitative analysis of body mass index and colorectal cancer: findings from 56 observational studies. *Obes Rev.* 2010;11(1):19-30.

**Nolte D**, Müller U. Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. *Mamm Genome.* 2002 Jan 1;13(1):62-4.

**Nyamao RM**, Wu J, Yu L, Xiao X, Zhang F-M. Roles of DDX5 in the tumorigenesis, proliferation, differentiation, metastasis and pathway regulation of human malignancies. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer.* 2019 Jan 1;1871(1):85-98.

---

### ~ O ~

**O'Carroll D**, Erhardt S, Pagani M, Barton SC, Surani MA, Jenuwein T. The Polycomb-Group Gene Ezh2 Is Required for Early Mouse Development. *Mol Cell Biol.* 2001 Jul;21(13):4330-6.

**Ohuchi M**, Sakamoto Y, Tokunaga R, Kiyozumi Y, Nakamura K, Izumi D, et al. Increased EZH2 expression during the adenoma-carcinoma sequence in colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2018 Oct;16(4):5275-81.

- Okazaki S**, Ishikawa T, Iida S, Ishiguro M, Kobayashi H, Higuchi T, et al. Clinical significance of UNC5B expression in colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2012 Jan 1;40(1):209-16.
- Oksuz O**, Narendra V, Lee C-H, Descostes N, LeRoy G, Raviram R, et al. Capturing the Onset of PRC2-Mediated Repressive Domain Formation. *Mol Cell*. 2018 Jun 21;70(6):1149-1162.e5.
- Olivier-Van Stichelen S**, Abramowitz LK, Hanover JA. X marks the spot: does it matter that O-GlcNAc transferase is an X-linked gene? *Biochem Biophys Res Commun*. 2014a Oct 17;453(2):201-7.
- Olivier-Van Stichelen S**, Dehennaut V, Buzy A, Zacharyus J-L, Guinez C, Mir A-M, et al. O-GlcNAcylation stabilizes  $\beta$ -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2014b Aug;28(8):3325-38.
- Olivier-Van Stichelen S**, Drougat L, Dehennaut V, El Yazidi-Belkoura I, Guinez C, Mir A-M, et al. Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis*. 2012a Dec 10;1:e36.
- Olivier-Van Stichelen S**, Guinez C, Mir A-M, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski J-C, et al. The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of  $\beta$ -catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012b Feb 15;302(4):E417-424.
- Olivo-Marston SE**, Hursting SD, Perkins SN, Schetter A, Khan M, Croce C, et al. Effects of Calorie Restriction and Diet-Induced Obesity on Murine Colon Carcinogenesis, Growth and Inflammatory Factors, and MicroRNA Expression. *PLoS ONE*. 2014 Apr 14;9(4).
- Ortiz-Meoz RF**, Jiang J, Lazarus MB, Orman M, Janetzko J, Fan C, et al. A small molecule that inhibits OGT activity in cells. *ACS Chem Biol*. 2015 Jun 19;10(6):1392-7.

~ **P** ~

- 
- Padua MB**, Bhat-Nakshatri P, Anjanappa M, Prasad MS, Hao Y, Rao X, et al. Dependence receptor UNC5A restricts luminal to basal breast cancer plasticity and metastasis. *Breast Cancer Res BCR*. 2018 02;20(1):35.
- Pais R**, Silaghi H, Silaghi AC, Rusu ML, Dumitrascu DL. Metabolic syndrome and risk of subsequent colorectal cancer. *World J Gastroenterol WJG*. 2009 Nov 7;15(41):5141-8.
- Palacios D**, Mozzetta C, Consalvi S, Caretti G, Saccone V, Proserpio V, et al. TNF/p38 alpha/Polycomb signalling to Pax7 locus in satellite cells links inflammation to the epigenetic control of muscle regeneration. *Cell Stem Cell*. 2010 Oct 8;7(4):455-69.
- Pan G**, Tian S, Nie J, Yang C, Ruotti V, Wei H, et al. Whole-Genome Analysis of Histone H3 Lysine 4 and Lysine 27 Methylation in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2007 Sep 13;1(3):299-312.

- Pang Y**, Kartsonaki C, Guo Y, Chen Y, Yang L, Bian Z, et al. Diabetes, plasma glucose and incidence of colorectal cancer in Chinese adults: a prospective study of 0.5 million people. *J Epidemiol Community Health*. 2018 Oct;72(10):919-25.
- Papanastasiou AD**, Pampalakis G, Katsaros D, Sotiropoulou G. Netrin-1 overexpression is predictive of ovarian malignancies. *Oncotarget*. 2011 May;2(5):363-7.
- Paradisi A**, Creveaux M, Gibert B, Devailly G, Redoulez E, Neves D, et al. Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death. *EMBO Mol Med*. 2013 Dec;5(12):1821-34.
- Paradisi A**, Maise C, Bernet A, Coissieux M-M, Maccarrone M, Scoazec J-Y, et al. NF-kappaB regulates netrin-1 expression and affects the conditional tumor suppressive activity of the netrin-1 receptors. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1248-57.
- Park S-K**, Zhou X, Pendleton KE, Hunter OV, Kohler JJ, O'Donnell KA, et al. A Conserved Splicing Silencer Dynamically Regulates O-GlcNAc Transferase Intron Retention and O-GlcNAc Homeostasis. *Cell Rep*. 2017 Aug 1;20(5):1088-99.
- Pasini D**, Bracken AP, Jensen MR, Denchi EL, Helin K. Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4061-71.
- Pathak S**, Dorfmüller HC, Borodkin VS, van Aalten DMF. Chemical Dissection of the Link between Streptozotocin, O-GlcNAc, and Pancreatic Cell Death. *Chem Biol*. 2008 Aug 25;15(8):799-807.
- Peng Z**, Zhang Y. Methyl jasmonate induces the apoptosis of human colorectal cancer cells via downregulation of EZH2 expression by microRNA-101. *Mol Med Rep*. 2017 Feb 1;15(2):957-62.
- Phoomak C**, Vaeteewoottacharn K, Sawanyawisuth K, Seubwai W, Wongkham C, Silsirivanit A, et al. Mechanistic insights of O-GlcNAcylation that promote progression of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-κB. *Sci Rep*. 2016 13;6:27853.
- Phueaouan T**, Chaiyawat P, Netsirisawan P, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Srisomsap C, et al. Aberrant O-GlcNAc-modified proteins expressed in primary colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2013 Dec;30(6):2929-36.
- Picard M**, Petrie RJ, Antoine-Bertrand J, Saint-Cyr-Proulx E, Villemure J-F, Lamarche-Vane N. Spatial and temporal activation of the small GTPases RhoA and Rac1 by the netrin-1 receptor UNC5a during neurite outgrowth. *Cell Signal*. 2009 Dec 1;21(12):1961-73.
- Plath K**, Fang J, Mlynarczyk-Evans SK, Cao R, Worringer KA, Wang H, et al. Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in X Inactivation. *Science*. 2003 Apr 4;300(5616):131-5.
- Porcellini E**, Laprovitera N, Riefolo M, Ravaioli M, Garajova I, Ferracin M. Epigenetic and epitranscriptomic changes in colorectal cancer: Diagnostic, prognostic, and treatment implications. *Cancer Lett*. 2018 Apr 10;419:84-95.

**Portoso M**, Ragazzini R, Brenčić Ž, Moiani A, Michaud A, Vassilev I, et al. PRC2 is dispensable for HOTAIR-mediated transcriptional repression. *EMBO J*. 2017 13;36(8):981–94.

**Pravata VM**, Gundogdu M, Bartual SG, Ferenbach AT, Stavridis M, Öunap K, et al. A missense mutation in the catalytic domain of O-GlcNAc transferase links perturbations in protein O-GlcNAcylation to X-linked intellectual disability. *Febs Lett*. 2020 Feb;594(4):717–27.

**Pravata VM**, Muha V, Gundogdu M, Ferenbach AT, Kakade PS, Vandadi V, et al. Catalytic deficiency of O-GlcNAc transferase leads to X-linked intellectual disability. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019 23;116(30):14961–70.

---

### ~ Q ~

**Qi M**, Xiong X. Promoter hypermethylation of RARβ2, DAPK, hMLH1, p14, and p15 is associated with progression of breast cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Dec 21;97(51).

**Qian K**, Wang S, Fu M, Zhou J, Singh JP, Li M-D, et al. Transcriptional regulation of O-GlcNAc homeostasis is disrupted in pancreatic cancer. *J Biol Chem*. 2018 07;293(36):13989–4000.

**Qin W**, Xie Z, Wang J, Ou G, Wang C, Chen X. Chemoproteomic Profiling of O-GlcNAcylation in *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry*. 2019 Nov 4;

**de Queiroz RM**, Carvalho E, Dias WB. O-GlcNAcylation: The Sweet Side of the Cancer. *Front Oncol*. 2014;4:132.

---

### ~ R ~

**Rafie K**, Raimi O, Ferenbach AT, Borodkin VS, Kapuria V, van Aalten DMF. Recognition of a glycosylation substrate by the O-GlcNAc transferase TPR repeats. *Open Biol*. 2017;7(6).

**Ramesh G**, Berg A, Jayakumar C. Plasma netrin-1 is a diagnostic biomarker of human cancers. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem*. 2011 Mar;16(2):172–80.

**Ramirez-Correa GA**, Jin W, Wang Z, Zhong X, Gao WD, Dias WB, et al. O-linked GlcNAc Modification of Cardiac Myofilament Proteins: A Novel Regulator of Myocardial Contractile Function. *Circ Res*. 2008 Dec 5;103(12):1354–8.

**Ranuncolo SM**, Ghosh S, Hanover JA, Hart GW, Lewis BA. Evidence of the Involvement of O-GlcNAc-modified Human RNA Polymerase II CTD in Transcription in Vitro and in Vivo. *J Biol Chem*. 2012 Jul 6;287(28):23549–61.

- Rao FV**, Schüttelkopf AW, Dorfmüller HC, Ferenbach AT, Navratilova I, van Aalten DMF. Structure of a bacterial putative acetyltransferase defines the fold of the human O-GlcNAcase C-terminal domain. *Open Biol.* 2013 Oct 2;3(10):130021.
- Ren X-R**, Hong Y, Feng Z, Yang H-M, Mei L, Xiong W-C. Tyrosine Phosphorylation of Netrin Receptors in Netrin-1 Signaling. *Neurosignals.* 2008;16(0).
- Riising EM**, Boggio R, Chiocca S, Helin K, Pasini D. The Polycomb Repressive Complex 2 Is a Potential Target of SUMO Modifications. *PLoS ONE.* 2008 Jul 16;3(7).
- Rinn JL**, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, et al. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell.* 2007 Jun 29;129(7):1311-23.
- Roos MD**, Xie W, Su K, Clark JA, Yang X, Chin E, et al. Streptozotocin, an analog of N-acetylglucosamine, blocks the removal of O-GlcNAc from intracellular proteins. *Proc Assoc Am Physicians.* 1998 Oct;110(5):422-32.
- Roth C**, Chan S, Offen WA, Hemsworth GR, Willems LI, King DT, et al. Structural and functional insight into human O-GlcNAcase. *Nat Chem Biol.* 2017;13(6):610-2.
- Ruan H-B**, Han X, Li M-D, Singh JP, Qian K, Azarhoush S, et al. O-GlcNAc Transferase/Host Cell Factor C1 Complex Regulates Gluconeogenesis by Modulating PGC-1 $\alpha$  Stability. *Cell Metab.* 2012 Aug 8;16(2):226-37.
- Ruan H-B**, Ma Y, Torres S, Zhang B, Feriod C, Heck RM, et al. Calcium-dependent O-GlcNAc signaling drives liver autophagy in adaptation to starvation. *Genes Dev.* 2017 Aug 15;31(16):1655-65.
- Ryu I-H**, Do S-I. Denitrosylation of S-nitrosylated OGT is triggered in LPS-stimulated innate immune response. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Apr 29;408(1):52-7.



- 
- Sacoman JL**, Dagda RY, Burnham-Marusich AR, Dagda RK, Berninsone PM. Mitochondrial O-GlcNAc Transferase (mOGT) Regulates Mitochondrial Structure, Function, and Survival in HeLa Cells. *J Biol Chem.* 2017 Mar 17;292(11):4499-518.
- Saito M**, Yamaguchi A, Goi T, Tsuchiyama T, Nakagawara G, Urano T, et al. Expression of DCC protein in colorectal tumors and its relationship to tumor progression and metastasis. *Oncology.* 1999;56(2):134-41.
- Sakabe K**, Hart GW. O-GlcNAc Transferase Regulates Mitotic Chromatin Dynamics. *J Biol Chem.* 2010 Nov 5;285(45):34460-8.
- Sakabe K**, Wang Z, Hart GW. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 16;107(46):19915-20.

- Sakaidani Y**, Ichihanagi N, Saito C, Nomura T, Ito M, Nishio Y, et al. O-linked-N-acetylglucosamine modification of mammalian Notch receptors by an atypical O-GlcNAc transferase Eogt1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Mar 2;419(1):14-9.
- Sakaidani Y**, Nomura T, Matsuura A, Ito M, Suzuki E, Murakami K, et al. O-Linked- N -acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nat Commun*. 2011 Dec 13;2(1):1-9.
- Salvatore L**, Calegari MA, Loupakis F, Fassan M, Di Stefano B, Bensi M, et al. PTEN in Colorectal Cancer: Shedding Light on Its Role as Predictor and Target. *Cancers*. 2019 Nov 9;11(11).
- Sapienza C**, Issa J-P. Diet, Nutrition, and Cancer Epigenetics. *Annu Rev Nutr*. 2016 17;36:665-81.
- Schirm M**, Kalmokoff M, Aubry A, Thibault P, Sandoz M, Logan SM. Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine. *J Bacteriol*. 2004 Oct;186(20):6721-7.
- Schmidt M**, Rohe A, Platzer C, Najjar A, Erdmann F, Sippl W. Regulation of G2/M Transition by Inhibition of WEE1 and PKMYT1 Kinases. *Mol J Synth Chem Nat Prod Chem*. 2017 Nov 23;22(12).
- Schmitges FW**, Prusty AB, Faty M, Stützer A, Lingaraju GM, Aiwazian J, et al. Histone Methylation by PRC2 Is Inhibited by Active Chromatin Marks. *Mol Cell*. 2011 May 6;42(3):330-41.
- Schröder KC**, Duman D, Tekin M, Schanze D, Sukalo M, Meester J, et al. Adams-Oliver syndrome caused by mutations of the EOGT gene. *Am J Med Genet A*. 2019;179(11):2246-51.
- Schuettengruber B**, Bourbon H-M, Di Croce L, Cavalli G. Genome Regulation by Polycomb and Trithorax: 70 Years and Counting. *Cell*. 2017 Sep 21;171(1):34-57.
- Seo HG**, Kim HB, Kang MJ, Ryum JH, Yi EC, Cho JW. Identification of the nuclear localisation signal of O-GlcNAc transferase and its nuclear import regulation. *Sci Rep*. 2016 Oct 7;6.
- Seto E**, Yoshida M. Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Apr;6(4).
- Sha M**, Mao G, Wang G, Chen Y, Wu X, Wang Z. DZNep inhibits the proliferation of colon cancer HCT116 cells by inducing senescence and apoptosis. *Acta Pharm Sin B*. 2015 May;5(3):188-93.
- Shafi R**, Iyer SPN, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, et al. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 23;97(11):5735-9.

- Shaheen R**, Aglan M, Keppler-Noreuil K, Faqeih E, Ansari S, Horton K, et al. Mutations in EOGT Confirm the Genetic Heterogeneity of Autosomal-Recessive Adams-Oliver Syndrome. *Am J Hum Genet.* 2013 Apr 4;92(4):598–604.
- Sharif S**, Shi J, Ruijtenbeek R, Pieters RJ. Study of cross talk between phosphatases and OGA on a ZO-3-derived peptide. *Amino Acids.* 2019 Apr;51(4):739–43.
- She N**, Zhao Y, Hao J, Xie S, Wang C. Uridine diphosphate release mechanism in O-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase catalysis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2019;1863(3):609–22.
- Shen DL**, Gloster TM, Yuzwa SA, Vocadlo DJ. Insights into O-Linked N-Acetylglucosamine ([0-9]O-GlcNAc) Processing and Dynamics through Kinetic Analysis of O-GlcNAc Transferase and O-GlcNAcase Activity on Protein Substrates. *J Biol Chem.* 2012 May 4;287(19):15395–408.
- Shen X**, Liu Y, Hsu Y-J, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, et al. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell.* 2008 Nov 21;32(4):491–502.
- Shi F-T**, Kim H, Lu W, He Q, Liu D, Goodell MA, et al. 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.* 2013 Jul 19;288(29):20776–84.
- Shi H**, Munk A, Nielsen TS, Daughtry MR, Larsson L, Li S, et al. Skeletal muscle O-GlcNAc transferase is important for muscle energy homeostasis and whole-body insulin sensitivity. *Mol Metab.* 2018 Feb 24;11:160–77.
- Shibata D**, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G, et al. The DCC Protein and Prognosis in Colorectal Cancer. *N Engl J Med.* 1996 Dec 5;335(23):1727–32.
- Shimizu M**, Tanaka N. IL-8-induced O-GlcNAc modification via GLUT3 and GFAT regulates cancer stem cell-like properties in colon and lung cancer cells. *Oncogene.* 2019 Feb;38(9):1520–33.
- Shin SK**, Nagasaka T, Jung BH, Matsubara N, Kim WH, Carethers JM, et al. Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology.* 2007 Dec;133(6):1849–57.
- Sikalidis AK**, Fitch MD, Fleming SE. Diet Induced Obesity Increases the Risk of Colonic Tumorigenesis in Mice. *Pathol Oncol Res.* 2013 Oct 1;19(4):657–66.
- Sinclair DAR**, Syrzycka M, Macauley MS, Rastgardani T, Komljenovic I, Vocadlo DJ, et al. Drosophila O-GlcNAc transferase (OGT) is encoded by the Polycomb group (PcG) gene, super sex combs (sxc). *Proc Natl Acad Sci.* 2009 Nov 8;106(32):13427–32.
- Slawson C**, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW. Perturbations in O-linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Protein Modification Cause Severe Defects in Mitotic Progression and Cytokinesis. *J Biol Chem.* 2005 Sep 23;280(38):32944–56.
- Snow CM**, Senior A, Gerace L. Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J Cell Biol.* 1987 May;104(5):1143–56.

**Soleimani A**, Rahmani F, Ferns GA, Ryzhikov M, Avan A, Hassanian SM. Role of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in the pathogenesis of colorectal cancer. *Gene*. 2020 Feb 5;726:144132.

**Steenackers A**, Olivier-Van Stichelen S, Baldini SF, Dehennaut V, Toillon R-A, Le Bourhis X, et al. Silencing the Nucleocytoplasmic O-GlcNAc Transferase Reduces Proliferation, Adhesion, and Migration of Cancer and Fetal Human Colon Cell Lines. *Front Endocrinol*. 2016 May 25;7.

**Šturlan S**, Kapitanović S, Kovačević D, Lukač J, Spaventi Š, Spaventi R, et al. Loss of heterozygosity of APC and DCC tumor suppressor genes in human sporadic colon cancer. *J Mol Med*. 1999 Feb 12;77(3):316–21.

**Su J**, Zhang E, Han L, Yin D, Liu Z, He X, et al. Long noncoding RNA BLACAT1 indicates a poor prognosis of colorectal cancer and affects cell proliferation by epigenetically silencing of p15. *Cell Death Dis*. 2017 Mar;8(3):e2665.

~ **T** ~

---

**Tai H-C**, Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. Parallel Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins from Cell Lysates. *J Am Chem Soc*. 2004 Sep 1;126(34):10500–1.

**Tan Z-W**, Fei G, Paulo JA, Bellaousov S, Martin SES, Dubeau DY, et al. O-GlcNAc regulates gene expression by controlling detained intron splicing. *Nucleic Acids Res*. 2020 Apr 24;

**Tanay A**, O'Donnell AH, Damelin M, Bestor TH. Hyperconserved CpG domains underlie Polycomb-binding sites. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Mar 27;104(13):5521–6.

**Tang X**, Jang S-W, Okada M, Chan C-B, Feng Y, Liu Y, et al. Netrin-1 Mediates Neuronal Survival Through PIKE-L Interaction With the Dependence Receptor UNC5B. *Nat Cell Biol*. 2008 Jun;10(6):698–706.

**Tanikawa C**, Matsuda K, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H. p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2003a Mar;5(3):216–23.

**Tao J**, Shi L, Huang L, Shi H, Chen H, Wang Y, et al. EZH2 is involved in silencing of WNT5A during epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cell line. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2017 Nov;143(11):2211–9.

**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 Apr 18;289(16):11132–42.

**Taylor RP**, Geisler TS, Chambers JH, McClain DA. Up-regulation of O-GlcNAc transferase with glucose deprivation in HepG2 cells is mediated by decreased hexosamine pathway flux. *J Biol Chem*. 2009 Feb 6;284(6):3425–32.

- Taylor RP**, Parker GJ, Hazel MW, Soesanto Y, Fuller W, Yazzie MJ, et al. Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem*. 2008 Mar 7;283(10):6050–7.
- Teraoka N**, Mutoh M, Takasu S, Ueno T, Nakano K, Takahashi M, et al. High susceptibility to azoxymethane-induced colorectal carcinogenesis in obese KK-Ay mice. *Int J Cancer*. 2011 Aug 1;129(3):528–35.
- Tessarz P**, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Nov;15(11):703–8.
- Thiébault K**, Mazelin L, Pays L, Llambi F, Joly M-O, Scoazec J-Y, et al. The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):4173–8.
- Toda K**, Nagasaka T, Umeda Y, Tanaka T, Kawai T, Fuji T, et al. Genetic and epigenetic alterations of netrin-1 receptors in gastric cancer with chromosomal instability. *Clin Epigenetics*. 2015 Jul 23;7(1).
- Toden S**, Okugawa Y, Jascur T, Wodarz D, Komarova NL, Buhrmann C, et al. Curcumin mediates chemosensitization to 5-fluorouracil through miRNA-induced suppression of epithelial-to-mesenchymal transition in chemoresistant colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 2015 Mar;36(3):355–67.
- Toden S**, Tran H-M, Tovar-Camargo OA, Okugawa Y, Goel A. Epigallocatechin-3-gallate targets cancer stem-like cells and enhances 5-fluorouracil chemosensitivity in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 Feb 22;7(13):16158–71.
- Toleman C**, Paterson A, Kudlow J. Location and characterization of the O-GlcNAcase active site. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj*. 2006a May;1760(5):829–39.
- Toleman C**, Paterson AJ, Whisenhunt TR, Kudlow JE. Characterization of the Histone Acetyltransferase (HAT) Domain of a Bifunctional Protein with Activable O-GlcNAcase and HAT Activities. *J Biol Chem*. 2004 Dec 17;279(51):53665–73.
- Toleman CA**, Paterson AJ, Kudlow JE. The histone acetyltransferase NCOAT contains a zinc finger-like motif involved in substrate recognition. *J Biol Chem*. 2006b Feb 17;281(7):3918–25.
- Torres CR**, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. 1984 Oct 3;259(5):3308–17.
- Trapannone R**, Mariappa D, Ferenbach AT, vanAalten DMF. Nucleocytoplasmic human O-GlcNAc transferase is sufficient for O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins. *Biochem J*. 2016a Jun 15;473(12):1693–702.
- Trapannone R**, Rafie K, van Aalten DMF. O-GlcNAc transferase inhibitors: current tools and future challenges. *Biochem Soc Trans*. 2016b Feb;44(1):88–93.
- Trinca GM**, Hagan CR. O-GlcNAcylation in Women's Cancers: Breast, Endometrial and Ovarian. *J Bioenerg Biomembr*. 2018 Jun;50(3):199–204.

**Trinidad JC**, Barkan DT, Gullede BF, Thalhammer A, Sali A, Schoepfer R, et al. Global Identification and Characterization of Both O-GlcNAcylation and Phosphorylation at the Murine Synapse. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2012 Aug;11(8):215–29.

**Tu S**, Yuan G-C, Shao Z. The PRC2-binding long non-coding RNAs in human and mouse genomes are associated with predictive sequence features. *Sci Rep*. 2017 Jan 31;7.

~ V ~

---

**Vaidyanathan K**, Niranjan T, Selvan N, Teo CF, May M, Patel S, et al. 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. *J Biol Chem*. 2017 26;292(21):8948–63.

**Varadarajan SG**, Kong JH, Phan KD, Kao T-J, Panaitof SC, Cardin J, et al. Netrin1 produced by neural progenitors, not floor plate cells, is required for axon guidance in the spinal cord. *Neuron*. 2017 May 17;94(4):790-799.e3.

**Varshney S**, Stanley P. EOGT and O-GlcNAc on secreted and membrane proteins. *Biochem Soc Trans*. 2017 15;45(2):401–8.

**Vasconcelos-Dos-Santos A**, Loponte HFBR, Mantuano NR, Oliveira IA, de Paula IF, Teixeira LK, et al. Hyperglycemia exacerbates colon cancer malignancy through hexosamine biosynthetic pathway. *Oncogenesis*. 2017 Mar 20;6(3):e306.

**Vella P**, Scelfo A, Jammula S, Chiacchiera F, Williams K, Cuomo A, et al. Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol Cell*. 2013 Feb 21;49(4):645–56.

**Vercoutter-Edouart A-S**, Yazidi-Belkoura IE, Guinez C, Baldini S, Leturcq M, Mortuaire M, et al. Detection and identification of O-GlcNAcylated proteins by proteomic approaches. *PROTEOMICS*. 2015;15(5–6):1039–50.

**Very N**, Steenackers A, Dubuquoy C, Vermuse J, Dubuquoy L, Lefebvre T, et al. Cross regulation between mTOR signaling and O-GlcNAcylation. *J Bioenerg Biomembr*. 2018 Jun;50(3):213–22.

**Vilorio-Marqués L**, Martín V, Diez-Tascón C, González-Sevilla MF, Fernández-Villa T, Honrado E, et al. The role of EZH2 in overall survival of colorectal cancer: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2017 23;7(1):13806.

**Vocadlo DJ**. O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation. *Curr Opin Chem Biol*. 2012 Dec;16(5–6):488–97.

**Völkel P**, Dupret B, Le Bourhis X, Angrand P-O. Diverse involvement of EZH2 in cancer epigenetics. *Am J Transl Res*. 2015;7(2):175–93.

**Vosseller K**, Trinidad JC, Chalkley RJ, Specht CG, Thalhammer A, Lynn AJ, et al. O-Linked N-Acetylglucosamine Proteomics of Postsynaptic Density Preparations Using Lectin

Weak Affinity Chromatography and Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2006 May 1;5(5):923–34.

~ **W** ~

---

**Wan J**, Zhan J, Li S, Ma J, Xu W, Liu C, et al. PCAF-primed EZH2 acetylation regulates its stability and promotes lung adenocarcinoma progression. *Nucleic Acids Res*. 2015 Apr 20;43(7):3591–604.

**Wang H**, Ozaki T, Shamim Hossain M, Nakamura Y, Kamijo T, Xue X, et al. A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jun 13;370(4):594–8.

**Wang H**, Zhang B, Gu M, Li S, Chi Z, Hao L. Overexpression of the dependence receptor UNC5H4 inhibits cell migration and invasion, and triggers apoptosis in neuroblastoma cell. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2014a Jun;35(6):5417–25.

**Wang R**, Wei Z, Jin H, Wu H, Yu C, Wen W, et al. Autoinhibition of UNC5b Revealed by the Cytoplasmic Domain Structure of the Receptor. *Mol Cell*. 2009 Mar 27;33(6):692–703.

**Wang Y**, He Y, Su C, Zentella R, Sun T, Wang L. Nuclear Localized O-Fucosyltransferase SPY Facilitates PRR5 Proteolysis to Fine-Tune the Pace of Arabidopsis Circadian Clock. *Mol Plant*. 2020 Mar 2;13(3):446–58.

**Wang Z**, Qin G, Zhao TC. Histone Deacetylase 4 (HDAC4): Mechanism of Regulations and Biological Functions. *Epigenomics*. 2014b Feb;6(1):139–50.

**Wang Z**, Udeshi ND, Slawson C, Compton PD, Sakabe K, Cheung WD, et al. Extensive Crosstalk Between O-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Cytokinesis. *Sci Signal*. 2010 Jan 12;3(104):ra2.

**Wells L**, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A, et al. Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins FURTHER CHARACTERIZATION OF THE NUCLEOCYTOPLASMIC  $\beta$ -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE, O-GlcNAcase. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):1755–61.

**Wells L**, Slawson C, Hart GW. The E2F-1 associated retinoblastoma-susceptibility gene product is modified by O-GlcNAc. *Amino Acids*. 2011 Mar;40(3):877–83.

**Whisenhunt TR**, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Van Tine BA, Kudlow JE. Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology*. 2006 Jun;16(6):551–63.

**Willems AP**, Gundogdu M, Kempers MJE, Giltay JC, Pfundt R, Elferink M, et al. Mutations in N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase in patients with X-linked intellectual disability. *J Biol Chem*. 2017 Jul 28;292(30):12621–31.

- Williams ME**, Strickland P, Watanabe K, Hinck L. UNC5H1 Induces Apoptosis via Its Juxtamembrane Region through an Interaction with NRAGE. *J Biol Chem*. 2003 Sep 5;278(19):17483–90.
- Workman JL**, Kingston RE. Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:545–79.
- Wu D**, Cai Y, Jin J. Potential coordination role between O-GlcNAcylation and epigenetics. *Protein Cell*. 2017a Oct;8(10):713–23.
- Wu F**, Xing T, Gao X, Liu F. miR-501-3p promotes colorectal cancer progression via activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *Int J Oncol*. 2019a Sep;55(3):671–83.
- Wu H**, Zeng H, Dong A, Li F, He H, Senisterra G, et al. Structure of the Catalytic Domain of EZH2 Reveals Conformational Plasticity in Cofactor and Substrate Binding Sites and Explains Oncogenic Mutations. *PLoS ONE*. 2013 Dec 19;8(12).
- Wu J**, Wang G, He B, Chen X, An Y. Methylation of the UNC5C gene and its protein expression in colorectal cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2017b Apr;39(4):1010428317697564.
- Wu N**, Jiang M, Han Y, Liu H, Chu Y, Liu H, et al. O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer progression by regulating protein stability and potential catcinogenic function of DDX5. *J Cell Mol Med*. 2019b Feb;23(2):1354–62.

~ X ~

- 
- Xie JJ**, Li WH, Li X, Ye W, Shao CF. LncRNA MALAT1 promotes colorectal cancer development by sponging miR-363-3p to regulate EZH2 expression. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2019 Apr;33(2):331–43.
- Xu D**, Wang W, Bian T, Yang W, Shao M, Yang H. Increased expression of O-GlcNAc transferase (OGT) is a biomarker for poor prognosis and allows tumorigenesis and invasion in colon cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2019a Apr 1;12(4):1305–14.
- Xu M**, Chen X, Lin K, Zeng K, Liu X, Xu X, et al. lncRNA SNHG6 regulates EZH2 expression by sponging miR-26a/b and miR-214 in colorectal cancer. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 2019b Jan 9;12.
- Xu X**, Chen X, Xu M, Liu X, Pan B, Qin J, et al. miR-375-3p suppresses tumorigenesis and partially reverses chemoresistance by targeting YAP1 and SP1 in colorectal cancer cells. *Aging*. 2019c Sep 22;11(18):7357–85.

~ Y ~

- 
- Yamaguchi S**, Asao T, Nakamura J, Ide M, Kuwano H. High frequency of DAP-kinase gene promoter methylation in colorectal cancer specimens and its identification in serum. *Cancer Lett*. 2003 May 8;194(1):99–105.

- Yamauchi K**, Yamazaki M, Abe M, Sakimura K, Lickert H, Kawasaki T, et al. Netrin-1 Derived from the Ventricular Zone, but not the Floor Plate, Directs Hindbrain Commissural Axons to the Ventral Midline. *Sci Rep*. 2017 Sep 20;7.
- Yan K-S**, Lin C-Y, Liao T-W, Peng C-M, Lee S-C, Liu Y-J, et al. EZH2 in Cancer Progression and Potential Application in Cancer Therapy: A Friend or Foe? *Int J Mol Sci*. 2017 May 31;18(6).
- Yang WH**, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, et al. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol*. 2006 Oct;8(10):1074-83.
- Yang X**, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, et al. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*. 2008 Feb;451(7181):964-9.
- Yang X**, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Jul;18(7):452-65.
- Yang Y**, Yin X, Yang H, Xu Y. Histone demethylase LSD2 acts as an E3 ubiquitin ligase and inhibits cancer cell growth through promoting proteasomal degradation of OGT. *Mol Cell*. 2015 Apr 2;58(1):47-59.
- Yang Y**, Zhou L, Lu L, Wang L, Li X, Jiang P, et al. A novel miR-193a-5p-YY1-APC regulatory axis in human endometrioid endometrial adenocarcinoma. *Oncogene*. 2013 Jul 18;32(29):3432-42.
- Yang YR**, Song M, Lee H, Jeon Y, Choi E-J, Jang H-J, et al. O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell*. 2012;11(3):439-48.
- Yao Y**, Hu H, Yang Y, Zhou G, Shang Z, Yang X, et al. Downregulation of Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) is essential for the Induction of Autophagy and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Genes*. 2016 Oct 3;7(10).
- Yehezkel G**, Cohen L, Kliger A, Manor E, Khalaila I. 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*. 2012 Aug 17;287(34):28755-69.
- Ying L**, Yan F, Williams BR, Xu P, Li X, Zhao Y, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate and EZH2 inhibitor GSK343 have similar inhibitory effects and mechanisms of action on colorectal cancer cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018 Jan;45(1):58-67.
- Yong W**, Zhuoqi X, Baocheng W, Dongsheng Z, Chuan Z, Yueming S. Hsa\_circ\_0071589 promotes carcinogenesis via the miR-600/EZH2 axis in colorectal cancer. *Biomed Pharmacother*. 2018 Jun 1;102:1188-94.
- Yu FY**, Zhou CY, Liu YB, Wang B, Mao L, Li Y. miR-483 is down-regulated in gastric cancer and suppresses cell proliferation, invasion and protein O-GlcNAcylation by targeting OGT. *Neoplasma*. 2018 Mar 14;65(3):406-14.

**Yu M**, Chu S, Fei B, Fang X, Liu Z. O-GlcNAcylation of ITGA5 facilitates the occurrence and development of colorectal cancer. *Exp Cell Res*. 2019 Sep 15;382(2):111464.

**Yuzwa SA**, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, et al. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol*. 2008 Aug;4(8):483–90.

---

### ~ Z ~

---

**Zachara N**, Akimoto Y, Hart GW. The O-GlcNAc Modification. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 3rd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015.

**Zachara NE**, Vosseller K, Hart GW. Detection and Analysis of Proteins Modified by O-Linked N-Acetylglucosamine. *Curr Protoc Protein Sci*. 2011 Nov;CHAPTER:Unit12.8.

**Zeng Q**, Zhao R-X, Chen J, Li Y, Li X-D, Liu X-L, et al. O-linked GlcNAcylation elevated by HPV E6 mediates viral oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Aug 16;113(33):9333–8.

**Zentella R**, Hu J, Hsieh W-P, Matsumoto PA, Dawdy A, Barnhill B, et al. O-GlcNAcylation of master growth repressor DELLA by SECRET AGENT modulates multiple signaling pathways in Arabidopsis. *Genes Dev*. 2016 Jan 15;30(2):164–76.

**Zentella R**, Sui N, Barnhill B, Hsieh W-P, Hu J, Shabanowitz J, et al. The Arabidopsis O-fucosyltransferase SPINDLY activates nuclear growth repressor DELLA. *Nat Chem Biol*. 2017 May;13(5):479–85.

**Zeytuni N**, Zarivach R. Structural and Functional Discussion of the Tetra-Trico-Peptide Repeat, a Protein Interaction Module. *Structure*. 2012 Mar 7;20(3):397–405.

**Zhang C**, Xie F, Li L, Zhang C, Zhang Y, Ying W, et al. Hepatocyte nuclear factor 1 alpha (HNF1A) regulates transcription of O-GlcNAc transferase in a negative feedback mechanism. *FEBS Lett*. 2019 May;593(10):1050–60.

**Zhang H**, Gao G, Brunk UT. Extracellular reduction of alloxan results in oxygen radical-mediated attack on plasma and lysosomal membranes. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 1992 Apr;100(4):317–25.

**Zhang M-M**, Sun F, Cui B, Zhang L-L, Fang Y, Li Y, et al. Tumor-suppressive function of UNC5D in papillary thyroid cancer. *Oncotarget*. 2017a Oct 10;8(56):96126–38.

**Zhang Q**, Liu X, Gao W, Li P, Hou J, Li J, et al. Differential Regulation of the Ten-Eleven Translocation (TET) Family of Dioxygenases by O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Transferase (OGT). *J Biol Chem*. 2014a Feb 28;289(9):5986–96.

**Zhang S**, Roche K, Nasheuer H-P, Lowndes NF. Modification of histones by sugar  $\beta$ -N-acetylglucosamine (GlcNAc) occurs on multiple residues, including histone H3 serine 10, and is cell cycle-regulated. *J Biol Chem*. 2011 Oct 28;286(43):37483–95.

- Zhang X**, Novera W, Zhang Y, Deng L-W. MLL5 (KMT2E): structure, function, and clinical relevance. *Cell Mol Life Sci.* 2017b Jul 1;74(13):2333–44.
- Zhang Y**, Guo L, Li Y, Feng G-H, Teng F, Li W, et al. MicroRNA-494 promotes cancer progression and targets adenomatous polyposis coli in colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2018a Jan 5;17(1):1.
- Zhang Y**, Lin C, Liao G, Liu S, Ding J, Tang F, et al. MicroRNA-506 suppresses tumor proliferation and metastasis in colon cancer by directly targeting the oncogene EZH2. *Oncotarget.* 2015 Oct 3;6(32):32586–601.
- Zhang Y**, Qu Y, Niu T, Wang H, Liu K. O-GlcNAc modification of Sp1 mediates hyperglycaemia-induced ICAM-1 up-regulation in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017c Feb 26;484(1):79–84.
- Zhang Y**, Wu J, Huang G, Xu S. Clinicopathological significance of DAPK promoter methylation in non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Manag Res.* 2018b Dec 12;10:6897–904.
- Zhang Z**, Tan EP, VandenHull NJ, Peterson KR, Slawson C. O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis. *Front Endocrinol.* 2014b;5.
- Zhao J**, Sun BK, Erwin JA, Song J-J, Lee JT. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X-chromosome. *Science.* 2008 Oct 31;322(5902):750–6.
- Zhao XD**, Han X, Chew JL, Liu J, Chiu KP, Choo A, et al. Whole-genome mapping of histone H3 Lys4 and 27 trimethylations reveals distinct genomic compartments in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007 Sep 13;1(3):286–98.
- Zhao Z**, Fan X, Yang L, Song J, Fang S, Tu J, et al. The identification of a common different gene expression signature in patients with colorectal cancer. *Math Biosci Eng.* 2019;16(4):17.
- Zheng J**, Zhao M, Li J, Lou G, Yuan Y, Bu S, et al. Obesity-associated digestive cancers: A review of mechanisms and interventions. *Tumor Biol.* 2017 Mar 1;39(3):1010428317695020.
- Zheng W**, Li H, Zhang H, Zhang C, Zhu Z, Liang H, et al. Long noncoding RNA RHPN1-AS1 promotes colorectal cancer progression via targeting miR-7-5p/OGT axis. *Cancer Cell Int.* 2020 Feb 18;20.
- Zhu G**, Qian M, Lu L, Chen Y, Zhang X, Wu Q, et al. O -GlcNAcylation of YY1 stimulates tumorigenesis in colorectal cancer cells by targeting SLC22A15 and AANAT. *Carcinogenesis.* 2019 Jan 30.
- Zhu G**, Tao T, Zhang D, Liu X, Qiu H, Han L, et al. O-GlcNAcylation of histone deacetylases 1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer progression. *Glycobiology.* 2016a;26(8):820–33.
- Zhu Y**, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, et al. Dependence receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *J Clin Invest.* 2013 Jul 1;123(7):2935–47.

- Zhu Y**, Liu T-W, Madden Z, Yuzwa SA, Murray K, Cecioni S, et al. Post-translational O-GlcNAcylation is essential for nuclear pore integrity and maintenance of the pore selectivity filter. *J Mol Cell Biol.* 2016b Feb;8(1):2-16.
- Zhu Y**, Yu M, Chen Y, Wang Y, Wang J, Yang C, et al. DNA damage-inducible gene, UNC5A, functions as a tumor-suppressor in bladder cancer. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2014a Jul;35(7):6887-91.
- Zhu Y**, Yu M, Chen Y, Wang Y, Wang J, Yang C, et al. Down-regulation of UNC5D in bladder cancer: UNC5D as a possible mediator of cisplatin induced apoptosis in bladder cancer cells. *J Urol.* 2014c Aug;192(2):575-82.
- Zou L**, Zhu-Mauldin X, Marchase RB, Paterson AJ, Liu J, Yang Q, et al. Glucose deprivation-induced increase in protein O-GlcNAcylation in cardiomyocytes is calcium-dependent. *J Biol Chem.* 2012 Oct 5;287(41):34419-31.