

Université de Lille - Faculté des Sciences et Technologies

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 446)

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Présentée publiquement le 21 Octobre 2020 par

Ninon VERY

En vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

O-GlcNAcylation de la Thymidylate Synthase : un mécanisme de sensibilisation au 5-fluorouracile dans le cancer colorectal

- Présidente du jury** : Dr. **Isabelle VAN SEUNINGEN**
INSERM UMR-S1277/CNRS UMR9020, CANTHER, Lille
- Rapporteurs** : Dr. **Tarik ISSAD**
INSERM U1016/CNRS UMR8104, Institut Cochin, Paris
Dr. **Philippe POURQUIER**
INSERM U1194, IRCM, Montpellier
- Examineurs** : Dr. **Caroline CIENIEWSKI-BERNARD**
EA7369, URePSSS, Lille
Pr. **Antoine GALMICHE**
UPJV, CHU, Amiens
- Directeur de thèse** : Pr. **Ikram EL YAZIDI-BELKOURA**
CNRS UMR8576, UGSF, Lille

« *Heads on a science apart* »

Coldplay - The Scientist

A la mémoire de mon grand-père,

A Olivia,

Remerciements

Je tiens à remercier l'**Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle**, dirigée par le Pr. Christophe D'HULST puis par le Dr. Yann GUERARDEL, de m'avoir accueillie durant toutes ces années. Il est vraiment agréable d'y travailler et d'y côtoyer des personnes chaleureuses au quotidien.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse sans qui elle ne pourrait avoir lieu. Je remercie le **Dr. Tarik ISSAD** et le **Dr. Philippe POURQUIER** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit et au **Dr. Isabelle VAN SEUNINGEN**, au **Dr. Caroline CIENIEWSKI-BERNARD** et au **Pr. Antoine GALMICHE** d'avoir accepté d'examiner mes travaux. Je remercie tout particulièrement le Dr. Tarik ISSAD pour sa bienveillance et les précieux conseils donnés lors de mes différents comités de suivi individuel ainsi qu'à notre séjour à Mexico.

Je tiens à adresser toute ma gratitude à ma directrice de thèse, le **Pr. Ikram EL YAZIDI-BELKOURA**. Je vous remercie d'avoir accepté de m'encadrer durant ces cinq années lors de mes différents stages ; de la Licence au Doctorat. Je n'avais jamais eu l'opportunité de vous avoir comme enseignante au cours de mon cursus mais nous avons appris à nous connaître et à partager cette passion commune autour de la *O*-GlcNAc et du cancer. Je me suis tout de suite sentie à l'aise auprès de vous et je vous remercie d'avoir toujours été présente pour m'enseigner, me conseiller et me soutenir et ce, tant sur le plan professionnel que personnel. Vous êtes une personne toujours à l'écoute qui prône le dialogue et qui tient compte des avis autour de vous. La bienveillance et la confiance que vous m'avez apportées m'ont incité à prendre des initiatives. Celles-ci ont fait grandir mon autonomie et ma réflexion et m'ont réellement permises de m'approprier mon sujet de thèse. Je vous remercie d'avoir toujours considéré qu'il s'agissait de « notre » sujet et d'avoir eu envie de le mener ensemble jusqu'au bout ; j'ai apprécié les nombreuses fois où nous avons travaillé et échangé ensemble à la pailasse. Je vous remercie d'avoir toujours été soucieuse de mon avenir et de m'avoir encouragé à donner des enseignements et à participer à différents congrès nationaux et internationaux. Ces derniers ont été d'une immense richesse aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain avec la rencontre de personnes et la découverte de paysages incroyables. Enfin et non des moindres, je vous remercie de m'avoir soutenue et d'avoir été sincèrement heureuse pour moi lorsque je suis devenue maman au milieu de cette thèse. Vous avez considéré qu'il était également important d'être épanouie personnellement et m'avez conseillée dans cette nouvelle étape de vie. Je vous remercie d'avoir partagé quelques moments simples et privilégiés avec Olivia comme à la sortie de sa crèche.

Je remercie vivement le **Pr. Tony LEFEBVRE** de m'avoir accueillie dans son équipe. Vous êtes un enseignant et un directeur d'équipe incroyable. Merci de m'avoir soutenue tout au long de mon

parcours et de m'avoir tant appris sur la *O*-GlcNAc et, plus largement, sur la biochimie. Je vous remercie pour toutes les réponses apportées à mes interrogations et à la relecture de tous les manuscrits rédigés depuis mon arrivée, et plus particulièrement de celui-ci. Je vous remercie de m'avoir souri ou fait un clin d'œil dans certains moments importants, ces petits gestes m'ont rassuré et donné confiance en moi lorsque j'en avais besoin. Vous êtes quelqu'un de toujours positif et vous savez rendre cette énergie communicative autour de vous. Il en résulte une bonne humeur quotidienne dans l'équipe et une envie de venir travailler chaque matin. Comme Ikram, je vous remercie de votre ouverture d'esprit, de votre bienveillance et de la joie que vous avez eue lorsque je vous ai annoncé que j'allais devenir maman. Je pense sincèrement avoir eu beaucoup de chance d'avoir pu grandir et m'épanouir dans cette équipe ; il sera très dur d'en partir.

Je remercie évidemment tous les membres de l'équipe, partis ou actuels, qui ont contribué à rendre ce quotidien agréable. **Annick**, je te remercie pour l'ensemble des choses que j'ai pu apprendre en t'ayant comme enseignante mais également lors de nos échanges en réunion ou autour de la table le midi. Je te souhaite une merveilleuse retraite. **Anne-Sophie**, merci de ta disponibilité et pour tous les conseils avisés que tu m'as donnés. J'ai réellement apprécié découvrir le Mexique à tes côtés et j'en garde de superbes souvenirs. **Stéphan**, je te remercie pour ton aide et pour toutes les explications données sur les différentes techniques que tu as su ramener des Etats-Unis. Merci également pour les relectures de mes rédactions en anglais. Je te félicite encore pour ton poste de maître de conférences au sein de l'équipe (grâce à toi, Tony n'est plus entouré que de femmes dans son bureau) et te souhaite du bonheur dans tes projets à venir. **Marlène**, merci d'apporter cette bonne humeur quotidienne dans le bureau mais aussi pour ta spontanéité. Tu es la « bonne fée » de cette équipe qui serait sûrement perdue sans toi. **Céline**, je te remercie pour l'aide apportée au cours de cette thèse, de la microscopie à la radioactivité. Tu es une personne consciencieuse sur qui on peut compter les yeux fermés, et avec un grand sourire, c'est toujours agréable. **Sadia**, merci pour ta gentillesse et ton écoute. Tu seras la prochaine à t'essayer à l'exercice mais je suis persuadée qu'avec ton caractère calme, réfléchi et travailleur tu y arriveras haut la main ! **Quentin**, après avoir passé une partie de notre cursus ensemble, nous nous sommes de nouveau retrouvés dans cette équipe qui t'a très vite intégré. Je te souhaite un travail fructueux et n'ai pas de doute sur le fait que tu attraperas, toi aussi, le virus « *O*-GlcNAc ». **Awatef**, je te souhaite également la bienvenue dans l'équipe et beaucoup de réussite pour ta thèse. **Agata** et **Maïté**, même si vous êtes parties pour de nouvelles aventures à l'autre bout du monde, je tiens à vous remercier pour toutes les discussions agréables que nous avons pu avoir et l'atmosphère chaleureuse que vous avez créée dans le bureau. **Moyira**, ton rire résonne encore et je peux affirmer que tu nous manques à tous. Tu es la joie de vivre et la gentillesse incarnées, et ça a été un vrai plaisir de t'avoir à mes côtés et de pouvoir me confier à toi à tout moment. Je te souhaite de t'épanouir totalement à Grasse avec Germain et j'espère que tu continueras à nous rendre visite à Lille. J'espère n'oublier personne et vous remercie **tous** pour l'ensemble des moments passés, dans le cadre du

travail mais pas seulement... Je retiendrai les cafés autour de la table (sans café), les jeudis bières (petits « prétextes » pour ne pas aller en réunion) qui s'éternisent, les blagues presque toujours drôles de Tony, les différents pots, les repas et cadeaux de Noël échangés, les barbecues estivaux, le mariage de Quentin et Alissa ou encore les voyages à l'étranger... Merci à tous les doctorants de l'unité avec qui j'ai pu partager certains de ces moments et autres soirées détentes autour d'un verre : **Anne-Sophie, Angéline, Marine, Elodie, Lin, Clémence, Sumeyye, Justine, Mathieu, Théo, James, Mattis, Charles, Maxence, ...** Merci à **Agnès, Fabrice et Mathieu** qui contribuent à la bonne ambiance et à l'entraide au 1^{ère} étage. Merci également à **Elisabeth et Nao** qui sont souvent descendues du 2^{ème} étage pour partager un petit moment avec nous le midi. Je remercie aussi les enseignants avec qui j'ai travaillé en TD/TP, qui m'ont fait confiance et qui m'ont beaucoup appris : **Florence, Sandrine, Marie-Ange, Céline, Jérôme, Isabelle, Agnès, Cécile, Sophie, Robert, Renaud et Xavier**. Enfin, je remercie toute l'équipe administrative et plus particulièrement **Laurence et Audrey** qui ont toujours été disponibles pour m'aider dans mes démarches.

Un immense merci à **Julien Thévenet et Madjid Djouina** pour leur aide, plus que précieuse, tout au long de l'expérimentation animale. Un grand merci à **Vanessa** qui, en plus de participer à l'ambiance familiale du C9, a participé à l'élaboration et à la manipulation dans cette expérience. **Amélie**, merci d'avoir été mon binôme de travail au cours de cette « longue » aventure. Le fait de travailler ensemble a été un vrai plaisir et m'a permis de ne pas baisser les bras plus d'une fois. Nous avons finalement réussi ! Je te souhaite beaucoup de succès dans un futur proche (bientôt la thèse) mais aussi pour la suite !

Je remercie également **Edgar, Reyna et Humberto** qui m'ont accueillie à bras ouverts chez eux, au Mexique, et qui m'ont fait découvrir des paysages, des monuments et une culture magnifiques. Merci pour votre gentillesse et pour toutes les jolies attentions que vous m'avez faites. Et comme vous le dites si bien : « *Para todo mal : mezcal. Y para todo bien, también !* ».

Cette thèse a également été permise grâce à la présence et au soutien de **mes amis**. Je remercie bien évidemment mes copines d'amour qui sont là depuis le début. Notre amitié est née il y a cinq ans au début de mon M2 et, depuis, vous égayez mon quotidien. **Steffi**, malgré que nous ayons des caractères totalement différents, nous nous sommes très vite rapprochées. Tu es une personne pleine d'entrain qui a une envie constante de vivre et partager de bons moments. Tu as également su être spontanément présente et d'un soutien sans faille quand j'en avais besoin, et je t'en remercie. Tu comptes beaucoup pour moi. **Jeanne**, tu es un rayon de soleil qui as toujours le sourire aux lèvres et qui est d'une gentillesse absolue. Il suffit d'être avec toi pour se sentir bien. **Alex**, avec ta sincérité et ta franchise, il est facile de parler et de me confier à toi. Ton regard m'a parfois permis de me remettre en question et ce fut important pour moi. Merci les filles pour tous les moments passés ensemble, et ils sont nombreux : nos mercredis panés pâtes à regarder (enfin « commenter » discrètement) les Grey's

ou à refaire le monde autour d'un verre, les apéros à la citadelle, les vendredis soirs à danser jusqu'au bout de la nuit, les karaokés, les cours de Zumba et de step, les après-midis Loto, le traditionnel repas de Noël avec **Karine**, les week-ends entre filles,... Merci aussi pour tous les autres instants où vous étiez simplement là pour écouter, parler, conseiller, rire ou pleurer... L'amitié est faite de toutes ces choses et il faut les préserver au mieux... Steffi, je ne pourrais parler de toi sans évoquer tous les moments passés à quatre avec **Clément**, des épisodes de GOT à Top Chef (sans presque s'endormir), aux nombreuses journées jeux qui commençaient le matin par un petit pain à la boulangerie et qui se terminaient le soir à la friagerie, à nos séjours à l'étranger... Une petite **Lucie** fait maintenant partie de votre famille et c'est un réel bonheur de la voir grandir depuis sa naissance et d'observer sa grande complicité avec Olivia. Merci de me permettre de faire partie de sa vie. Enfin, je remercie aussi **Dany** et **Jean-Pierre** ainsi qu'**Isabelle** et **Dominique** qui nous ont accueilli chez eux à de nombreuses occasions et nous ont permis de passer d'incroyables moments avec beaucoup de fous rires. J'en garde des souvenirs mémorables. Je remercie **Anne**, **Lucas** et **Kévin** qui, malgré le fait que l'on ait chacun choisi des domaines de spécialité très différents, sont toujours présents depuis notre rencontre en Licence.

Ma famille a également été toujours présente à mes côtés et je leur en remercie du fond du cœur. Notre famille est toute petite et quelques centaines de kilomètres nous séparent mais les liens sont d'autant plus forts. Ce sont des moments de déconnexion où l'on profite seulement d'être ensemble. **Mamie**, j'aime ces moments simples où l'on prend le temps de se parler (et d'échanger les quelques ragots du jour). Olivia a énormément de chance de pouvoir grandir avec son arrière-grand-mère et je me fais toujours une joie de vous voir réunies. **Tata** et **tonton**, vous êtes des personnes formidables individuellement mais représentez également un couple model à mes yeux. **Kévin** et **Florian**, nous avons grandi ensemble et fabriqués un tas de beaux souvenirs autour des repas d'anniversaire et de Noël. **Pharell** et **Naël**, vous avez agrandi la famille et êtes devenus de merveilleux petits garçons. Je me hâte déjà de vous revoir. **Marine**, malgré que nous soyons des sœurs un peu comme chat et chien depuis toutes petites, nous savons que nous pourrons toujours compter l'une sur l'autre. Merci d'être présente pour moi en ce moment et d'être une marraine en or pour Olivia. **Papa** et **Maman**, sans vous, je ne serai pas là. Merci de l'amour que vous me portez et de votre envie de me voir épanouie chaque jour. Merci pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises et que j'essaie de transmettre à mon tour. Si je réalise aujourd'hui cette thèse, c'est que vous avez toujours cru en moi et encouragé à faire les études que j'aime, quel qu'en soit le prix. Merci pour tout cela et bien plus encore. **Bryan**, cela fait maintenant douze années que tu es présent à mes côtés dans les bons comme dans les mauvais moments. Ton soutien indéfectible m'a sans cesse rassuré et permis d'avancer pour devenir ce que je suis aujourd'hui. Je te remercie pour toutes ces fois où tu m'as épaulé et dit de ne rien lâcher mais aussi à celles où tu m'as encouragé à souffler et à prendre du temps pour moi. Le plus bel accomplissement de ma vie restera celui d'être devenue maman et je te remercie de m'avoir permis de l'être. Tu es un papa fabuleux. **Olivia**, tu es une magnifique petite fille, pleine de vie, qui a apporté

tant de joie depuis ta naissance. Tu es un rayon de soleil au quotidien. Un simple câlin ou un éclat de rire nous fait oublier toutes les peines du monde. Tu grandis (trop) vite mais te voir évoluer chaque jour est un vrai bonheur. Je t'aime tellement « fort, fort, fort d'amour ». Enfin, j'ai une énorme pensée pour toi, **Papy**. Tu as toujours cru en moi et je suis sûre que tu serais fier de moi aujourd'hui. Je me sens chanceuse d'avoir pu partager de superbes moments avec toi avant que tu ne partes. Je me souviendrai toujours du sourire aux lèvres que tu avais quand tu prenais ton arrière-petite-fille dans les bras. Tu étais friand de cancoillotte et j'aime me dire qu'Olivia partage désormais ça avec toi.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	8
Avant-propos	13
Résumé.....	15
Abstract	16
Abréviations.....	17
Table des illustrations.....	24
I. GENERALITES	26
Chapitre 1 : Le Cancer ColoRectal (CCR).....	28
1. Epidémiologie et statistiques.....	28
1.1. Incidence et mortalité.....	28
1.1. Etiologie	28
1.1.1. Facteurs génétiques	28
1.1.2. Facteurs environnementaux	28
2. Processus de cancérisation du Côlon-Rectum (CR).....	30
2.1. Evolution histopathologique	30
2.1.1. Architecture macroscopique et fonctions physiologiques	30
2.1.2. Architecture microscopique de l'épithélium muqueux.....	32
2.1.3. Tumeurs épithéliales de la muqueuse du CCR et modèles d'initiation et de la progression du CCR	32
2.2. Séquence de transformation adénome-carcinome de Fearon et Vogelstein.....	36
2.2.1. Voie de signalisation Wnt	36
2.2.2. Voies de signalisation du récepteur aux facteurs de croissance Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) et du Transforming Growth Factor β (TGF- β).....	36
2.2.3. Voie de signalisation de la protéine de 53 kilodaltons (p53).....	40
2.3. Instabilité génétique du CCR	41
2.3.1. Généralités et inactivation du système MisMatch Repair (MMR)	41
2.3.2. Méthylation des îlots de Cytidine-phosphate-Guanosine (CpG).....	43
2.3.3. Autres polymorphismes nucléotidiques	43
3. Classifications cliniques et traitements	43
3.1. Classifications cliniques.....	43
3.2. Traitements.....	44
3.2.1. Chimiothérapie à base de 5-FluoroUracile (5-FU)/LeucoVorine (LV)	46
3.2.2. Autres chimiothérapies	46
3.2.3. Thérapies ciblées.....	48
Chapitre 2 : Le 5-FluoroUracile (5-FU).....	52
1. Pharmacologie	52
1.1. Intérêt médical et structure	52
1.2. Pharmacocinétique et toxicités	52
1.2.1. Pharmacocinétique et distribution tissulaire	52
1.2.2. Toxicités.....	54
2. Métabolisme	54
2.1. Anabolisme	54
2.2. Dommages aux acides nucléiques	55
2.3. Inhibition de la synthèse <i>de novo</i> du désoxyThymidine TriPhosphate (dTTP)	55
2.3.1. Synthèse <i>de novo</i> du dTTP par la Thymidylate Synthase (TS).....	56
2.3.2. Dommages à l'ADN induits par l'inhibition de la TS par le FluorodésoxyUridine Monophosphate (FdUMP)	56
2.4. Catabolisme	57
3. Effets cytotoxiques	57
3.1. Arrêt du cycle cellulaire	57
3.1.1. Inactivation des Checkpoint Kinase (CHK).....	57

3.1.2.	Activation de p53	58
3.2.	Apoptose.....	58
3.2.1.	Voie apoptotique extrinsèque	60
3.2.2.	Voie apoptotique intrinsèque	64
Chapitre 3 : Mécanismes de résistance au 5-fluorouracile dans le cancer colorectal		68
1.	Inactivation du 5-FU.....	68
1.1.	Activation du catabolisme du 5-FU	68
1.1.1.	Rôle des transporteurs Adenosine triphosphate-Binding Cassette (ABC)	68
1.1.2.	Résistance et toxicité liées à l'activation de la DihydroPyrimidine Déshydrogénase (DPD).....	70
1.2.	Inhibition de l'anabolisme du 5-FU	71
1.2.1.	Rôle des transporteurs SoLute Carrier (SLC)	71
1.2.2.	Inhibition de la Thymidine Phosphorylase (TP) et rôle pro-angiogénique.....	71
1.2.3.	Inhibition de l'Orotate PhosphoRibosylTransférase (OPRT).....	72
2.	Altération de la séquestration de la TS.....	73
2.1.	Activation de la MéthylèneTétraHydroFolate Réductase (MTHFR)	73
2.2.	Activation de la TS	73
3.	Inhibition de l'effet cytotoxique du 5-FU.....	74
3.1.	Perturbation du cycle cellulaire	74
3.1.1.	Inhibition des complexes cycline/Cyclin-Dependent Kinase (CDK)	74
3.1.2.	Acquisition du phénotype de Cellule Souche Cancéreuse (CSC)	75
3.2.	Inactivation de la reconnaissance des dommages à l'ADN	78
3.2.1.	Inactivation du système MMR et activation des micro-ARN (miR).....	78
3.2.2.	Activation du système Base Excision Repair (BER)	79
3.3.	Inactivation de l'apoptose	81
3.3.1.	Inactivation de p53	81
3.3.2.	Régulation des membres de la famille B-cell lymphoma-2 (Bcl-2).....	82
3.3.3.	Régulation du stress oxydant	82
Chapitre 4 : La Thymidylate Synthase (TS)		86
1.	Caractéristiques générales de la TS	86
1.1.	Gène <i>ThYMIdylate Synthase (TYMS)</i>	86
1.2.	Structure	86
1.3.	Activité enzymatique	89
1.4.	Phylogénie	89
2.	Régulation de la TS.....	91
2.1.	Régulation physiologique de la TS au cours du cycle cellulaire.....	91
2.1.1.	Régulation transcriptionnelle.....	91
2.1.2.	Régulation traductionnelle	94
2.1.3.	Régulation post-traductionnelle	94
2.1.3.1.	Localisation subcellulaire.....	94
2.1.3.2.	Conformation tridimensionnelle	94
2.1.3.3.	Dégradation protéasomale	95
2.1.3.4.	Modification Co- et Post-Traductionnelles (MCT et MPT).....	95
2.2.	Régulation de la TS dans le CCR et modulation de la réponse au 5-FU	101
2.2.1.	Régulation génique et polymorphismes	101
2.2.2.	Régulation transcriptionnelle.....	104
2.2.3.	Régulation post-traductionnelle	106
2.2.3.1.	Localisation subcellulaire.....	106
2.2.3.2.	Conformation tridimensionnelle et dégradation protéasomale.....	107
2.2.3.3.	MPT de la TS et sensibilité au 5-FU.....	107
2.2.4.	<i>O-N-AcétylGlucosaminylation (O-GlcNAcylation) de la TS</i>	108
Chapitre 5 : La <i>O-N-AcétylGlucosaminylation (O-GlcNAcylation)</i>		110
1.	Généralités sur la glycosylation des protéines.....	110
2.	Historique et caractéristiques générales de la <i>O-GlcNAcylation</i>	110
2.1.	Découverte.....	110

2.2.	Caractéristiques générales	112
2.2.1.	<i>O</i> -GlcNAcylation : <i>O</i> -glycosylation intracellulaire, simple et dynamique	112
2.2.2.	Site consensus de <i>O</i> -GlcNAcylation	112
2.2.3.	Phylogénie	113
2.2.4.	MPT ubiquitaire et essentielle	113
2.2.5.	<i>O</i> -GlcNAcylation extracellulaire	114
3.	Les enzymes de la <i>O</i> -GlcNAcylation.....	114
3.1.	OGT.....	114
3.1.1.	Séquence du gène <i>OGT</i>	114
3.1.2.	Structure protéique de l'OGT	115
3.1.3.	Activités enzymatiques de l'OGT.....	117
3.1.4.	Régulation de l'OGT.....	119
3.1.4.1.	Génique.....	119
3.1.4.2.	Transcriptionnelle	123
3.1.4.3.	Post-traductionnelle	125
3.1.4.3.1.	Régulation par la biodisponibilité en substrat	125
3.1.4.3.2.	Régulation par les interactions protéiques.....	125
3.1.4.3.3.	Régulation par les MPT	128
3.2.	β - <i>O</i> -linked N-AcetylGlucosaminidase (OGA)	132
3.2.1.	Séquence du gène <i>MeninGlioma Expressed Antigen 5 (MGEA5)</i>	134
3.2.2.	Structure et activités enzymatiques	134
3.2.3.	Régulation de l'OGA	136
3.2.3.1.	Régulation génique	136
3.2.3.2.	Régulation transcriptionnelle	136
3.2.3.3.	Régulation post-traductionnelle	138
3.2.3.3.1.	Par clivage protéolytique.....	138
3.2.3.3.2.	Par les interactions protéiques	138
3.2.3.3.3.	Par les MPT	138
4.	La voie de biosynthèse des hexosamines (Hexosamine Biosynthetic Pathway, HBP)	138
4.1.	Généralités.....	138
4.2.	Régulation de la voie HBP	140
4.2.1.	Par le flux en substrats	140
4.2.2.	Par les enzymes de la voie HBP	140
5.	Méthodes d'étude des protéines <i>O</i> -GlcNAcylées.....	142
5.1.	Régulation du niveau de <i>O</i> -GlcNAcylation globale.....	142
5.1.1.	Inhibiteurs de l'OGT	143
5.1.1.1.	Composés naturels.....	143
5.1.1.2.	Alloxane	143
5.1.1.3.	Mimétiques de l'Uridine DiPhosphate (UDP)-GlcNAc.....	143
5.1.1.4.	Petites molécules inhibitrices	144
5.1.2.	Inhibiteurs de l'OGA	146
5.1.2.1.	PUGNAc.....	146
5.1.2.2.	STreptoZotocine (STZ)	146
5.1.2.3.	Inhibiteurs thiazolines.....	148
5.1.2.4.	GlcNAcstatines.....	148
5.1.3.	Inhibiteurs de la Glutamine : Fructose-6-phosphate AmidoTransférase (GFAT).....	150
5.2.	Enrichissement, détection et identification des protéines <i>O</i> -GlcNAcylées	150
5.2.1.	Anticorps	150
5.2.2.	Lectines.....	151
5.2.3.	Chimie-click.....	153
5.2.4.	Algorithmes de prédiction des sites <i>O</i> -GlcNAcylés	153
5.2.5.	Spectrométrie de masse	154
6.	Régulation des propriétés protéiques par <i>O</i> -GlcNAcylation	154
6.1.	Dialogue entre <i>O</i> -GlcNAcylation et phosphorylation	154
6.2.	Régulation des propriétés protéiques.....	157

6.2.1.	Interactions protéine-protéine.....	157
6.2.2.	Stabilité.....	159
6.2.3.	Localisation subcellulaire.....	162
6.2.4.	Activité enzymatique.....	162
7.	Régulation des mécanismes cellulaires fondamentaux par <i>O</i> -GlcNAcylation	166
7.1.	Transcription.....	166
7.2.	Traduction.....	172
7.3.	Dégradation protéasomale	172
7.4.	Trafic intracellulaire.....	173
7.5.	Signalisation	175
7.6.	Réponse au stress.....	179
7.7.	Apoptose.....	181
7.8.	Architecture cellulaire	183
7.9.	Cycle cellulaire.....	185
7.10.	Développement.....	188
8.	Dérégulation de la <i>O</i> -GlcNAcylation dans les pathologies	190
8.1.	Désordres métaboliques	191
8.2.	Maladies neurodégénératives	193
8.3.	Maladies cardiovasculaires	196
8.4.	Cancer.....	199
8.4.1.	Reprogrammation métabolique.....	199
8.4.2.	Augmentation de la biodisponibilité des substrats et dérégulations des GlycosylTransférases (GT).....	200
8.4.3.	Augmentation de l'OGT et de la <i>O</i> -GlcNAcylation globale des protéines.....	202
8.4.4.	Impact de la <i>O</i> -GlcNAcylation sur les propriétés biologiques des cellules cancéreuses.....	203
8.4.4.1.	Croissance	206
8.4.4.2.	Adhésion, migration et invasion	209
8.4.4.3.	Réponse aux thérapies anti-cancéreuses.....	211
8.4.4.3.1.	Voie AKT/B-box-Binding Protein 1 (XBP1) et agents chimiothérapeutiques	211
8.4.4.3.2.	Tamoxifène	212
8.4.4.3.3.	Thérapie TRAIL	212
8.4.4.3.4.	Cisplatine (Cis-DiamineDichloroPlatinum(II), CDDP).....	214
8.4.4.3.5.	BorTézomib (BTZ).....	215
8.4.5.	Impact de la <i>O</i> -GlcNAcylation sur la réponse au 5-FU.....	216
8.4.5.1.	Impact de la <i>O</i> -GlcNAcylation sur la glycosylation complexe.....	218
8.4.5.2.	Impact de la <i>O</i> -GlcNAcylation sur la réparation des dommages à l'ADN	219
8.4.5.3.	Impact de la <i>O</i> -GlcNAcylation sur le phénotype CSC et la réponse au 5-FU.....	219
8.4.5.4.	Impact de la <i>O</i> -GlcNAcylation sur l'apoptose et la réponse au 5-FU	221
8.4.5.5.	Impact de la <i>O</i> -GlcNAcylation sur la voie du 5-FU	221
II.	PROJET DE THESE	224
	Partie I : Rôle de la <i>O</i> -GlcNAcylation sur la Thymidylate Synthase et la réponse du cancer colorectal au 5-fluorouracile.....	226
1.	Contexte de l'étude.....	226
2.	Résultats.....	227
2.1.	La <i>O</i> -GlcNAcylation sensibilise à l'effet cytotoxique du 5-FU <i>in vivo</i>	227
2.2.	Le 5-FU diminue la <i>O</i> -GlcNAcylation cellulaire <i>in vitro</i>	231
2.3.	La <i>O</i> -GlcNAcylation impacte la TS et la réponse au 5-FU.....	234
2.3.1.	L'invalidation de l'OGT diminue la sensibilité des cellules cancéreuses au 5-FU par diminution du taux de TS	234
2.3.2.	La TS est modifiée et régulée par <i>O</i> -GlcNAcylation	237
2.3.3.	La <i>O</i> -GlcNAcylation stabilise la TS en la protégeant de la dégradation protéasomale	241
3.	Discussion.....	244

III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	249
Publication soumise	253
Revue N°1	289
IV. ANNEXES	314
Partie II : Régulation croisée entre la <i>O</i>-GlcNAcylation et la voie de signalisation Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K)/AKT/mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) dans les maladies chroniques	316
1. Contexte de l'étude.....	316
2. Hypothèse de travail et objectifs	317
3. Résultats.....	317
3.1. Stimulation de la <i>O</i> -GlcNAcylation et de la signalisation mTOR au cours de la dérégulation du métabolisme.....	317
3.2. Augmentation des niveaux de l'OGT et de la <i>O</i> -GlcNAcylation globale après activation de mTOR dans le CCR.....	317
3.3. Activation de la signalisation mTOR par la <i>O</i> -GlcNAcylation dans le CCR	318
4. Discussion	318
5. Conclusion et perspectives.....	320
Publication N°1	321
Revue N°2	333
V. BIBLIOGRAPHIE.....	345

Avant-propos

Cette thèse de doctorat a été effectuée sous la direction du **Pr. Ikram EL YAZIDI-BELKOURA** au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), Faculté des Sciences et Technologies, Université de Lille, à Villeneuve d'Ascq dans l'équipe « O-GlcNAcylation, signalisation cellulaire et cycle cellulaire » dirigée par le **Pr. Tony LEFEBVRE**. Elle a été financée par le Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR) et a fait l'objet de publications et de communications orales et par affiche présentées ci-dessous :

Publications

Very N, Hardivillé S, Decourcelle A, Thévenet J, Djouina M, Page A, Schulz C, Vergoten G, Julie Kerr-Conte, Lefebvre T, Dehennaut V, El Yazidi-Belkoura I. (2021). O-GlcNAcylation of Thymidylate Synthase: a 5-FU sensitization mechanism in colorectal cancer. *Molecular Cancer* (**en soumission**).

Decourcelle A, **Very N**, Loisoïn I, Djouina M, Thévenet J, Body-Malapel M, Lelièvre E, Coqueret O, Leprince D, El Yazidi-Belkoura I, Dehennaut V. (2020). O-GlcNAcylation links nutrition to the epigenetic downregulation of *UNC5A* during colon carcinogenesis. *Cancers*. 12 (11): 3168.

Very N, Vercoutter-Edouart AS, Lefebvre T, Hardivillé S, El Yazidi-Belkoura I. (2018). Cross-Dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR Axis in Human Chronic Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 9: 602.

Very N, Steenackers A, Dubuquoy C, Vermuse J, Dubuquoy L, Lefebvre T, El Yazidi-Belkoura I. (2018). Cross regulation between mTOR signaling and O-GlcNAcylation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 50 (3): 213-222.

Very N, Lefebvre T, El Yazidi-Belkoura I. Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer (2017). *Oncotarget*. 9 (1): 1380-1402.

Communications orales

Very N, Hardivillé S, Lefebvre T, El Yazidi-Belkoura I « *O*-GlcNAcylation of Thymidylate Synthase : a new highlighted regulatory mechanism mediating 5-Fluorouracil chemotherapy response in colorectal cancer ? » 30th Joint Glycobiology Meeting, Lille, **France**, 27-29 Octobre 2019.

Very N, Hardivillé S, Lefebvre T, El Yazidi-Belkoura I « *O*-GlcNAcylation of Thymidylate Synthase : a new highlighted regulatory mechanism mediating 5-Fluorouracil chemotherapy response in colorectal cancer ? » 5th Latin American Glycobiology meeting 2019, Mexico City, **Mexique**, 2-4 Octobre 2019.

Very N, Hardivillé S, Lefebvre T, El Yazidi-Belkoura I « *O*-GlcNAcylation of Thymidylate Synthase : a new highlighted regulatory mechanism mediating 5-Fluorouracil chemotherapy response in colorectal cancer ? » Colloque des doctorants - 18^{ème} journée André Verbert, Lille, **France**, 13 Septembre 2018.

Very N « Rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la résistance du cancer colorectal au 5-Fluorouracile » Journées scientifiques de l'UMR 8576, Villeneuve d'Ascq, **France**, 26 Janvier 2018.

Communications par affiche

Raab S, **Very N**, Baldini S, Hardivillé S, Mortuaire M, Schulz C, Vercoutter-Edouart AS, El Yazidi-Belkoura I, Lefebvre T « Connection of metabolic disorders to tumor emergence: regulation of fatty acid synthase by *O*-GlcNAcylation during cell proliferation » 30th Joint Glycobiology Meeting, Lille, **France**, 27-29 Octobre 2018.

Very N, Hardivillé S, Lefebvre T, El Yazidi-Belkoura I « *O*-GlcNAcylation of Thymidylate Synthase: a new regulatory mechanism of 5-Fluorouracil chemotherapy response in colorectal cancer? » Gordon Research Conference on Glycobiology – Biological Means to Build, Decipher and Interpret the Complexity of the Glycome, Barga, **Italie**, 10-15 Mars 2019.

Very N, Hardivillé S, Lefebvre T, El Yazidi-Belkoura I « *O*-GlcNAcylation of Thymidylate Synthase: a new regulatory mechanism of 5-Fluorouracil chemotherapy response in colorectal cancer? » 29th Joint Glycobiology Meeting, Gand, **Belgique**, 21-23 Octobre 2018.

Résumé

La *O*-GlcNAcylation (*O*-N-acétylglucosaminylation) est une MPT (modification post-traductionnelle) dynamique et réversible catalysée par un unique couple d'enzymes antagonistes : l'OGT (*O*-GlcNAc transférase) et l'OGA (*O*-GlcNAcase). Elle est considérée comme un véritable senseur nutritionnel et régule un grand nombre de mécanismes cellulaires fondamentaux. En ciblant des oncoprotéines et des suppresseurs de tumeur, sa dérégulation est associée à la cancérogenèse et la progression tumorale. En revanche, son rôle dans la réponse aux thérapies anti-cancéreuses est très peu étudié. Il a été néanmoins montré récemment que l'hyper-*O*-GlcNAcylation impacte la réponse de certains cancers à des drogues telles que le tamoxifène, le cisplatine, le bortézomib et le 5-FU (5-fluorouracile). Le 5-FU est la chimiothérapie de référence du CCR (cancer colorectal) et la TS (Thymidylate Synthase) sa cible principale. La surexpression de la TS est un biomarqueur de résistance au 5-FU utilisé en clinique. La TS a été montrée comme étant *O*-GlcNAcylée mais le rôle de cette MPT n'a pas été élucidé. Il nous est donc paru intéressant d'analyser le « *cross-talk* » entre *O*-GlcNAcylation et réponse au 5-FU dans le CCR dans l'hypothèse que la *O*-GlcNAcylation pourrait impacter la sensibilité au 5-FU en régulant sa cible TS.

Un modèle murin *in vivo* de CCR humains et des cellules coliques non cancéreuses et cancéreuses ont été utilisés pour analyser l'effet du 5-FU sur la *O*-GlcNAcylation globale des protéines et réciproquement l'impact de la *O*-GlcNAcylation sur le niveau et l'activité de la TS, et la réponse au 5-FU. Nos données *in vitro* corroborent nos résultats *in vivo* et soutiennent que le 5-FU diminue la *O*-GlcNAcylation globale et que, réciproquement, la *O*-GlcNAcylation augmente le niveau de TS et sensibilise le CCR au 5-FU. Nous avons déchiffré le mécanisme moléculaire sous-jacent mettant en lumière le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la stabilisation de la TS et sa protection contre la dégradation protéasomale. Deux sites de *O*-GlcNAcylation de la TS ont été identifiés : la Thr²⁵¹ à l'interface de dimérisation de l'enzyme et la Thr³⁰⁶ dans la séquence dégron carboxy-terminale connue pour contrôler sa dégradation.

Ensemble nos résultats proposent une nouvelle stratégie thérapeutique combinant le 5-FU à un inhibiteur de l'OGA afin d'améliorer la réponse du CCR à la chimiothérapie à base de 5-FU.

Mots clés : *O*-GlcNAcylation, OGT, Thymidylate Synthase, 5-fluorouracile, cancer colorectal, chimio-sensibilité.

Abstract

O-GlcNAcylation (*O*-N-acetylglucosamylation) is a dynamic and reversible PTM (post-translational modification) controlled by a couple of unique antagonist enzymes: OGT (*O*-GlcNAc transferase) and OGA (*O*-GlcNAcase). *O*-GlcNAcylation is considered as a nutritional sensor and regulates a plethora of fundamental cellular mechanisms. By targeting oncoproteins and tumor suppressors, dysregulation of *O*-GlcNAcylation is associated with carcinogenesis and tumor progression. However, its role in the anti-cancer therapy response has been poorly investigated. Recently, hyper-*O*-GlcNAcylation has been shown to impact the response of some cancers to drugs such as tamoxifen, cisplatin, bortezomib and 5-FU (5-fluorouracil). 5-FU is the CRC (colorectal cancer) gold standard chemotherapy and TS (Thymidylate synthase) is its main target. Overexpression of TS is a biomarker of 5-FU resistance already used clinically. TS has been shown to be *O*-GlcNAcyated but the role of this PTM has not been elucidated. We therefore analyzed the « *cross-talk* » between *O*-GlcNAcylation and 5-FU response based on the hypothesis that *O*-GlcNAcylation impacts the sensitivity to 5-FU by regulating TS.

In vivo mouse model of human CRC and colon non-cancerous and cancerous cells were used to analyze the effect of 5-FU on total *O*-GlcNAcylation and, reciprocally, the impact of *O*-GlcNAcylation on TS level/activity and 5-FU response. Our *in vitro* data corroborate our *in vivo* results and support that 5-FU decreases *O*-GlcNAcylation and, reciprocally, that *O*-GlcNAcylation increases TS level and sensitizes CRC to 5-FU. We deciphered the underlying molecular mechanism which highlights the role of *O*-GlcNAcylation towards TS stability and protection against proteasomal degradation. Two TS *O*-GlcNAcyated sites have been identified: at Thr²⁵¹ within the dimerization interface and at Thr³⁰⁶ within the carboxy-terminal degron sequence known to control TS degradation.

Together, our results propose a new therapeutic approach combining 5-FU-based therapy with an OGA inhibitor to improve the CRC drug response.

Keywords: *O*-GlcNAcylation, OGT, Thymidylate Synthase, 5-fluorouracil, colorectal cancer, chemosensitivity.

Abréviations

1,3-BPG : 1,3-BisPhosphoGlycérate
3-PG : 3-PhosphoGlycérate
4E-BP : eukaryotic translation initiation factor **4E-Binding Protein**
5'-dFCR : 5'-désoxy-5-FluoroCytidine
5'-dFUR : 5'-désoxy-5-FluoroUridine
5-FU : 5-FluoroUracile
5hmC : 5-hydroxymC
5mC : 5-méthylCytosine
α2FucT : α1,2-FucosylTransférase
α3FucT : α1,3-FucosylTransférase
α4FucT : α1,4-FucosylTransférase
β3GalT : β1,3-GalactosylTransférase
β3Gnt : β1,3-N-acétylGlucosaminylTransférase
β4GalT : β1,4-GalactosylTransférase
βTrCP : β-Transducin repeats-Containing Protein

A

AAL : *Agrocybe Aegerita* Lectin
ABC : ATP-Binding Cassette
Abi : c-Abelson murine leukemia viral oncogene
Ac₄-5S-GlcNAc : 1,3,4,6-tétra-O-acétyl-2-désoxy-5-Thio-GlcNAc
ACE : Antigène CarcinoEmbryonnaire
AceCS : *Acétyl-CoA Synthétase*
Acétyl-CoA : Acétyl-Coenzyme A

ACF : Aberrant Crypt Foci
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADP : Adénosine DiPhosphate
ADR : Acquired DOX-Resistance
AEG : *Astrocyte Elevated Gene*
AFLI : Ziv-AFLIbercept
AHL : Acyl Homosérine Lactone
AIF : Apoptosis-Inducing Factor

AJCC : American Joint Committee on Cancer
AK : Aurora Kinase
ALDH : Aldéhyde DésHydrogénase
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
AMP : Adénosine MonoPhosphate
AMPc : AMP cyclique
AMPK : AMP-activated protein Kinase
ANG : ANGIotensine
Aos : Activation of smt3p
AP : Activator Protein
AP : APurine/APyrimidine
APC : Adenomatous Polyposis Coli
APAF : *Apoptotic Peptidase Activating Factor*
APE : AP Endonucléase
APP : Amyloid Precursor Protein
ARF : Alternative Reading Frame protein
ARN : Acide RiboNucléique
AS160 : AKT Substrate of 160 kDa
ASH : Absent, Small or Homeotic discs
ASXL : Additional SeX combs Like
ATG : *AuTophagy-related Gene*
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine TriPhosphate
ATP : P-type ATPase Transporter
ATPase : ATP hydrolase
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related
Axin : Axis inhibition protein
Azasérine : O-(2-diazoacétyl)-L-sérine

B

Bad : Bcl-2 associated agonist of cell death
BADGP : Benzyl-2-Acétamido-2-Désoxy-α-D-GalactoPyranoside
Bak : Bcl-2 homologous antagonist killer
BAP : Breast cancer 1 Associated Protein

BAX : *BCL2-Associated X*
BBC : *BCL2 Binding Component*
Bcl : B-cell lymphoma
BCL2L : *BCL2-Like protein*
Bcl-x_L : B-cell lymphoma-extral Large
BECN : *BLC2-intEraCtiNg protein*
BEMAD : β-Elimination followed by Michael Addition of DTT
BER : Base Excision Repair
BEV : BEVacruzumab
Bid : BH3 interacting-domain death agonist
Bim : Bcl-2 interacting mediator of cell death
BIRC : *Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat-Containing protein*
BLM : *BLoom syndrome*
BMAL : Brain and Muscle Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-Like protein
BMI : B-cell-specific Moloney murine leukemia virus Insertion site
Bnip3L : Bcl-2 interacting protein 3-Like
BRAF : *V-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B*
BTAF : B-TFIID TATA-box-binding protein Associated Factor
BTZ : BorTÉZomib
BUP : Béta-UréidoPropionase
BZX : BenZoXazolinone

C

C1GalT : Core 1 β1,3-GalactosylTransférase
C2GnT : Core 2 β1,6-N-acétylGlucosaminylTransférase
C2GnT-M : C2GnT de type Mucine
C3GnT : Core 3 β1,3-N-acétylGlucosaminylTransférase
C4GnT : Core 4 N-acétylGlucosaminylTransférase
CA : Carbohydrate Antigen
CALM : *CALModuline*
CaMK : Calcium/CalM-dependent protein Kinase
CARM : Coactivator-associated Arginine Methyltransferase

CASP : *CASPase*
CAZY : Carbohydrate-Active enZyme
CBP : CREB Binding Protein
CCN : *CyCliN*
CCR : Cancer ColoRectal
CD : Catalytic Domain
CD : Cluster de Différenciation
CDA : Cytidine DésAminase
CDC : Cell Division Control protein
CDDP : *Cis-DiamineDichloroPlatinum(II)*
CDH : *CaDHérine*
CDK : Cyclin-Dependent Kinase
CDKN : *CDK INhibitor*
CE : CarboxylEstérase
CET : CETuximab
CFL : *CoFiLine*
CFLAR : *CASP8 and FADD-Like Apoptosis Regulator*
c-FLIP : cellular FLICE-Like Inhibitory Protein
ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation
CHK : CHeckpoint Kinase
CHOP : CCAAT/enhancer-binding protein HOmologous Protein
Chr : Chromosome
CI : Chromosomal Imbalance
CID : Collision Induced Dissociation
CIMP : CpG Island Methylator Phenotype
CIN : Chromosomal INstability
Cip : CDK-interaction protein
CK : Casein Kinase
CKI : Cyclin Kinase Inhibitor
CKK : CholécystoKinine
CLK : *CDC Like Kinase*
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMP : Cytidine MonoPhosphate
CMP-Neu5Ac : CMP-N-AcétylNeuramate
CoA : Coenzyme A
COMPASS : COMplex Proteins ASSociated with SET1
COSMIC : Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer
COX : Cyclo-Oxygénase
CpG : Cytidine-phosphate-Guanosine

CPT : CamPtoThécine
CREB : c-AMP Response Element-Binding protein
CRTC : CREB Regulated Transcription Coactivator
CS : Cellule Souche
CSAD : *Cysteine Sulfinic Acid Decarboxylase*
CSC : CS Cancéreuse
CSS : Colorectal cancer-Specific Survival
CTD : C-Ter Domain
CTNN : *CaTeNiN*
CTP : Circulary Permutated TRAIL
CTR : Copper TRansporter
CTS : *CaThesPine*
CYP : CYtochrome P450

D

D-box : Destruction box
DACH : 1,2-DiAminoCycloHexane
DCD : dCMP Désaminase
DcR : Decoy Receptor
DD : Death Domain
ddb : *DNA Damage-Binding protein*
DDX : DEAD-boX helicase
dFCR : désoxy-5-FluoroCytidine
DFE : DNA Fragmentation Factor
DFS : Disease-Free Survival
dFUR : désoxy-5-FluoroURidine
DHF : DiHydroFolate
DHFR : DHF Réductase
DHFU : 5,6-DiHydro-5-FluoroUracile
DHPase : DiHydroPyrimidinase
DIABLO : Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with LOw pl
DISC : Death-Indicing Signaling Complex
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMTF : *cyclin D binding Myb-like Transcription Factor*
dn : dominant négatif
DNA : DeoxyriboNucleic Acid
DNA-PK : DNA-dependent Protein Kinase
DON : 6-Diazo-5-OxoNorleucine
DOX : DOXorubicine

DPAK : *Death-Associated Protein Kinase*
DPD : DihydroPyrimidine Déshydrogénase
DPYD : *DihydroPYrimidine Déshydrogénase*
dR : désoxyRibose
DSB : Double-Strand Break
Dsh : Disheveled
DT : Diabète de Type
dT : Thymidine
dTDP : désoxyTDP
dTMP : désoxyTMP
DTT : DiThioThréitol
dTTP : désoxyTTP
DUB : DésUBiquitine
dUDP : désoxyUDP
dUMP : désoxyUMP
dUTP : désoxyUTP
dUTPase : dUTP hydrolase
DYT : DYsTonie

E

E-cadhérine : cadhérine Epithéliale
EB : *End-Binding protein*
ECD : Electron Capture Dissociation
EED : Embryonic Ectoderm Development
eEF : eukaryotic Elongation Factor
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : EGF Receptor
eIF : eukaryotic Initiation Factor
Elf : E74-like factor
Elk : Ets like
EndoG : Endonucléase G
ENO : ENOLase
eNOS : endothelial NO Synthase
ENOSF : *ENO SuperFamily*
ENT : Equilibrative Nucleoside Transporter
EOGT : EGF-domain specific OGT
EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule
ER : Estrogen Receptor
ERCC : Excision Repair Cross-Complementation
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
ESR : *EStrogen Receptor*

ETD : Electron Transfer
Dissociation
Ets : E26 transformation-
specific
EXO : *EXO*nucléase
EZH : Enhancer of Zeste
Homolog

F

FAC : FluoroACétate
FADD : Fas-Associated protein
with DD
FAK : Focal Adhesion Kinase
FAP : Fas-Associated
Phosphatase
FAS : Fatty Acid Synthase
FasL : Fas Ligand
FASLG : *FAS LiGand*
FBAL : α -Fluoro-Beta-Alanine
Fbw : F-box/wD repeat-
containing protein
FdUDP : 5-FluorodUDP
FdUMP : 5-FluorodUMP
FdUTP : 5-FluorodUTP
FDX : FerréDoXine
FDXR : FDX Réductase
FGF : *Fibroblast Growth Factor*
FGFR : FGF Receptor
FITC : Fluorescein
IsoThioCyanate
FNA : Facteur Natriurétique
Auriculaire
FOL : acide FOLinique
Fox : Forkhead box
Fru : Fructose
Frz : Frizzled
FUDP : 5-FluoroUDP
FUDr : FluoroUracile
désoxyRibose
FUMP : 5-FluoroUMP
FUPA : Fluoro- β -
UreidoPropionic Acid
FUrd : 5-FluoroUridine
FUTP : 5-FluoroUTP

G

G6Pase : *Glucose-6-
Phosphatase*
GAB : GRB2-Associated-Binding
protein
GADD45B : *Growth Arrest and
DNA Damage-Inducible β*
Gal : Galactose

GalNAc : N-
AcétylGalactosamine
GalNAz : N-
azidoAcétylGalactosamine
GalT : GalactosylTransférase
GAPDH : GlycérAldéhyde-3-
Phosphate DésHydrogénase
GAS : *GAS*trine
GCN : General Control
Nonderepressible
GCNT : *GluCosaminyI (N-Acétyl)
Transférase*
GDP : Guanosine DiPhosphate
GEF : Guanine Exchange Factor
GFAT : Glutamine :Fructose-6-
phosphate AmidoTransférase
GFPT : *Glutamine :Fructose-6-
Phosphate amidoTransférase*
GH : Glycoside Hydrolase
GIP : Gastric Inhibitory
Polypeptide
GK : GlucoKinase
Glc : Glucose
GlcNH₂ : Glucosamine
GlcNAc : N-Acétyl-D-
Glucosamine
GlcNAz : N-
azidoAcétylGlucosamine
GLI : GLIoma-associated
oncogene family zinc finger
GLUT : GLUcose Transporter
GNAT : GCN5 related family of
AcetylTransferase
GPNPAT : Glucosamine-6-
Phosphate N-AcétylTransférase
GnT : β 1,6-N-
acétylGlucosaminyITransférase
Goblin : OGT' bisubstrate-
linked inhibitor
GPC : pre-Glycoprotein
Polyprotein Complex
GPI :
GlycosylPhosphatidylInositol
GRB : Growth-factor-Receptor
Bound protein
GRK : G protein-coupled
Receptor Kinase
GRP : Glucose-Regulated
Protein
GS : *Glycogène Synthase*
GSH : Glutathion réduit
GSK : GS Kinase
GSL : *Griffonia Simplicifolia*
Lectin
GST : Glutathion S-Transférase

GT : GlycosylTransférase
GTP : Guanosine TriPhosphate
GTPase : GTP hydrolase

H

hA : hélice α Amphipathique
HAT : Histone
AcétylTransférase
HBP : Hexosamine Biosynthetic
Pathway
HCD : Higher-energy Collisional
Dissociation
HCF : Host Cell Factor
HDAC : Histone DésACétylase
HDL : High-Density Lipoprotein
HECT : Homologous to the E6-
AP Carboxyl Terminus domain
Hex : Hexosaminidase
HexNAc : N-AcétylHexosamine
HG : High Glc
^{hi} : high expression
HIF : Hypoxia-Inducible Factor
HK : HexoKinase
HMT : Histone
MéthylTransférase
HNF : *Hepatocyte Nuclear
Factor*
HNPCC : Hereditary Non-
Polyposis Colorectal Cancer
hnRNP : heterogeneous nuclear
RiboNucleoProtein
HO : Heme Oxygénase
Hox : *Homeobox*
HRAS : *Harvey RAT Sarcoma
viral oncogene homolog*
Hsc : Heat shock cognate
sp : Heat shock protein
HTS : High-Throughput
Screening
HUWE : HECT, UBA, and WWE
domain containing E3 ubiquitin
protein ligase

I

I/R : Ischémie/Reperfusion
IC₅₀ : half
maximal Inhibitory Concentrati
on
IDL : Insertion-Deletion Loop
IDR : Intrinsically Disordered
Region
IF : ImmunoFluorescence
IGF : *Insulin like Growth Factor*
IHC : ImmunoHistoChimie

IKK : Inhibitory KappaB Kinase
IL : InterLeukine
IL1R : *IL-1 Receptor*
IMC : Indice de Masse Corporelle
INCa : Institut National du Cancer
INS : *INSuline*
Int-D : Inter-Domaine
IP : ImmunoPrécipitation
IR : Insulin Receptor
IRI : IRI notécan
IRS : IR Substrate
IV : IntraVeineux

J

JNK : c-Jun N-ter Kinase

K

K : Kératine
KAT : Lysine AcétylTransférase
KCZ : KetoConaZole
KD : *Knock-Down*
KI : *Knock-In*
Kip : Kinase-inhibitory protein
KO : *Knock-Out*
KRAS : *V-Ki-ras2 Kirsten RAS viral oncogene homolog*
KSHV : Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus

L

L1CAM : *L1 Cell Adhesion Molecule*
LATS : *LA*rge Tumor Suppressor kinase
lncRNA : long non-coding RiboNucleic Acid
LDH : Lactate DésHydrogénase
Le : Lewis
LEF : Lymphoid Enhancer Factor
LG : Low Glc
LGR : Leu-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor
LIG : ADN LIGase
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
LMA : Leucémie Myéloïde Aigüe
lo : low expression
LOH : Loss Of Heterozygoty
LPS : LipoPolySaccharide

LRP : Lipoprotein Receptor-related Protein
LSD : Lysine-Specific histone Demethylase
LSF : Late Simian virus 40 Factor
LT : Lymphocyte T
LTB4R : *LeukoTriene B4 Receptor*
LV : LeucoVorine

M

Maf : V-Maf
Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene
MAN : *α-MANnosidase*
MAP : Microtubule-Associated Protein
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPKK : MAPK Kinase
MAPKKK : MAPKK Kinase
MBD : Methyl-CpG-Binding Domain protein
MCL : Mantle Cell Lymphoma
Mcl : Myeloid cell leukemia
MCM : MiniChromosome Maintenance protein
MCP : Methyl-accepting Chemotaxis Protein
MCT : Modification Co-Traductionnelle
MDC : Mediator of DNA damage Checkpoint protein
MDF : Mucin Depleted Foci
MDM : Mouse Double Minute
MEC : Matrice ExtraCellulaire
MEF : Mouse Embryonic Fibroblast
MEK : MAPK/ERK Kinase
MGAT : α-1,3-Mannosyl-Glycoprotein 2-β-N-AcetylglucosaminylTransférase
MGEA : *MeninGioma Expressed Antigen*
MICI : Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin
MINT : *Methylated IN Tumors*
miR : micro-ARN
MIRO : Mitochondrial Rho
MKK : MAPKK
MLC : Myosin Light-Chain
MLCK : MLC Kinase
MLH : MutL Homolog
MLL : Mixed-Lineage Leukemia

MMP : *Matrix MetalloProteinase*
MMR : *MisMatch Repair*
MnSOD : Manganese SuperOxide Dismutase
mOGT : mitochondrial OGT
MOMP : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
MP : Myosine Phosphatase
MPT : Modification Post-Traductionnelle
MR : Mandelate Racemase
MRP : Multidrug Resistance-associated Protein
MSH : MutS Homolog
MSI : MicroSatellite Instable
MSI-H : MSI-High frequency
MSI-L : MSI-Low frequency
mSIN : mammalian Stress-activated protein kinase
INteracting protein
MSS : MicroSatellite Stable
MTHF : MéthylèneTrétraHydroFolate
MTHFR : MTHF Réductase
mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
mTORC : mTOR Complex
MTS : Mitochondrial Targeting Sequence
MUC : *MUCine*
Mut : Mutator
mut : muté
Myb : V-Myb Myeloblastosis viral oncogene homolog
MYBL : *MYB proto-oncogene Like*
MYPT : MYosin Phosphatase Target
MYT : Membrane-associated Y- and T-specific CDC2-inhibitory kinase

N

N^α-acétylation : acétylation de l'α-amine en N-ter
Na : Sodium
NAC : Non-Amyloid-β Component
NAD : Nicotinamide Adénine DiNucléotide
NADP : NADPPhosphate
NADPH : NADP réduit
NAG : N-Acétyl-Glucosamine
NAGK : NAG Kinase

NanoLC-MS/MS : Nano-Liquid Chromatography tandem-Mass Spectrometry

NAT : N- α -AcétylTransférases

NBS : Nucleotide Binding Site

NCI-60 : National Cancer Institute 60

ncOGT : nucleocytoplasmic OGT

NDAC : N-ter DeACétylase

NDK : Nucléoside Diphosphate Kinase

NDUF : NAD Dehydrogenase Ubiquinone Fe-S protein

NER : Nucleotide Excision Repair

NeuroD : Neurogenic Differentiation

NEUROG : *NEUROGénine*

NF : NeuroFilament

NF : Nuclear Factor

NIMA : Never In Mitosis gene A

Nkx2 : Nk2 homeobox transcription factor related

NLS : Nuclear Localization Signal

NO : Nitric Oxide

NPC : Nuclear Pore Complex

NRF : Nuclear Respiratory Factor

NRS : Negative Regulatory Sequence

NSB : Nijmegen Breakage Syndrome

NSCLC : Non-Small-Cell Lung Carcinoma

NT : NitroTyrosine

nt : nucléotide

NTR : Nuclear Transport Receptor

Nup : Nucléoporine

N ^{α} -acétylation : acétylation de l' α -amine en N-ter

O

OAT : Organic Anion Transporter

Oct : Octamer-binding transcription factor

OCT : Organic Cation Transporter

ODC : Orinithine DéCarboxylase

OGA : β -O-GlcNAcAse

OGT : β -O-GlcNAcTransférase

O-GlcNAcylation : O-N-

AcétylGlucosaminylation

OPRT : Orotate

PhosphoRibosylTransférase

OSMI : OGT with a Small Molecule Inhibitor

OX : OXaliplatine

P

PA : Phosphatidic Acid

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale

PAI : *Plasminogen Activator Inhibitor*

PAN : PANitumumab

PARP : Poly(ADP-Ribose) Polymérase

Pax : Paired box

PcG : Polycomb-Group proteins

PCNA : *Proliferating Cell Nuclear Antigen*

PD : Programmed cell Death

PDCD6IP : ProgrammeD Cell Death 6-Interacting Protein

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PDH : Pyruvate DésHydrogénase

PDHK : PDH Kinase

PDK : Phosphoinositide-Dependent Kinase

PD-L : PD-Ligand

Pdx : Pancreatic and duodenal homeobox

PE : PhénylEphrine

PEG : PolyEthylène Glycol

Pem : *Placentae and embryos oncofetal*

PEPCK : *PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase*

PERK : Protein kinase R-like *Endoplasmic Reticulum* Kinase

PFK : PhosphoFructoKinase

PGC : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator

PGLI : PhosphoGlucose Isomérase

PGK : PhosphoGlycérate Kinase

PGlcS : Prediction of O-GlcNAcylated Sites

PGM : PhosphoGlucOmutase

Ph : Polyhomeotic

PHB : ProHiBitine

PHDK : Pyruvate

DésHydrogénase Kinase

PhoRC : Pleiohomeotic-Repressive Complexe

PI : PhosphatidylInositol

PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase

PI3KCA : *PI3K Catalytic subunit Alpha*

PIDD : P53-Induced protein with a DD

PIN : Peptidylpropyl cis-trans NIMA Isomerase interacting

PIP : PIPhosphate

PIP2 : PI-4,5, BisPhosphate

PIP3 : PI-3,4,5 TriPhosphate

PIPK : PIP Kinase

PK : Protéine Kinase

PK : Pyruvate Kinase

PL : PhosphoLipase

PLB : PhosphoLamBane

PLK : Polo-Like Kinase

PMAIP : *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein*

PML : *ProMyelocytic Leukemia*

PMS : PostMeiotic Segregation increased

PNGase : Peptide-N-Glycosidase

POL : POLymérase

poly-LacNAc : poly-N-AcétylLactosamine

PP : Protein Phosphatase

PPi : PyroPhosphate inorganique

ppGalNAcT : polypeptide N-AcétylGalactosaminylTransférase

PPO : PIP-binding domain activity of OGT

PPP : Pentose Phosphate Pathway

pRB : protéine du RétinoBlastome

PRC : Polycomb Repressive Complex

PR-DUB : Polycomb Repressive DeUBiquitinase

PRE : PcG Responsive Element

pre-B-ALL : pre-B Acute Lymphocytic Leukemia

PRO : PROtéolyse

PRPP : PhosphoRibosyl PyroPhosphate

Prx : Peroxyrédoxine

PS : *ParaSporine*
PSM : *ProtéaSoMe*
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTP : Pore de Transition de Perméabilité
Puma : P53 upregulated modulator of apoptosis
PVL : *Psathyrella Velutina* Lectin

Q

Q6S : Quinolinone-6-Sulfonamide
qRT-PCR : quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

R

RbAp : Retinoblastoma-binding protein
RAC : RAS-related C3 botulinum toxin substrate
RACK : Receptor of Activated protein C Kinase
RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAIDD : RIP-Associated ICH1/CED-3-homologous protein with a DD
RAL : RAS-reLated protein
RALBP : RAL-Binding Protein
RalGDS : Ras-like Guanine nucleotide-Dissociation Stimulator
RAM : RAMucirumab
Ran : Ras-related nuclear protein
RanBP : Ran-Binding Protein
RAR : Retinoic Acid Receptor
RAS : RA Sarcoma
RBL : RetinoBlastoma-Like
RBL : Ribosomal Protein of the Large subunit
RE : *Réticulum Endoplasmique*
REG : REGorafénib
RELN : *RELiNe*
RET : REarranged during Transfection
RF : Replication Factor
RFS : Relapse-Free Survival
RHO : RAS HOmolog gene family

RICTOR : Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR
RING : Really Interesting New Gene
RIP : Receptor-Interacting Protein
RMB : *RNA-Binding protein Member*
RNF : RING Finger Protein
RNP : RiboNucléoProtéine
RNU2 : *RiboNucleic acid U2 small nuclear*
Romo : Reactive oxygen species modulator
ROS : Reactive Oxygen Species
RP : Replication Protein
RPL : Ribosomal Protein of the Large subunit
RPS : Ribosomal Protein of the Small subunit
Rpt : Regulatory particle triple-A ATPase
rPVL : recombinant PVL
RR : Ribonucléotide Réductase
RRM : *Ribonucléoside-diphosphate Réductase*
RTK : Récepteur Tyrosine Kinase
rTS : protéine régulatrice de la TS
RUNX : *RUNt related transcription factor*

S

S6K : S6 Kinase
SAM : S-Adénosyl-L-Méthionine
SCF : Skp, Cullin, F-box
SENP : SENtrin specific Proteases
Ser : Sérine
SERCA : *Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase*
SET : Su(var)3-9 ; Enhancer-of-zeste and Trithorax
SETD : SET Domain
sFAS : soluble Fas
SFMBT : Structural maintenance of chromosomes like with Four Malignant Brain Tumor domains
SHMT : Sérine HydroxyMéthylTransférase
siRNA : small interfering RNA

SIRT : SIRTuine
Skp : S-phase kinase-associated protein
SLC : SoLute Carrier
SMAC : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase
SMAD : Small Mothers Against Decapentaplegic
SMC : Syndromes Myasthéniques Congénitaux
SMUG : Single-strand selective Monofunctional Uracil DNA Glycosylase
SN-38G : SN-38 Glucuronide
SNAI : *SNAI*
SNAP : SynAPtosomal-associated protein
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
SNFGE : Société Nationale Française de Gastro-Entérologie
SNP : Single-Nucleotide Polymorphism
SOCS : *Suppressor Of Cytokine Signaling*
sOGA : short OGA
sOGT : short OGT
SOS : Son Of Sevenless
Sp : Specificity protein
SPT : SuPPressor of Ty
Src : v-src avian sarcoma (Schmidt-ruppin A-2) viral oncogene homolog
SREBP : Sterol Regulatory Element-Binding Protein
SSB : Single-Strand Break
ST3GalT : α 2,3-SialylTransférase
ST6GalNAcT : α -GalNAc α 2,6-SialylTransférase
ST6GalT : β -galactoside α 2,6-SialylTransférase
ST8SIA : α 2,8-SIALylTransférase
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
STIM : STromal Interaction Molecule
STZ : STreptoZotocine
SUMO : Small Ubiquitin-related MODifier
Suz : Suppressor-of-zeste
sWGA : succinyl-WGA

Sxc : *Super sex combs*
SYCE : *SYnaptosomal Complex central Element protein*

T

T : Thomsen-Friedenreich
TAB : TGF-Beta Activated kinase
TAF : TATA-box-Associated Factor
TAS : TAGging-via-Substrate
TAS2R : *TASte 2 Receptor*
Tau : Tubulin associated unit
TAZ : *TAfaZzin*
tBid : truncated **Bid**
TBP : TATA-box Binding Protein
TCF : T Cell Factor
TDG : Thymidine DNA Glycosylase
TDP : Thymidine DiPhosphate
TEAD : Transcriptional Enhancer Domain
TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TET : Ten-Eleven Translocation
TF : TriFluoro
TF : B-Transcription Factor
TFT : *TFThymidine*
TGF : Transforming Growth Factor
TGFBR : *TGF-β Receptor*
THAP : *THanatos Associated Protein*
THF : *TétraHydroFolate*
TIE : Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains
TIF : Transcriptional Intermediary Factor
TK : Thymidine Kinase
TLD : *ThymineLess Death*
TLE : Transducin-Like Enhancer
TLR : Toll-Like Receptor
TMP : Thymidine MonoPhosphate
Tn : Thomsen-nouvelle
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNFAIP : *TNF Alpha-Induced Protein*
TNFR : *TNF Receptor*
TNFRS : *TNFR Superfamily*
TNM : *TétraNitroMéthane*
TNM : Tumor-Node-Metastasis
Top : *Topoisomérase*
TP : *Tumor Protein*
TP : Thymidine Phosphorylase

TPR : TetratricoPeptide Repeat
TRADD : TNFR Associated DD
TRAIL : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAIL-R : *TRAIL-Receptor*
TRAK : *TRAfficking Kinesin protein*
Trp : Tryptophane
TrpC : *Transient Receptor Potential Channel*
TruMBD4 : *Truncated MBD4*
TS : Thymidylate Synthase
TSC : Tuberous SCLerosis
TSER : *TS Enhancer Region*
TTP : Thymidine TriPhosphate
TTR : Time-to-Tumor Recurrence
TUB : *TUBuline*
TYMP : *ThYMidine Phosphorylase*
TYMS : *ThYMidylate Synthase*
TYROBP : *TYROsine kinase-Binding Protein*

U

UAP : UDP-N-Acétylglucosamine Pyrophosphorylase
Ub : Ubiquitine
Uba : Ubiquitin activating enzyme
UBA : Ubiquitin-Associated domain
Ubc : Ubiquitin-conjugating enzyme
UCH : Ubiquitin C-terminal Hydrolase
UDG : Uracil-DNA-Glycosylase
UDP : Uridine DiPhosphate
UFT : *Uracile/FTorafur*
UGT : UDP GlucuronosylTransférase
UK : Uridine Kinase
UMP : Uridine MonoPhosphate
UMP-CMPK : *UMP-Cytidine MonoPhosphate Kinase*
UMPS : *UMP Synthase*
UNG : Uracil-DNA Glycosylase
UP : Uridine Phosphorylase
UPR : Unfolded Protein Response
UPS : Ubiquitin Proteasome System
USF : Upstream Stimulatory Factor

USP : Ubiquitin-Specific Protase
UTP : Uridine TriPhosphate
UTR : Untranslated Transcribed Region

V

VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel
VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*
VIM : *VIMentine*

W

WB : Western Blot
WG : *Whithout Glc*
WGA : *Wheat Germ Agglutinin*
Wnt : *Wingless integration*

X

XBP : X-box-Binding Protein
XEL : *XELoda®*
XIC : X-Inactivation Center
XIST : *X Inactive Specific Transcript*
XLID : X-Linked Intellectual Disability
XP : *Xeroderma Pigmentosum, complementation*
XPD : X-linked Dystonia-Parkinsonism
XRCC : X-ray Repair Cross Complementing

Y

YAP : Yes-Associated Protein
YY : Yin Yang

Z

ZEB : Zinc finger E-box-Binding homeobox
ZNF : *ZiNc Finger protei*

Table des illustrations

Figure 1 : Incidence et mortalité du Cancer ColoRectal (CCR) aux niveaux national et international en 2018.

Figure 2 : Organisation anatomique et architecture macroscopique du Côlon-Rectum (CR).

Figure 3 : Architecture microscopique de l'épithélium muqueux du CR.

Figure 4 : Modèles conceptuels de l'origine et de la progression du CCR sporadique.

Figure 5 : Processus de cancérisation sporadique du CR.

Figure 6 : Voies de signalisation affectées par les anomalies génétiques dans le CCR.

Figure 7 : Mécanisme de réparation des dommages à l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) par le système MisMatch Repair (MMR).

Figure 8 : Stades du CR selon la classification actuelle Tumor-Node-Metastasis (TNM).

Figure 9 : Métabolisme des chimiothérapies du CCR.

Figure 10 : Traitements du CCR selon la classification actuelle TNM.

Figure 11 : Métabolisme du 5-FluoroUracile (5-FU).

Figure 12 : Effet du 5-FU sur le cycle cellulaire.

Figure 13 : Voies de signalisation extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose.

Figure 14 : Effet du 5-FU sur la voie apoptotique extrinsèque.

Figure 15 : Effet du 5-FU sur la voie apoptotique intrinsèque.

Figure 16 : Résistance au 5-FU induite par la régulation de son métabolisme.

Figure 17 : Résistance au 5-FU induite par l'inhibition de son effet cytotoxique.

Figure 18 : Mécanisme de réparation des dommages à l'ADN par le système Base Excision Repair (BER).

Figure 19 : Gène de la Thymidylate Synthase (TS) humaine.

Figure 20 : Structure de la TS humaine.

Figure 21 : Réaction enzymatique de la TS.

Figure 22 : Mécanismes de régulation transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle de la TS.

Figure 23 : Modifications co- et post-traductionnelles de la TS.

Figure 24 : Polymorphismes du gène *ThYMidylate Synthase (TYMS)* dans le CCR.

Figure 25 : Résistance au 5-FU induite par la régulation de la TS.

Figure 26 : Types de glycosylation classiques retrouvées sur les protéines de mammifères.

Figure 27 : Gène, structure et isoformes de la *O-N-acétylGlucosamineTransférase (OGT)* humaine.

Figure 28 : Réaction enzymatique de l'OGT.

Figure 29 : Réaction protéolytique de l'OGT.

Figure 30 : Régulation génique de l'OGT.

Figure 31 : Régulation transcriptionnelle de l'OGT.

Figure 32 : Régulation post-traductionnelle de l'OGT.

Figure 33 : Modifications post-traductionnelles de l'OGT.

Figure 34 : Gène, structure et isoformes de la *O-N-acétylGlucosaminidAse (OGA)* humaine.

Figure 35 : Réaction enzymatique de l'OGA.

Figure 36 : Mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle de l'OGA.

Figure 37 : Modifications post-traductionnelles de l'OGA.

Figure 38 : Voie de biosynthèse *de novo* et de sauvetage des hexosamines.

Figure 39 : Inhibiteurs de l'OGT.

Figure 40 : Inhibiteurs de l'OGA.

Figure 41 : Inhibiteurs de la Glutamine : Fructose-6-phosphate AmidoTransférase (GFAT).

Figure 42 : Techniques d'enrichissement, de détection et d'identification des protéines *O-GlcNAcylées*.

Figure 43 : Dialogue entre la *O-N-AcétylGlucosaminylation (O-GlcNAcylation)* et la phosphorylation.

Figure 44 : Régulation de la stabilité des protéines par la *O-GlcNAcylation*.

Figure 45 : Régulation de la localisation nucléaire des protéines par la *O-GlcNAcylation*.

Figure 46 : Régulation de l'activité enzymatique des protéines par la *O-GlcNAcylation*.

Figure 47 : Régulation de la transcription par la *O-GlcNAcylation*.

Figure 48 : Régulation de la traduction par la *O*-GlcNAcylation.
Figure 49 : Régulation du trafic intracellulaire par la *O*-GlcNAcylation.
Figure 50 : Régulation de la signalisation cellulaire par *O*-GlcNAcylation.
Figure 51 : Régulation de la réponse au stress par *O*-GlcNAcylation.
Figure 52 : Régulation de l'apoptose par la *O*-GlcNAcylation.
Figure 53 : Organisation de l'architecture cellulaire par *O*-GlcNAcylation.
Figure 54 : Régulation du cycle cellulaire par la *O*-GlcNAcylation.
Figure 55 : Régulation du développement par la *O*-GlcNAcylation.
Figure 56 : Dérégulation de la *O*-GlcNAcylation dans le Diabète de Type 2 (DT2).
Figure 57 : Dérégulation de la *O*-GlcNAcylation dans les maladies neurodégénératives.
Figure 58 : Dérégulation de la *O*-GlcNAcylation dans les maladies cardiovasculaires.
Figure 59 : Altérations spécifiques de la glycosylation dans le CCR.
Figure 60 : Dérégulation de la *O*-GlcNAcylation dans le cancer.
Figure 61 : Régulation de la réponse aux thérapies anti-cancéreuses par la *O*-GlcNAcylation.
Figure 62 : Régulation de la réponse au 5-FU associée à la glycosylation complexe par la *O*-GlcNAcylation.
Figure 63 : Régulation de l'effet cytotoxique du 5-FU induit par la *O*-GlcNAcylation.
Figure 64 : Régulation de la voie du 5-FU par la *O*-GlcNAcylation.

I. GENERALITES

Chapitre 1 :

Le Cancer Colorectal (CCR)

Chapitre 1 : Le Cancer ColoRectal (CCR)

1. Epidémiologie et statistiques

1.1. Incidence et mortalité

Le **CCR** (Cancer ColoRectal) est un problème de santé publique majeur puisqu'il est, de par sa fréquence (1,8 millions de nouveaux cas en 2018), la 3^{ème} pathologie cancéreuse tous sexes confondus à travers le monde après les cancers du poumon et du sein (**GLOBOCAN**). Avec près de 881 000 décès en 2018, il se situe au 2^{ème} rang des cancers en terme de mortalité dans le monde derrière le cancer du poumon (**Bray et al., 2018**). Selon les projections de l'**INCa** (**Institut National du Cancer**) pour la France métropolitaine en 2018, le CCR demeurerait le 4^{ème} cancer en termes d'incidence (44 000 nouveaux cas estimés dont 54% chez l'homme) après les cancers du sein, du poumon et de la prostate, et le 2^{ème} en terme de mortalité (18 000 décès estimés dont 54% chez l'homme) après le cancer du poumon (**Figure 1**).

1.1. Etiologie

1.1.1. Facteurs génétiques

La majorité des CCR, soit environ 75-80 % des cas, sont sporadiques alors que 20-25 % des restants présentent des prédispositions familiales. Parmi ces derniers, seuls 5 % ont un syndrome héréditaire, le syndrome de Lynch également appelé cancer colorectal non-polypeux héréditaire (**HNPCC**, **Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer**) et la **PAF** (**Polypose Adénomateuse Familiale**) étant les plus répandus.

1.1.2. Facteurs environnementaux

Les CCR sporadiques peuvent être modulés par un grand nombre de facteurs environnementaux incluant l'âge du sujet, le mode de vie, les maladies inflammatoires ou encore les désordres métaboliques.

Le vieillissement de la population contribue à l'augmentation de l'incidence du CCR puisque 95% des nouveaux cas surviennent après l'âge de 50 ans. Les **MICI** (**Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin**) telles que la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse accroissent également le risque de CCR (**Triantafillidis et al., 2009**). Les données épidémiologiques révèlent une prévalence nette des CCR dans les pays industrialisés (**Bray et al., 2018**) et une augmentation croissante du taux d'incidence dans les pays en voie de développement en raison d'une « occidentalisation » progressive du mode de vie (**Center et al., 2009**). Les taux d'incidence les plus élevés pour le CCR se localisent en Europe, en Australie/Nouvelle Zélande, en Amérique du Nord et en Asie de l'Est et les plus bas en Afrique et en Asie du Sud (**Bray et al., 2018**). En revanche, la mortalité reste moins importante dans les régions développées par la présence de meilleures conditions sanitaires et de meilleurs accès aux traitements (**Ferlay et al., 2015**) (**Figure 1**).

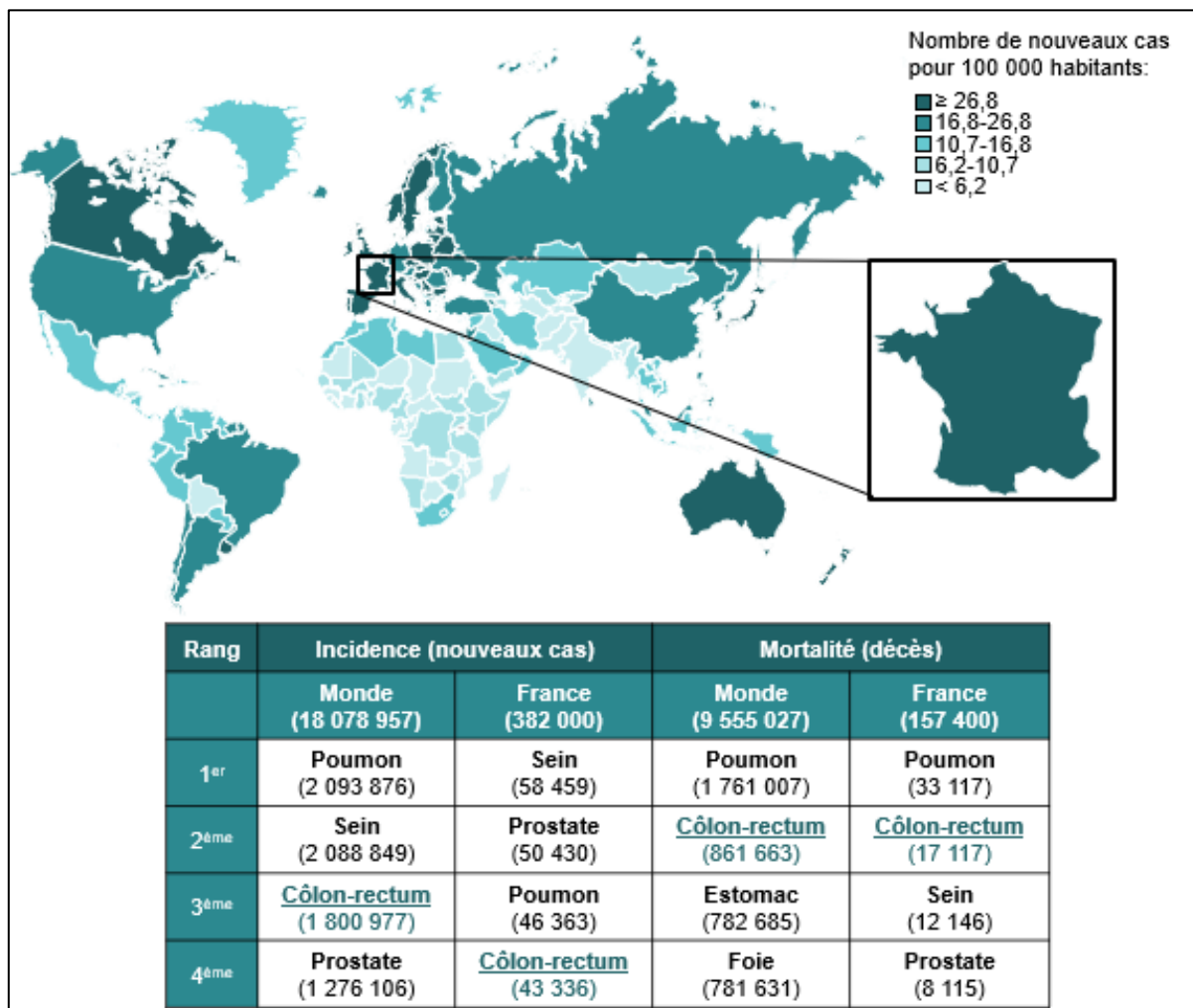


Figure 1 : Incidence et mortalité du Cancer ColoRectal (CCR) aux niveaux national et international en 2018. L'incidence du CCR est plus élevée en Amérique du Nord, en Europe, en Asie de l'Est et en Australie/Nouvelle Zélande. Le CCR est le 3^{ème} et le 4^{ème} cancer le plus fréquent respectivement dans le monde et en France, et le 2^{ème} cancer le plus mortel dans le monde et en France (INCa, 2018 ; GLOBOCAN, 2018 (Bray et al., 2018)).

CCR : Cancer ColoRectal ; **INCa** : Institut National du Cancer.

Il est connu depuis les années 1980, que la prise alimentaire influe sur le risque d'incidence du CCR (Jain et al., 1980). Notamment, l'apport riche en calories totales, en graisses totales, en protéines, en sucres raffinés ou en cholestérol augmente ce risque. Au contraire, il est réduit par la consommation d'acide folique, de vitamine C et de fibres végétales (Jain et al., 1980; Freudenheim et al., 1990; Benito et al., 1991). L'obésité et le **DT2 (Diabète de Type 2)**, qui ont souvent pour origine une alimentation déséquilibrée, ont également été associés à un risque accru de développer un CCR. En effet, Bostick et collaborateurs (1994) ont montré que l'apport riche en saccharose (plus de 25 g/j) et l'obésité (**IMC (Indice de Masse Corporelle)** supérieur à 30 kg/m²) augmentent de plus de 1,4 fois ce risque (Bostick et al., 1994). Les sujets atteints de DT2, caractérisé par une hyperglycémie et une résistance à l'insuline, ont également 1,4 fois plus de risque de développer un CCR (Yang et al., 2005).

2. Processus de cancérisation du Côlon-Rectum (CR)

2.1. Evolution histopathologique

2.1.1. Architecture macroscopique et fonctions physiologiques

Le côlon est la portion distale du tractus digestif qui mesure environ 1,5 mètres de long et qui s'étend de la valvule iléo-caecale de Bauhin jusqu'au rectum. Il forme un cadre colique comprenant quatre sections : le côlon ascendant (ou droit), le côlon transverse, le côlon descendant (ou gauche) et le côlon sigmoïde relié au rectum (**Figure 2**).

Physiologiquement, ses fonctions principales sont la sécrétion de mucus et l'absorption d'eau, d'électrolytes et de nutriments non digérés par l'intestin grêle pour, respectivement, faciliter la progression et la concentration des matières fécales. Son microbiote synthétise des vitamines dont l'acide folique qui aident à la digestion des aliments et à la coagulation du sang. Le rectum, quant à lui, stocke les matières fécales avant leur évacuation par l'anus.

Comme l'ensemble du tube digestif, le côlon-rectum est composé de quatre tuniques qui se superposent. De l'intérieur vers l'extérieur, on retrouve : la muqueuse au contact de la lumière, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (mésocôlon ou mésorectum). La sous-muqueuse est constituée d'un tissu conjonctif richement irrigué contenant le plexus nerveux de Meissner. La musculuse est constituée de fibres musculaires lisses circulaires internes et longitudinales externes séparées par le plexus nerveux d'Auerbach. La séreuse est constituée de tissu adipeux et forme le feuillet viscéral du péritoine (**Figure 2**). Enfin, la muqueuse comporte elle-même un épithélium de revêtement, une musculuse muqueuse constituée de fibres musculaires, une lame basale et un tissu conjonctif de soutien (ou chorion) riche en tissu lymphoïde diffus. Contrairement à l'épithélium intestinal, l'épithélium muqueux colique ou rectal ne présente pas de villosités à sa surface mais des invaginations en forme de doigts appelées cryptes (ou glandes) de Lieberkühn (**Figure 3**).

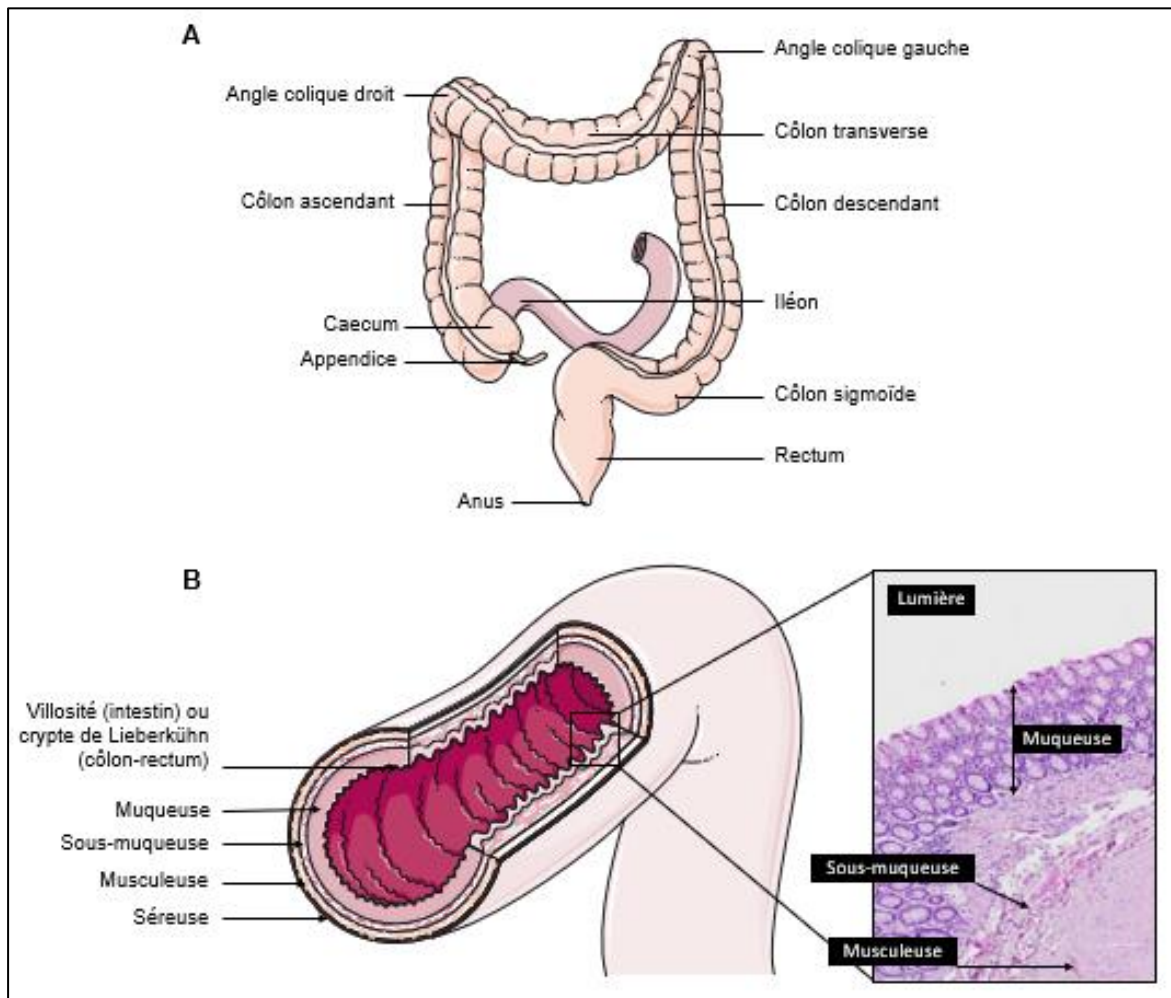


Figure 2 : Organisation anatomique et architecture macroscopique du Côlon-Rectum (CR). Schémas du gros intestin (A) et des tuniques de l'épithélium muqueux du CR (B). Le CR est constitué de 4 tuniques : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse. Coupes histologiques issues de *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/colon>).

CR : Côlon Rectum.

2.1.2. Architecture microscopique de l'épithélium muqueux

Les cryptes de Lieberkühn sont constituées de plusieurs types cellulaires différenciées : les entérocytes (ou colonocytes, 80%), les cellules caliciformes (ou cellules sécrétrices de mucus ou cellules en gobelet, 20%) et les cellules entéroendocrines (<1%). Elles comportent également des **CS** (**C**ellules **S**ouches) indifférenciées (4 à 6 cellules par crypte). Contrairement à celui de l'intestin grêle, l'épithélium muqueux du côlon-rectum est dépourvu de cellules de Paneth (**Figure 3**).

Cellules différenciées : Au sommet de la crypte, les entérocytes absorbent l'eau, les électrolytes et les nutriments non digérés au niveau de l'intestin grêle. Au milieu de la crypte, les cellules caliciformes sécrètent une grande quantité de mucus servant à la lubrification des parois de l'épithélium et à sa protection contre les pathogènes et les toxines du tube digestif. Sous l'effet de certains stimuli, les cellules entéroendocrines à la base de la crypte sécrètent différentes hormones ayant un rôle dans le contrôle de la satiété (**CKK**, **CholéCystoKinine**), la motilité du tractus digestif (gastrine, sérotonine, peptide inhibiteur gastrique (**GIP**, **G**astric **I**nhibitory **P**olypeptide) et sécrétine) ou encore l'immunité et l'inflammation (substance P et somatostatine) (**Figure 3**).

Cellules indifférenciées : L'épithélium du côlon-rectum est en contact perpétuel avec un milieu septique, acide et agressif contenu dans la lumière intestinale. Son homéostasie est donc basée sur le renouvellement rapide et constant de la monocouche cellulaire (**Figure 3**).

Ce renouvellement cellulaire a lieu tous les 2 à 7 jours ([Crosnier et al., 2006](#)) et repose sur les activités de prolifération et de différenciation des CS. Il existe un gradient de différenciation des CS de sorte que celles qui se divisent de manière asymétrique sont au fond des cryptes alors que les cellules filles progénitrices se différencient en migrant vers le sommet. Selon leur localisation le long de l'axe antéro-postérieur de l'intestin, de leur position dans l'axe crypte-sommet et sous l'influence de gradients de ligands, les cellules acquièrent des caractéristiques fonctionnelles et perdent leur capacité à proliférer ([De Santa Barbara et al., 2003](#); [Noah et al., 2011](#)). Arrivées à la surface en plateau des cryptes de Lieberkühn, les cellules meurent par apoptose et desquamement dans la lumière (**Figure 3**).

2.1.3. Tumeurs épithéliales de la muqueuse du CCR et modèles d'initiation et de la progression du CCR

La dérégulation des mécanismes de différenciation, de prolifération ou d'apoptose aboutit à l'accumulation d'anomalies à l'origine du développement de tumeurs épithéliales. Les premières anomalies décelables sont des lésions précancéreuses qui sont majoritairement de deux types : les foyers de cryptes aberrantes (**ACF**, **A** aberrant **C**rypt **F**oci) ([Pretlow et al., 1992](#)) et les foyers déplétés en mucine (**MDF**, **M**ucin **D**epleted **F**oci) ([Femia et al., 2004](#)).

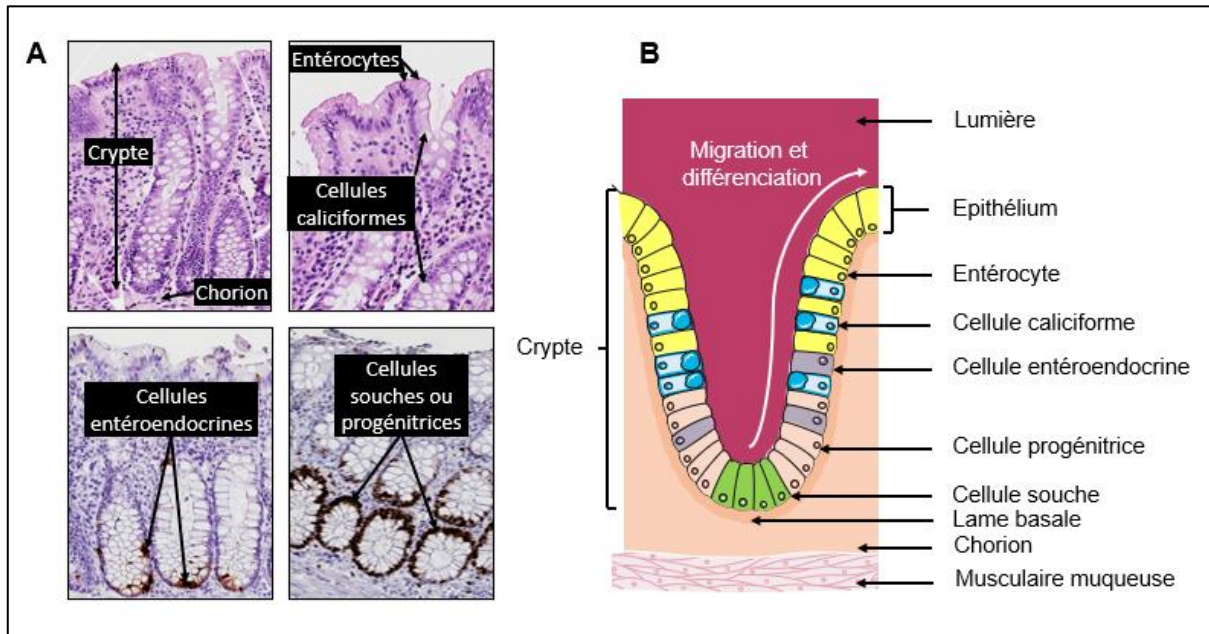


Figure 3 : Architecture microscopique de l'épithélium muqueux du CR. Coupes histologiques (A) et schéma (B) de l'épithélium muqueux du CR. L'épithélium de la crypte du CR s'organise du fond au sommet avec les cellules indifférenciées (souches et progénitrices exprimant le marqueur de prolifération Ki-67) puis les cellules différenciées (entéroendocrines exprimant la chromogranine A, caliciformes et entérocytes). Les cellules indifférenciées prolifèrent et se différencient afin d'assurer le renouvellement des cellules différenciées qui migrent au fur et à mesure vers le sommet puis meurent par apoptose. Coupes histologiques issues de [The Human Protein Atlas](https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/colon) (<https://www.proteinatlas.org/learn/dictionary/normal/colon>).

CR : Côlon Rectum.

Les adénomes plans et polypoïdes sont des lésions cancéreuses bénignes qui, dans 5% des cas, aboutissent à un carcinome en suivant la séquence adénome-carcinome décrite en 1990 par Fearon et Vogelstein (Fearon and Vogelstein, 1990). Dans plus de 95% des cas de CCR, les tumeurs sont des adénocarcinomes qui surviennent au niveau des glandes de la muqueuse.

La tumeur colorectale est composée de populations cellulaires très hétérogènes en termes de morphologie, de potentiels prolifératif et tumorigène, d'expression de marqueurs de surface ou encore de réponse à la thérapie anti-cancéreuse (Dexter et al., 1981). Deux modèles conceptuels de l'origine et de la progression tumorales étaient initialement proposés pour expliquer l'hétérogénéité tumorale observée : les modèles « stochastique » et « hiérarchique ». Le modèle actuel est basé sur une coexistence de ces deux premiers (Figure 4).

Modèle « stochastique » : Historiquement, le premier modèle tentant d'expliquer l'origine du cancer a été le modèle « stochastique » (Nowell, 1976). Celui-ci suppose qu'une série de mutations aléatoires peut permettre à chaque cellule du tissu d'acquérir un potentiel prolifératif indéfini et de former un clone tumorigène indépendant. L'hétérogénéité tumorale résulterait d'une sélection clonale ultérieure influencée par le microenvironnement (Figure 4).

Modèle « hiérarchique » : Depuis la fin des années 1990, le modèle stochastique est contredit par une vision « hiérarchique » de la tumeur (Bonnet and Dick, 1997). Ce modèle, également appelé « hypothèse des CSC (Cellules Souches Cancéreuses) », suggère que seule une faible proportion de cellules tumorales, les CSC, possède la capacité d'initier et de maintenir la tumeur. En effet, ces cellules ont les propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation des CS adultes. L'hétérogénéité tumorale résulterait donc d'un arrêt de différenciation cellulaire à différents stades. Ce modèle tire donc son nom du fait que les CSC sont placées au sommet de la pyramide de différenciation tumorale et qu'elles sont à l'origine de l'ensemble des cellules de la tumeur (Figure 4).

Modèle actuel : L'hypothèse actuelle serait que les CSC du CCR dériveraient des CS saines présentes à la base des cryptes qui auraient accumulé des mutations au cours du temps. Les marqueurs communs pour la caractérisation et l'isolement des CSC du CCR sont la combinaison de certaines protéines de surface telles que **CD24** (Cluster de Différenciation **24**), **CD29**, **CD44**, **CD133**, **CD147**, **CD166**, **EpCAM** (Epithelial Cell Adhesion Molecule), **LGR5** (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor **5**) ainsi que **ALDH1** (ALdéhyde DésHydrogénase **1**) intracellulaire (O'Brien et al., 2007; Dalerba et al., 2007; Barker et al., 2007; Vermeulen et al., 2008; Huang et al., 2009; Chen et al., 2015) (Figure 4).

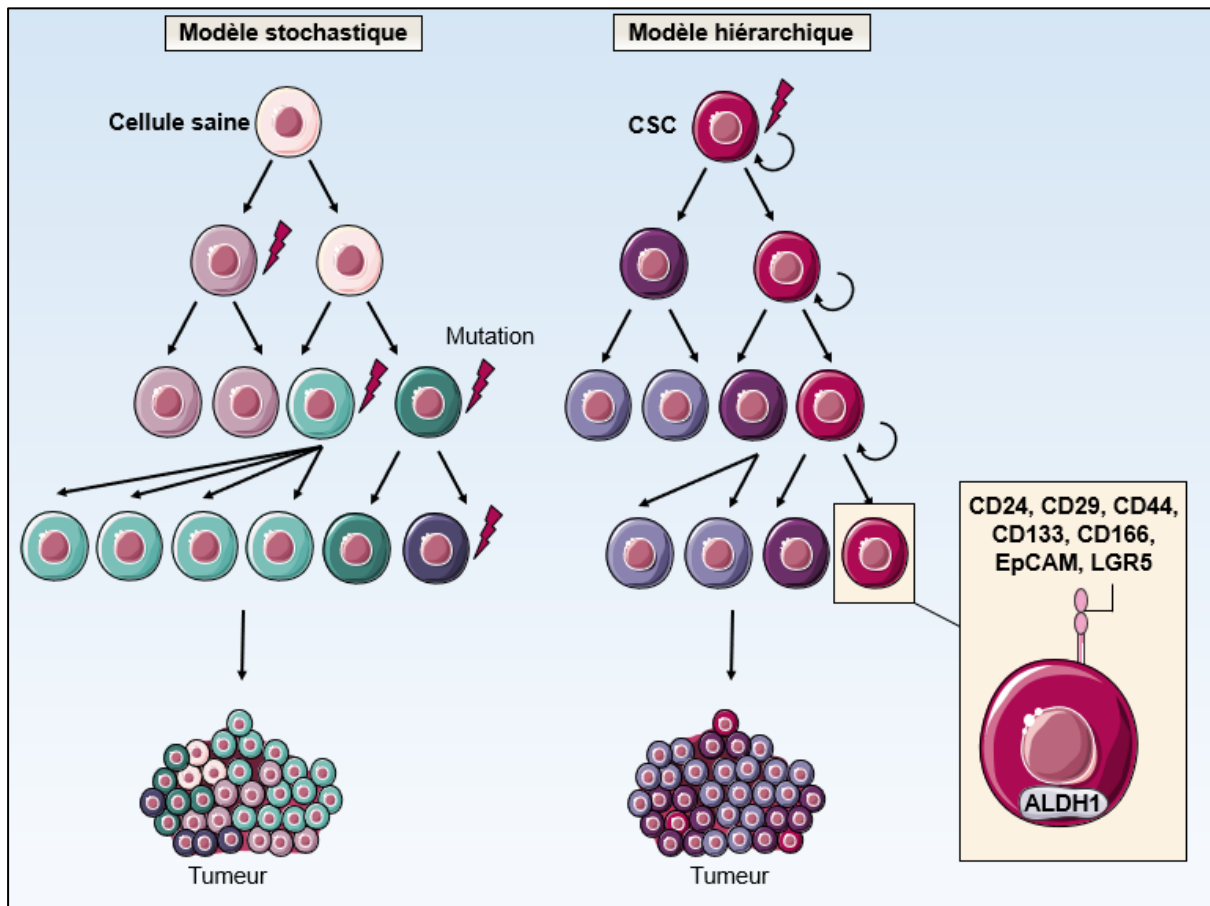


Figure 4 : Modèles conceptuels de l'origine et de la progression du CCR sporadique. Les modèles « stochastiques » et « hiérarchiques » sont respectivement basés sur l'apparition de mutations aléatoires au niveau de cellules différenciées et indifférenciées (CSC caractérisées par des biomarqueurs intracellulaires et de surface). Le modèle actuel repose sur une coexistence de ces deux modèles.

ALDH1 : ALdéhyde DésHydrogénase 1 ; **CD** : Cluster de Différenciation ; **CCR** : Cancer ColoRectal ; **CSC** : Cellule Souche Cancéreuse ; **EpCAM** : Epithelial Cell Adhesion Molecule ; **LGR5** : Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5.

2.2. Séquence de transformation adénome-carcinome de Fearon et Vogelstein

Selon la séquence adénome-carcinome de Fearon et Vogelstein (Fearon and Vogelstein, 1990), à chaque étape de la tumorigenèse apparaissent séquentiellement des mutations ou autres anomalies géniques qui activent la voie **Wnt** (**W**ingless **i**ntegration **s**ite) puis la signalisation associée à l'**EGFR** (**E**GF (**E**pidermal **G**rowth **F**actor) **R**eceptor), qui inactivent la réponse au **TGF-β** (**T**ransforming **G**rowth **F**actor **β**) et enfin qui induisent la perte de fonction de **p53** (protéine de **53** kilodaltons) (**Figures 5 et 6**).

2.2.1. Voie de signalisation Wnt

En l'absence du ligand Wnt, la β-caténine cytosolique est complexée aux protéines **APC** (**A**dénomateux **P**olyposis **C**oli) et **axine** (**a**xis **i**nhibition **p**rotein). Ce complexe sert de plateforme d'interaction pour les kinases **GSK3-β** (**G**lycogen **S**ynthase **K**inase **3-β**) et **CK1α** (**C**asein **K**inase **1 α**) qui phosphorylent alors la β-caténine au niveau de la boîte de destruction **D-box** (**D**estruction **b**ox) et induisent sa dégradation protéasomale. La fixation du ligand Wnt sur **Frz** (**F**rizzled) entraîne l'association du récepteur avec ses corécepteurs **LRP5/LRP6** (**L**ipoprotein **R**eceptor-related **P**rotein **5/6**) et le recrutement de **Dsh** (**D**isheveled). A son tour, Dsh recrute l'axine et dissocie ainsi le complexe de destruction de la β-caténine. La β-caténine cytoplasmique est alors transloquée au noyau pour former un complexe d'activation transcriptionnel avec les régulateurs transcriptionnels **TCF** (**T** Cell **F**actor)/**LEF** (**L**ymphoid **E**nhancer **F**actor) et des coactivateurs transcriptionnels tels que **Bcl-9** (**B**-cell **l**ymphoma-**9**)/Pygopus. Les gènes cibles de la voie Wnt/β-caténine sont impliqués dans la régulation de la voie Wnt, la prolifération, la croissance, l'invasion, l'angiogenèse ou encore l'inhibition de l'apoptose (Pino and Chung, 2010) (**Figure 6**). Ainsi, dans plus de 80% des tumeurs colorectales, une suractivation de la voie Wnt résultant en l'accumulation nucléaire de la β-caténine initie la cancérogenèse (White et al., 2012). Ces tumeurs présentent des mutations des gènes codant les suppresseurs de tumeur APC (56% des cas) et axine 2 (5%) ou encore le proto-oncogène β-caténine (5%) (**Figure 5**).

2.2.2. Voies de signalisation du récepteur aux facteurs de croissance Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) et du Transforming Growth Factor β (TGF-β)

La fixation du facteur de croissance EGF au récepteur transmembranaire EGFR conduit à l'activation de **RAS** (**R**at **S**arcoma) qui active, à son tour trois principaux effecteurs : **RAF** (**R**apidly **A**ccelerated **F**ibrosarcoma), **PI3K** (**P**hospho**I**nositide **3**-**K**inase) et **RaIGDS** (**R**as-like **G**uanine nucleotide-**D**issociation **S**timulator). RAF initie la cascade de signalisation impliquant les kinases **MEK** (**M**APK (**M**itogen-**A**ctivated **P**rotein **K**inases) **E**RK (**E**xtracellular signal-**R**egulated **K**inases) **K**inase) et ERK (Wee and Wang, 2017) qui stimulent notamment la prolifération et le cycle cellulaire. Au niveau de la membrane plasmique, PI3K convertit le **PIP2** (**P**I (**P**hosphatidyl**I**nositol)-4,5, **B**is**P**hosphate) en **PIP3** (**P**I-3,4,5 **T**ri**P**hosphate) conduisant à l'activation de AKT. De manière opposée, le PIP3 est hydrolysé en PIP2 par **PTEN** (**P**hosphatase and **T**ENsin homolog). La voie PI3K/AKT inhibe l'apoptose et promeut le métabolisme et la survie cellulaires (**Figure 6**).

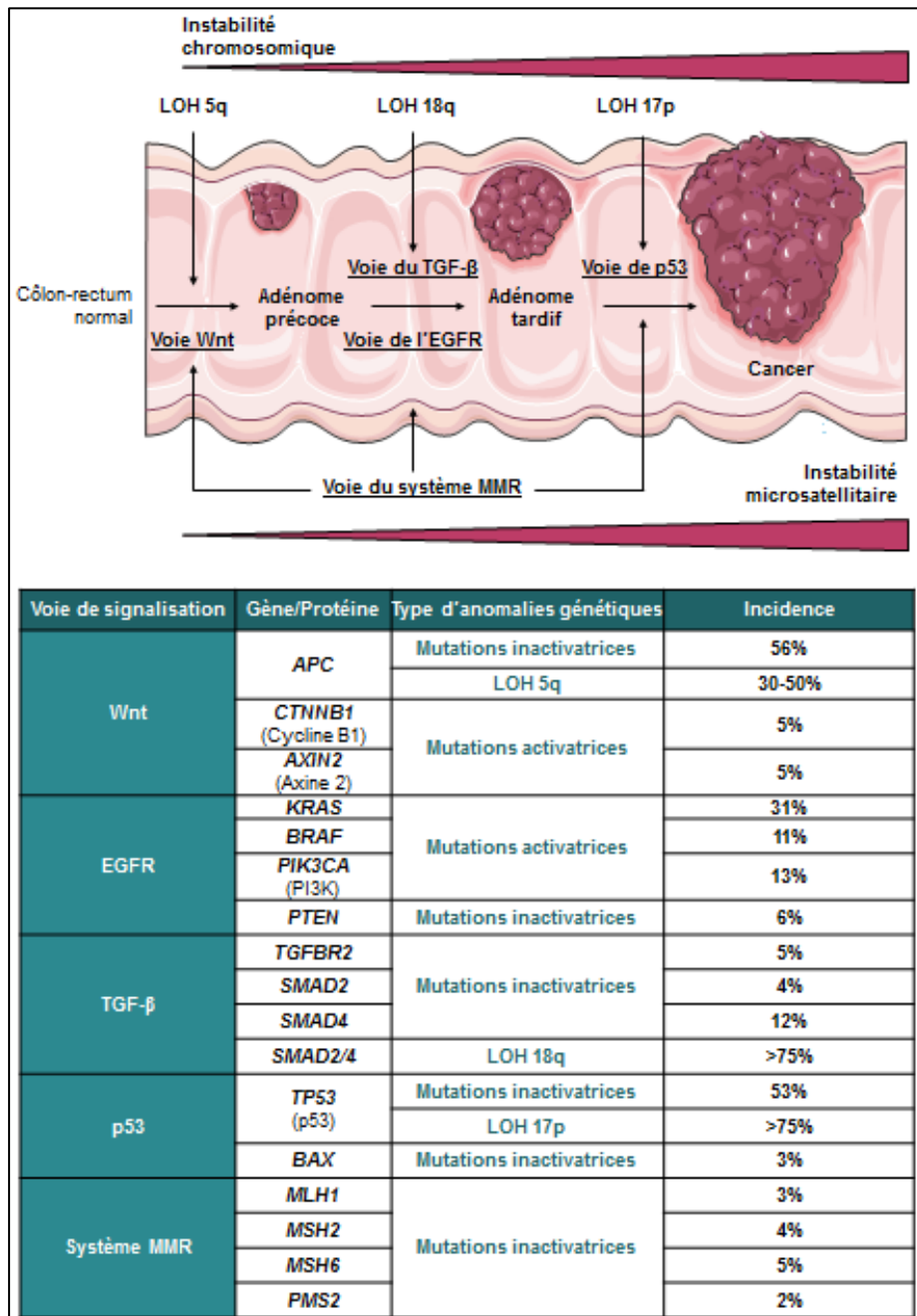


Figure 5 : Processus de cancérisation sporadique du CR. La séquence adénome-carcinome de Fearon et Vogelstein définit les mutations et autres anomalies génétiques séquentielles qui apparaissent au cours de la cancérogenèse colorectale. Cette dernière peut avoir pour origine génétique une instabilité chromosomique ou microsatellitaire. Données issues de COSMIC (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer) (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue>).

APC : Adenomatous Polyposis Coli ; **BAX** : B-cell lymphoma 2-Associated X ; **BRAF** : V-Rapidly Accelerated Fibrosarcoma murine sarcoma viral oncogene homolog B ; **CR** : Côlon Rectum ; **CTNNB1** : CaTeNiN B1 ; **kDa** : kiloDalton ; **KRAS** : V-Ki-ras2 Kirsten RAt Sarcoma viral oncogene homolog ; **LOH** : Loss Of Heterozygoty ; **MLH1** : MutatorL Homolog 1 ; **MMR** : MisMatch Repair ; **MSH** : MutatorS Homolog ; **p53** : protéine de 53 kDa ; **PI3KCA** : PhosphoInositide 3-Kinase Catalytic subunit Alpha ; **PMS2** : PostMeiotic Segregation increased 2 ; **PTEN** : Phosphatase and TENSin homolog ; **SMAD** : Small Mothers Against Decapentaplegic ; **TGFBR2** : Transforming Growth Factor-β Receptor 2 ; **TP53** : Tumor Protein 53 kDa.

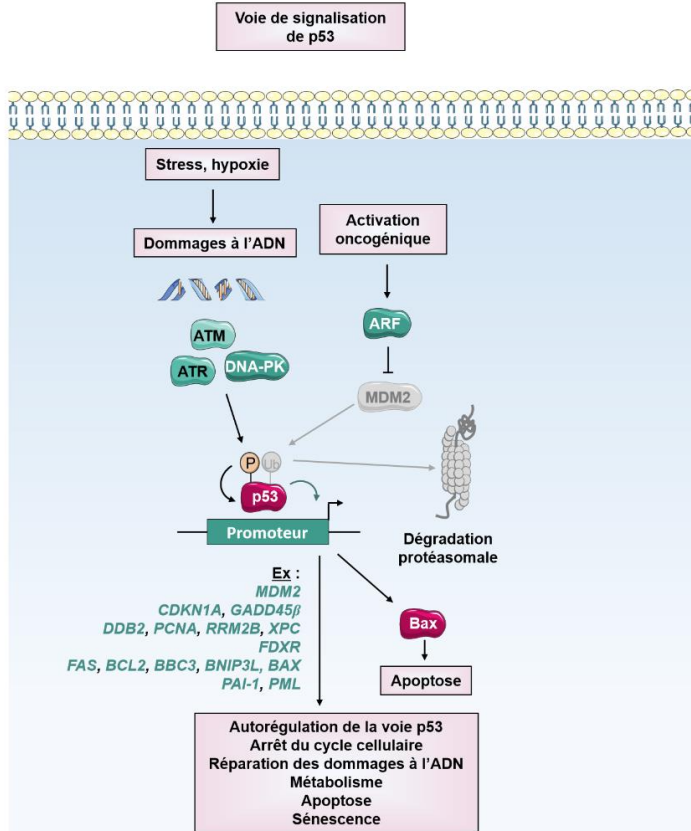
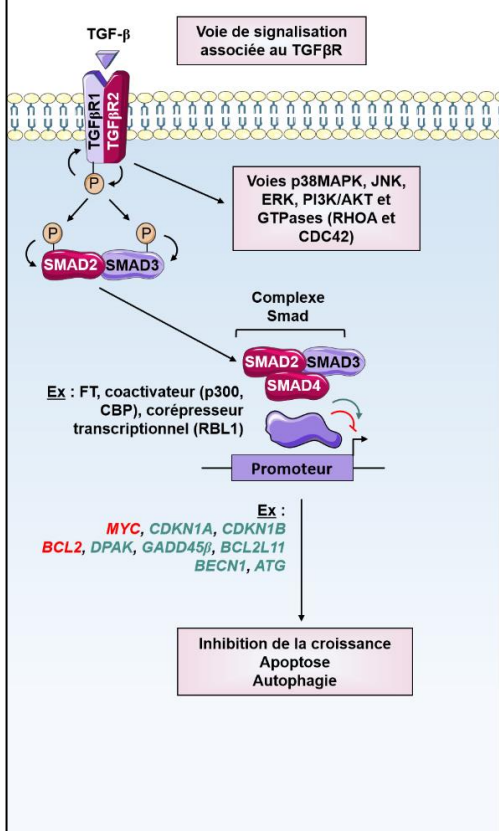
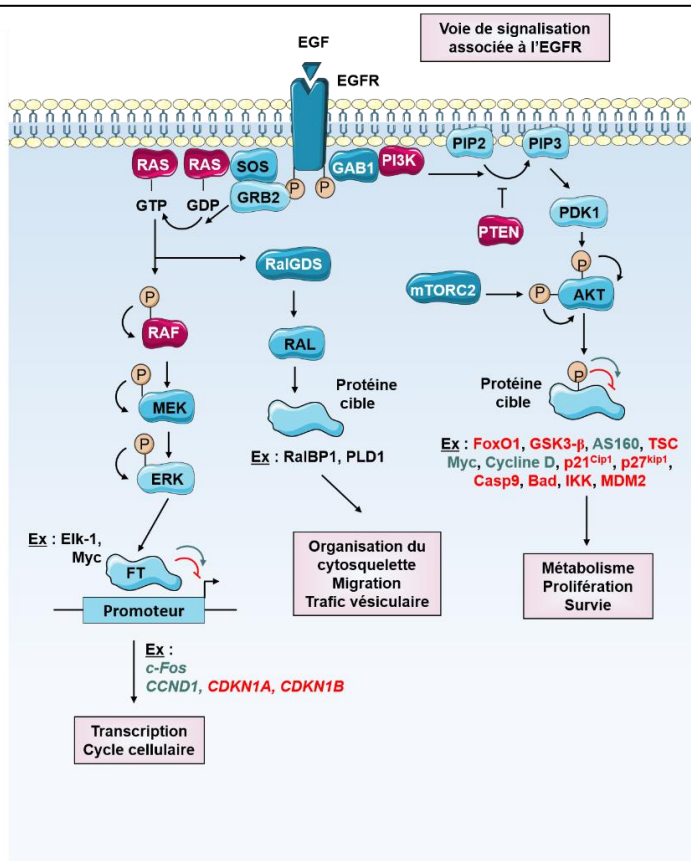
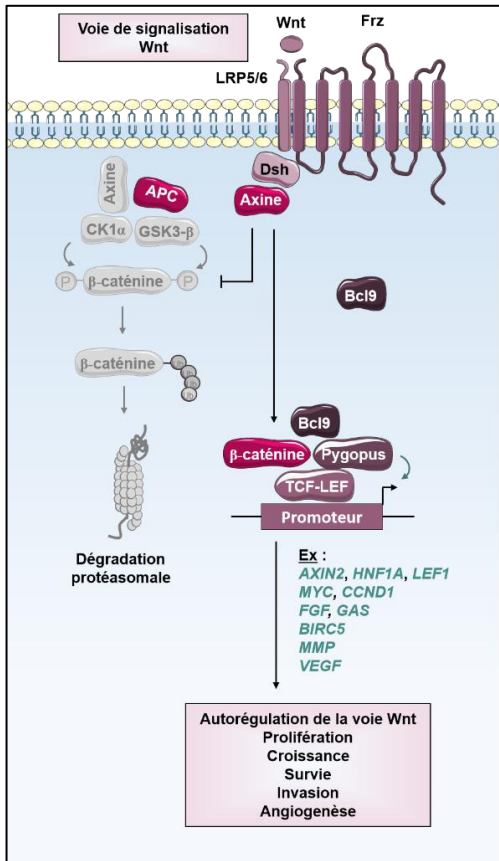


Figure 6 : Voies de signalisation affectées par les anomalies génétiques dans le CCR. Les différentes protéines des voies de signalisation Wnt, de l'EGFR, du TGF-β et de p53 cibles d'anomalies génétiques dans le CCR sont représentées en rose.

ARF : Alternative Reading Frame protein ; **AS160** : AKT Substrate of 160 kDa ; **ATG** : *AuTophagy-related Gene* ; **ATM** : Ataxia Telangiectasia Mutated ; **ATR** : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related ; **Bad** : Bcl-2 associated agonist of cell death ; **BAX** : *BCL2-Associated X* ; **BBC3** : *BCL2 Binding Component 3* ; **Bcl** : B-cell lymphoma ; **BCL2L11** : *BCL2-Like protein 11* ; **BECN1** : *BLC2-intEraCtiNg protein 1* ; **BIRC5** : *Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat-Containing protein 5* ; **BNIP3L** : *BCL2 Interacting Protein 3-Like* ; **Casp9** : Caspase 9 ; **CBP** : C-adenosine monophosphate response element-Binding protein Binding Protein ; **CCND1** : *CyCliNe D1* ; **CDC42** : Cell Division Control protein 42 ; **CDK** : *Cyclin-Dependent Kinase* ; **CDKN** : *CDK Inhibitor* ; **CK1α** : Casein Kinase 1α ; **DDB2** : *DNA Damage-Binding protein 2* ; **DNA** : DeoxyriboNucleic Acid ; **DNA-PK** : DNA-dependent Protein Kinase ; **DPAK** : *Death-Associated Protein Kinase* ; **Dsh** : Disheveled ; **EGF** : Epidermal Growth Factor ; **EGFR** : EGF Receptor ; **Elk-1** : Ets like 1 ; **ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinase ; **FDXR** : FerréDoXine Réductase ; **FoxO1** : Forkhead box O1 ; **Frz** : Frizzled ; **FT** : Facteur de Transcription ; **GAB** : GRB2-Associated-Binding protein ; **GADD45B** : *Growth Arrest and DNA Damage-Inducible 6* ; **GDP** : Guanosine DiPhosphate ; **GRB2** : Growth-factor-Receptor Bound protein 2 ; **GSK3-β** : Glycogène Synthase Kinase 3β ; **GTP** : Guanosine TriPhosphate ; **HNF1α** : *Hepatocyte Nuclear Factor 1α* ; **IKK** : Inhibitory KappaB Kinase ; **JNK** : c-Jun N-ter Kinase ; **kDa** : kiloDalton ; **LEF** : Lymphoid Enhancer Factor ; **LRP** : Lipoprotein Receptor-related Protein ; **MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase ; **MDM 2** : Mouse Double Minute 2 ; **MEK** : MAPK/ERK Kinase ; **MMP** : *Matrix MetalloProteinase* ; **mTORC2** : mammalian Target Of Rapamycin Complex 2 ; **p21^{Cip1}** : protein 21 kDa^{CDK-interaction protein 1} ; **p27^{kip1}** : protein 27 kDa^{Kinase-inhibitory protein 1} ; **p300** : protéine de 300 kDa ; **p38** : protéine de 38 kDa ; **p53** : protéine de 53 kDa ; **PAI-1** : *Plasminogen Activator Inhibitor 1* ; **PCNA** : *Proliferating Cell Nuclear Antigen* ; **PK1** : Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 ; **PI3K** : Phosphoinositide 3-Kinase ; **PI** : PhosphatidylInositol ; **PIP2** : PI-4,5 BisPhosphate ; **PIP3** : PI-3,4,5 TriPhosphate ; **PLD1** : PhosphoLipase D1 ; **PML** : *ProMyelocytic Leukemia* ; **PTEN** : Phosphatase and TENSin homolog ; **RAF** : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma ; **RAL** : RAs-reLated protein ; **RALBP1** : RAL-Binding Protein 1 ; **RalGDS** : Ras-like Guanine nucleotide-Dissociation Stimulator ; **RAS** : RAt Sarcoma ; **RBL1** : RetinoBlastoma-Like 1 ; **RHOA** : Ras HOmolog gene family A ; **RRM2B** : *Ribonucléoside-diphosphate Réductase 2B* ; **SMAD** : Small Mothers Against Decapentaplegic ; **SOS** : Son Of Sevenless ; **TCF** : T Cell Factor ; **TGF-β** : Transforming Growth Factor β ; **TGFβR** : *TGF-β Receptor* ; **TSC** : Tuberous SCLerosis protein ; **VEGF** : *Vascular Endothelial Growth Factor* ; **Wnt** : Wingless integration ; **XPC** : *Xeroderma Pigmentosum, complementation C*.

Enfin, RalGDS active **RAL (RAS-reLated protein)** qui régule l'organisation du cytosquelette, la migration et le trafic vésiculaire (Pino and Chung, 2010; Poulogiannis et al., 2012; Wee and Wang, 2017) (Figure 6). Des mutations activatrices des gènes codant les proto-oncogènes **KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten RAS viral oncogene homolog)** (31% des cas), **BRAF (V-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog)** (11%) et **PI3K** (13%), et des mutations inactivatrices du suppresseur de tumeur **PTEN** (6%) sont associées au CCR et sont responsables d'une suractivation de la voie pro-tumorale de l'EGFR (Figure 5).

Après liaison du ligand TGF- β sur ses récepteurs **TGF β R1 (TGF- β Receptor 1)** et **TGF β R2**, **TGF β R1** est activé par **TGF β R2**. **TGF β R1** phosphoryle et active alors **SMAD2 (Small Mothers Against Decapentaplegic homolog 2)** et **SMAD3** qui, avec **SMAD4**, forment un complexe Smad. Dans le noyau, ce complexe interagit avec d'autres facteurs de transcription ainsi que des co-activateurs au niveau des promoteurs des gènes cibles afin d'inhiber la croissance et d'activer l'apoptose ou l'autophagie (Ikushima and Miyazono, 2010). La signalisation du TGF- β active également des voies non-Smad telles que **p38MAPK**, **JNK (c-Jun N-ter Kinase)**, **ERK**, **PI3K/AKT** et des petites **GTPases (Guanosine TriPhosphatases)** incluant **RHOA (RAS HOmolog gene family member A)** et **CDC42 (Cell Division Control protein 42)** (Figure 6). Ainsi, une inactivation de la voie anti-tumorale du TGF- β est observée dans les tumeurs colorectales et a pour origine des mutations inactivatrices des gènes suppresseurs de tumeurs **TGF β R2** (5%), **SMAD2** (4%) ou encore **SMAD4** (12%) (Figure 5).

2.2.3. Voie de signalisation de la protéine de 53 kilodaltons (p53)

En réponse à différents signaux de stress cellulaire ayant pour médiateurs **ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated)**, **ATR (Ataxia Telangiectasia and Rad3-related)**, **ARF (Alternative Reading Frame protein)** ou encore **DNA-PK (DeoxyriboNucleic Acid-dependent Protein Kinase)**, le facteur de transcription **p53** est stabilisé et activé par phosphorylation et inhibition de son ubiquitination par l'ubiquitine ligase **MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog)**. L'activation de **p53** induit alors l'expression de gènes impliqués dans l'autorégulation de la voie **p53**, l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN, l'apoptose ou encore la sénescence (Reinhardt and Schumacher, 2012; Fischer, 2017) (Figure 6). Des mutations inactivatrices du gène codant le suppresseur de tumeur **p53** sont très fréquemment identifiées dans le CCR (53% des cas) (Figure 5).

Deux processus génétiques distincts sont impliqués dans la séquence adénome-carcinome : l'instabilité chromosomique et l'instabilité microsatellitaire. Ces derniers seront détaillés dans la section suivante.

2.3. Instabilité génétique du CCR

2.3.1. Généralités et inactivation du système MisMatch Repair (MMR)

Instabilité chromosomique

Quatre-vingt à 85% des CCR sporadiques présentent une instabilité chromosomique **CIN** (Chromosomal **IN**stability) et se caractérisent par un phénotype **LOH** (Loss Of Heterozygoty). Ces tumeurs sont caractérisées par des pertes alléliques, un nombre anormal de chromosomes ainsi que des réarrangements chromosomiques. En revanche, elles ne possèdent pas de mutations au niveau des régions microsatellitaires et présentent donc un phénotype **MSS** (MicroSatellite Stable).

Dans 75% des tumeurs colorectales, les pertes alléliques concernent le bras court du chromosome 17 (17p sur lequel est localisé le gène **TP53**, *Tumor P53*) et le bras long du chromosome 18 (18q incluant les gènes **SMAD2** et **SMAD4**). Dans 30 à 50% des tumeurs, elles concernent les bras 5q (contenant le gène **APC**), 8p, 18p et 22q (Vogelstein et al., 1989). Les mutations de **TP53** et de **KRAS**, mutuellement exclusive avec la mutation **BRAF** (Rajagopalan et al., 2002), sont également retrouvées dans les tumeurs colorectales avec un phénotype CIN (Samuels et al., 2004). L'inactivation d'**APC** est elle-même responsable d'instabilité chromosomique car elle induit des défauts de mitose et d'apoptose et favorise la polyploïdie (Dikovskaya et al., 2007) (Figure 5). La mutation germinale du gène **APC** est associée au syndrome héréditaire de la PAF (de la Chapelle, 2004).

Instabilité microsatellitaire

Les microsatellites sont des séquences répétées courtes de 1 à 6 nucléotides majoritairement localisées dans les régions non-codantes de l'ADN (Ellegren, 2004). Environ 15 à 20% des CCR sporadiques présentent un phénotype **MSI** (MicroSatellite Instable) caractérisé par une instabilité nucléotidique générale qui est davantage marquée au niveau des microsatellites. Cette instabilité est généralement due à un défaut de réparation des dommages à l'ADN par le système **MMR** (MisMatch Repair) (Figure 7).

L'instabilité microsatellitaire peut être due à des mutations de gènes codant pour les enzymes **MLH1** (Mut (Mutator) L Homolog 1), **MSH2** (MutS Homolog 2), **MSH6** ou **PMS2** (PostMeiotic Segregation increased 2). Le phénotype MSI peut également avoir pour origine l'hyperméthylation et l'inactivation des promoteurs **MLH1** et **MSH2** (Veigl et al., 1998; Ligtenberg et al., 2009). La délétion de la région 3' du gène **EPCAM** conduirait à l'inactivation épigénétique de ce gène ainsi que du gène **MSH2** voisin (Ligtenberg et al., 2009). L'inactivation du système MMR conduit à l'accumulation de mutations secondaires, le plus souvent dans les gènes **AXIN2** (Liu et al., 2000), **CTNNB1** (*CaTeNiN Beta 1*) (Mirabelli-Primdahl et al., 1999), **BRAF** (Rajagopalan et al., 2002), **PI3KCA** (*PI3K Catalytic subunit Alpha*) (Samuels et al., 2004), **PTEN** (Goel et al., 2004), **TGFBR2** (Markowitz et al., 1995) et **BAX** (*BCL2-Associated X*) (Rampino et al., 1997) aboutissant à la transformation de la cellule (Figure 5). La mutation germinale d'un des gènes **MMR** est associée au syndrome héréditaire de Lynch (de la Chapelle, 2004).

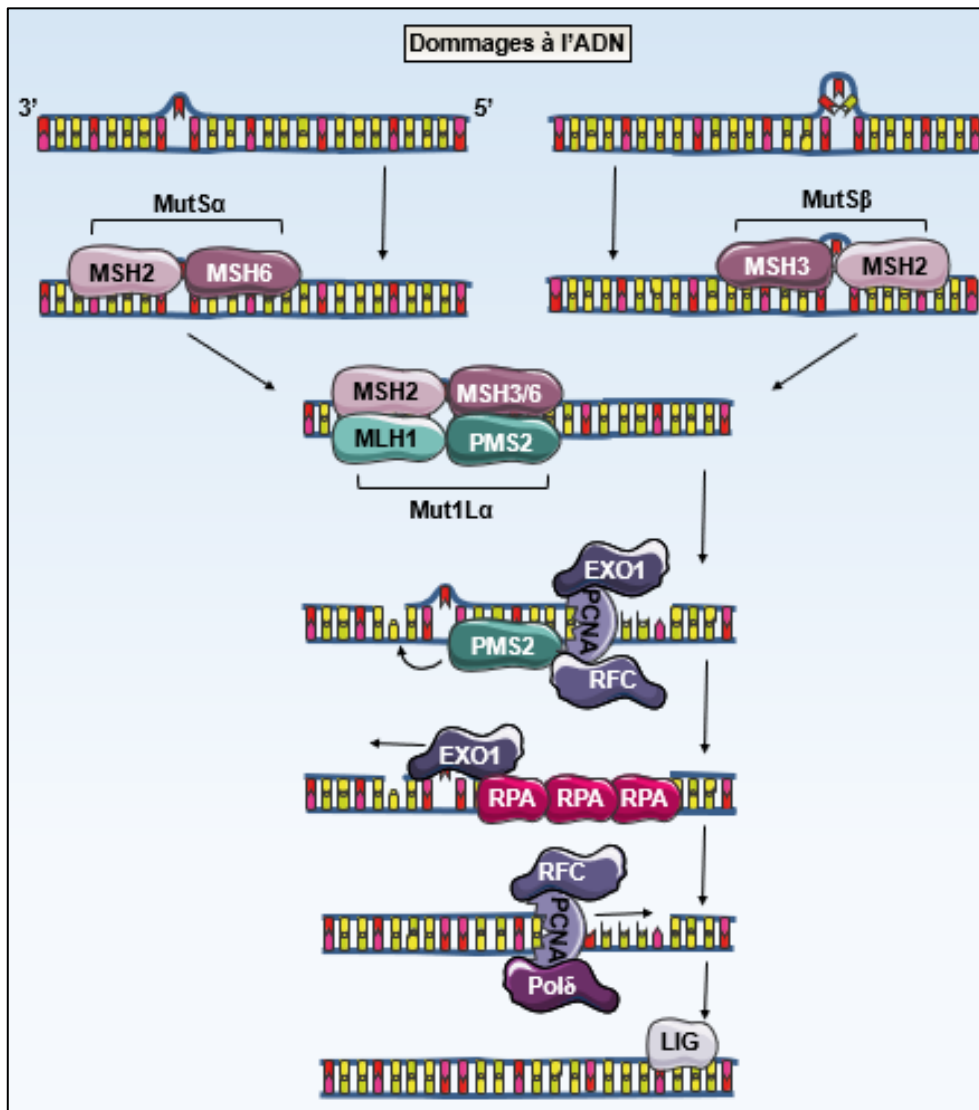


Figure 7 : Mécanisme de réparation des dommages à l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) par le système MisMatch Repair (MMR). La première étape du système MMR implique la reconnaissance des mésappariements de bases et des petites structures en épingles dues à des IDL de bases inférieure ou supérieure à deux respectivement par les complexes protéiques MutS α et MutS β composés des hétérodimères MSH2/MSH6, et MSH2/MSH3. La deuxième étape implique la reconnaissance de MutS par un deuxième complexe, MutL α , formé par l'hétérodimère MLH1/PMS2. Le recrutement et l'interaction de RFC et PCNA avec MutL α active l'activité endonucléasique de PMS2 nécessaire à l'excision en 3' du mésappariement. S'en suit le recrutement de l'exonucléase 5'-3' EXO1 qui excise le brin d'ADN contenant le mésappariement et des protéines RPA qui protègent l'ADN simple brin généré de la dégradation. POL δ et LIG permettent enfin de synthétiser et de relier le nouveau brin d'ADN.

ADN : Acide DésoxyriboNucléique ; **EXO1** : EXOnucléase 1 ; **IDL** : Insertion-Deletion Loop ; **LIG** : ADN LIGase ; **MLH1** : MutL Homolog 1 ; **MMR** : MisMatch Repair ; **MSH** : MutS Homolog ; **Mut** : Mutator ; **PCNA** : Proliferating Cell Nuclear Antigen ; **PMS2** : PostMeiotic Segregation increased 2 ; **POL δ** : ADN POLymérase δ ; **RFC** : Replication Factor C ; **RPA** : Replication Protein A.

2.3.2. Méthylation des îlots de Cytidine-phosphate-Guanosine (CpG)

L'analyse des mécanismes d'inactivation simultanée des gènes a abouti à l'identification du phénotype de la voie de méthylation des îlots **CpG** (Cytidine-phosphate-Guanosine) **CIMP** (CpG Island Methylator Phenotype) comme troisième sous-classe des tumeurs colorectales (Toyota et al., 1999). Cette voie représenterait 15 à 30% des tumeurs sporadiques (Curtin et al., 2011).

Les tumeurs CIMP-H sont caractérisées par la méthylation du gène *MLH1* à l'origine d'un phénotype MSI ainsi que la mutation du gène *BRAF*, et les tumeurs **CIMP-L** (**CIMP-Low**) par la mutation du gène *KRAS* (Shen et al., 2007). D'autres études ont identifié la méthylation des gènes *CDKN2A* (*CDK* (Cyclin Dependent Kinase) *iNhibitor 2A*), *IGF2* (*Insulin like Growth Factor 2*), *MINT1* (*Methylated IN Tumors 1*), *MINT2*, *MINT31*, *RUNX3* (*RUNT related transcription factor 3*), *SOCS1* (*Suppressor Of Cytokine Signaling 1*) et *NEUROG1* (*NEUROGénine 1*) respectivement comme marqueur des phénotypes CIMP-H et CIMP-L (Kaneda and Yagi, 2011; Curtin et al., 2011).

2.3.3. Autres polymorphismes nucléotidiques

Les CCR familiaux sans syndrome héréditaire seraient causés par des polymorphismes nucléotidiques (**SNP**, Single-Nucleotide Polymorphism) dans des allèles moins pénétrants que *APC* ou *MMR* tels que *CCND1* (*CyCline D1*), *HRAS1* (*Harvey RAT Sarcoma viral oncogene homolog 1*), *TGFBR1* ou encore *BLM* (*BLoom syndrome*) (de la Chapelle, 2004).

3. Classifications cliniques et traitements

3.1. Classifications cliniques

En clinique, il est primordial de classer les CCR afin d'orienter les stratégies thérapeutiques. La stadification pathologique du CCR est complexe et plusieurs systèmes de classification clinique se sont succédés depuis le siècle dernier.

Anciennes classifications (1932-1959)

En 1932, Dukes développe la classification pour le cancer rectal qui sera adaptée par la suite en 1949 au cancer colique par Kirklin (Kirklin et al., 1949). Elle prendra en compte la profondeur de pénétration de la tumeur dans la paroi colorectale et la présence ou non de métastases au niveau des ganglions lymphatiques locorégionaux. Ainsi, les stades A, B et C définissent respectivement des tumeurs restreintes à la muqueuse, la sous-muqueuse ou la musculuse, pénétrant la séreuse et infiltrant les ganglions (Dukes, 1932).

En 1952, Astler et Collier sous-classent le stade C selon l'importance de la profondeur de pénétration de la tumeur (Astler and Collier, 1954). Les stades C1 et C2 correspondent alors à des tumeurs métastatiques au niveau des ganglions lymphatiques dont la tumeur primaire est, respectivement, restreinte à la musculuse et pénétrant la séreuse de la paroi colorectale.

Actuelle classification Tumor-Node-Metastasis (1959-)

Les classifications de Dukes et, d'Astler et Collier furent longtemps utilisées mais sont depuis supplantées par la classification **TNM (Tumor-Node-Metastasis)** introduite en 1959 par le comité mixte Américain sur le cancer (**AJCC, American Joint Committee on Cancer**). Celle-ci est plus détaillée et mesure l'envahissement de la tumeur primaire (T), l'envahissement et le nombre de ganglions lymphatiques locorégionaux touchés (N) et la dissémination métastatique dans les organes secondaires (M), généralement dans le foie (37% des cas), les poumons (13%), le péritoine (11%) et les ovaires (8%) (Xiu et al., 2017) (**Figure 8**).

Pour chaque paramètre clinique, un numéro est donné en fonction de l'avancement tumoral et leur combinaison détermine un stade. Le stade 0 définit des carcinomes *in situ* restreint à la muqueuse colorectale ; les stades I et II des tumeurs envahissant la paroi colorectale de la sous-muqueuse jusqu'à la sous-séreuse et parfois même le péritoine viscéral ou un organe voisin ; le stade III un envahissement des ganglions locorégionaux et enfin le stade IV la présence de métastases (**Figure 8**).

Selon les données de 2018 de l'**INCa**, la répartition de ces stades au diagnostic est équilibrée avec 21,7% de stades I, 23,6% de stades II, 21,6% de stades III et 33,1% de stades IV et cancers non réséqués.

3.2. Traitements

Le pronostic du CCR est étroitement lié au stade tumoral au moment du diagnostic. En effet, le CCR est de bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué à un stade précoce avec une survie à 5 ans de 89,9% pour les stades I et II, de 71,3% pour le stade III et seulement de 13,9% pour le stade IV (Howlader A et al., 2017). La résection chirurgicale totale ou segmentaire est le traitement de première intention du CCR et consiste à enlever la portion du côlon-rectum atteinte par la tumeur primaire ainsi que le réseau ganglionnaire qui en dépend. Cette résection est indiquée pour les CCR de stades I et II précocement diagnostiqués et est suivie d'une chimiothérapie adjuvante pour les stades II à haut risque et III afin de réduire les récurrences (**Figure 10**). En effet, pour les stades II à haut risque et III, le taux de récurrence à 5 ans après chirurgie est de 9,5% et 35,7% respectivement (Tsikitis et al., 2009) et le taux de survie à 5 ans après traitement par chimiothérapie adjuvante est augmenté de 19,0% et 37,8% respectivement (van Erning et al., 2013; Casadaban et al., 2016). Pour le stade IV métastatique, le traitement est adapté en fonction du patient avec une chimiothérapie et/ou des thérapies ciblées adjuvantes ou néoadjuvantes ayant pour but de réduire le volume tumoral et rendre résécables les tumeurs qui ne le sont pas initialement (**Figure 10**). En effet, au moment de leur diagnostic, respectivement 14,5% et 27,5% seulement des CCR de stade IV avec des métastases hépatiques ou pulmonaires sont résécables d'emblée (Patel et al., 2016).

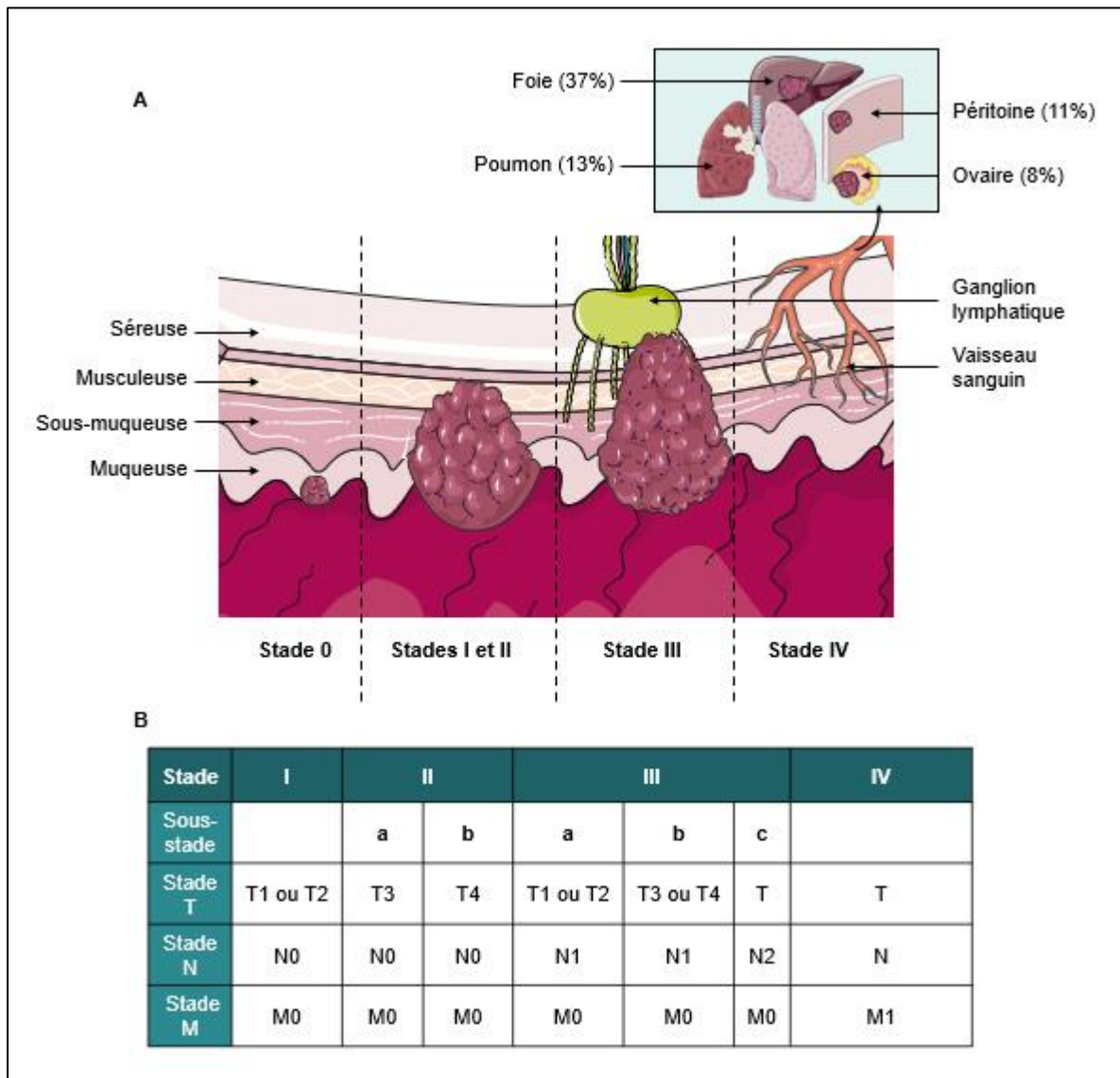


Figure 8 : Stades du CR selon la classification actuelle Tumor-Node-Metastasis (TNM). (A) Schéma des stades de la classification TNM qui dépend de l’envahissement par le CCR de la muqueuse, de la sous-muqueuse jusqu’à la sous-séreuse voire aux organes voisins, des ganglions lymphatiques puis des organes distants (foie, poumon, péritoine et ovaires). (B) Tableau récapitulatif des stades et sous-stades de CCR selon la classification TNM. Pour le stade T (tumeur primaire), le stade T1 correspond à l’envahissement de la sous-muqueuse, T2 de la musculature, T3 de la sous-séreuse, T4 de la séreuse ou d’un organe voisin et T à n’importe quel stade de la tumeur. Pour le stade N (ganglions lymphatiques locorégionaux), le stade N0 correspond à l’absence d’envahissement ganglionnaire, N1 à l’envahissement de 1 ou 3 ganglions lymphatiques locorégionaux, N2 de 4 ou plus et N à n’importe quel stade d’envahissement. Enfin, pour le stade M (métastase à distance), le stade M0 correspond à l’absence de métastase à distance et M1 à la présence de métastase(s) à distance.

CCR : Cancer ColoRectal ; **TNM** : Tumor-Node-Metastasis.

3.2.1. Chimiothérapie à base de 5-FluoroUracile (5-FU)/LeucoVorine (LV)

Depuis 1957 et pendant quatre décennies, le **5-FU (5-FluoroUracile)** a été le seul agent chimiothérapeutique disponible pour le traitement du CCR (**Figures 11, 12 et 13**).

A la fin des années 1990, le 5-FU a été associé à la **LV (LeucoVorine** encore appelée **FOL**, acide **FOLinique**, Lederfoline®), une source de folates réduits qui agit comme biomodulateur en augmentant l'efficacité du 5-FU. Le régime 5-FU/LV est actuellement utilisé comme traitement de référence de première intention puisqu'il a montré une amélioration du taux de réponse des CCR avancés de 11% pour le 5-FU seul à 21% pour le régime 5-FU/LV ([Thirion et al., 2004](#)) (**Figures 11 et 12**). Les protocoles actuels consistent en une perfusion **IV (IntraVeineuse)** de LV pendant 2 heures, une injection bolus IV de 5-FU suivie d'une perfusion IV continue de 5-FU pendant plusieurs heures sur 2 jours consécutifs toutes les 2 semaines. Les concentrations des drogues et les temps de traitement dépendent des associations chimiothérapeutiques choisies.

Afin d'augmenter la tolérance et les concentrations tumorales de 5-FU, des prodrogues dérivées du 5-FU telles que la capécitabine (Xeloda®) et le tégafulur (Ftorafur®) ont été développées ([Van Cutsem et al., 2001](#); [Douillard et al., 2002](#)) (**Figures 11 et 12**). Contrairement au 5-FU, la capécitabine et l'association **UFT® (Uracile/FTorafur)/LV** sont administrées par voie orale puis absorbées au niveau digestif et enfin métabolisées en 5-FU préférentiellement aux niveaux hépatique et tumoral. Comparées au régime 5-FU/LV, ces prodrogues diminuent les toxicités liées au 5-FU mais n'augmentent pas le taux de réponse des CCR métastatiques ([Van Cutsem et al., 2001](#); [Douillard et al., 2002](#)). Enfin, le TAS-102 (Lonsurf®) peut être administré en dernière ligne de traitement. Le TAS-102 est l'association **TFT (TriFluoroThymidine)/tipiracil**, respectivement un analogue fluoré de la thymidine et un inhibiteur de l'enzyme catabolique **TP (Thymidine Phosphorylase)**, qui provoque des dommages à l'ADN ([Moriarity et al., 2016](#)) (**Figures 11 et 12**).

3.2.2. Autres chimiothérapies

Dans les années 2000, plusieurs autres agents chimiothérapeutiques sont apparus et les traitements de référence actuels en première ligne combinent le régime 5-FU/LV avec l'**OX (OXalipatine, Eloxatine®)**, un agent alkylant dérivé du platine de troisième génération (régime FOLFOX), ou l'**IRI (IRInotécan, Campto®)**, un inhibiteur de **Top1 (Topoisomérase 1)** (régime FOLFIRI) (**Figures 11 et 12**). En effet, ces combinaisons de chimiothérapies ont augmenté le taux de réponse des CCR avancés jusqu'à environ 50% ([de Gramont et al., 2000](#); [Saltz et al., 2000](#)).

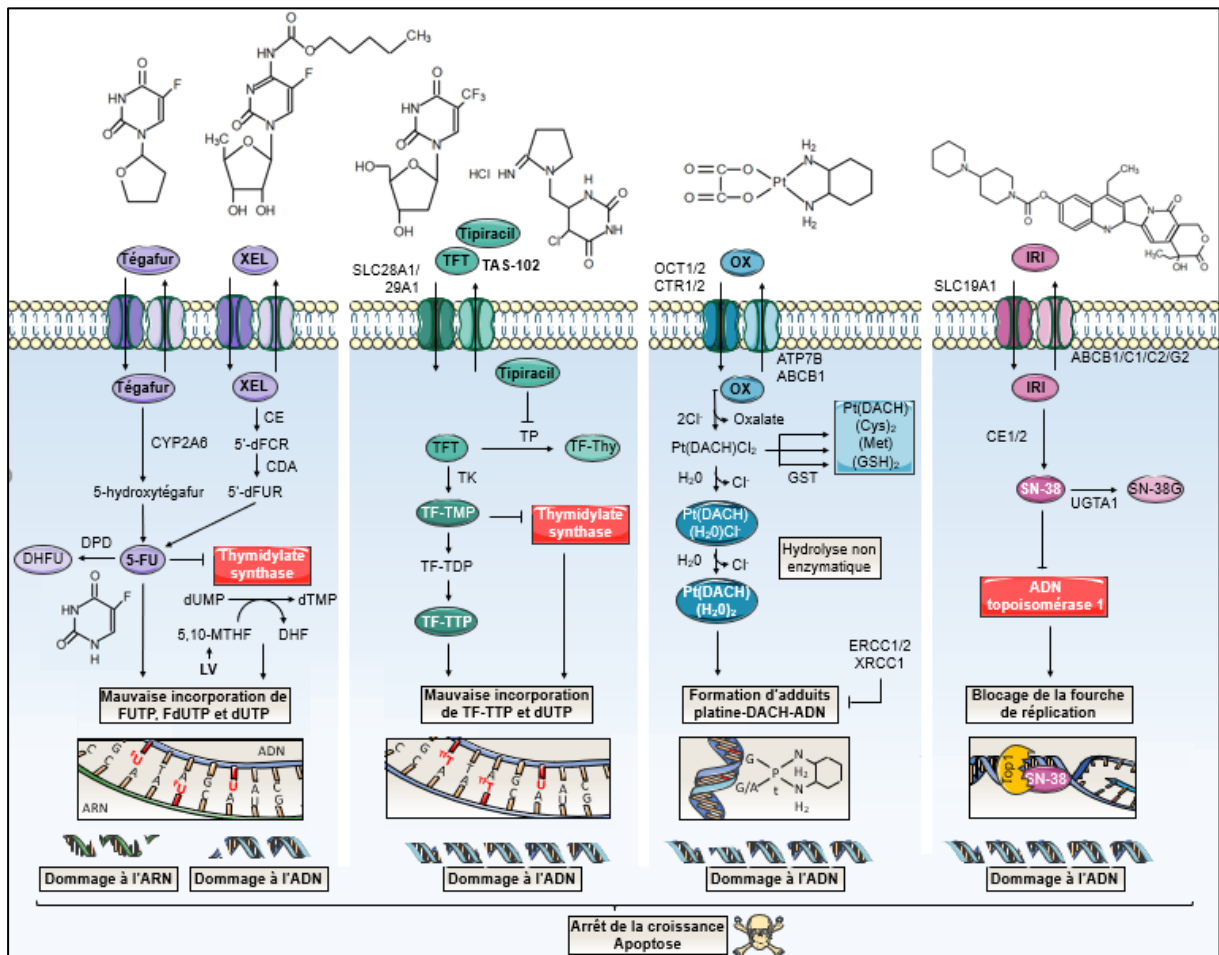


Figure 9 : Métabolisme des chimiothérapies du CCR. Les principaux agents chimiothérapeutiques administrés pour le traitement du CCR sont le 5-FU, l'OX et l'IRI. Le tégaful et la capécitabine (XEL) sont des prodrogues du 5-FU. Enfin, l'association TFT/tipiracil constitue la chimiothérapie TAS-102. Les voies anaboliques et cataboliques de ces agents chimiothérapeutiques sont respectivement représentées de couleurs foncées et claires. Figure adaptée de [Very et al., 2017](#).

5,10-MTHF : 5,10-MéthylèneTrétraHydroFolate ; **5'-dFCR** : 5'-désoxy-5-FluoroCytidine ; **5'-dFUR** : 5'-désoxy-5-FluoroUridine ; **5-FU** : 5-FluoroUracile ; **ABC** : ATP-Binding Cassette ; **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique ; **ARN** : Acide RiboNucléique ; **ATP** : P-type Adenosine triphosphatase Transporter ; **CCR** : Cancer ColoRectal ; **CDA** : Cytidine DésAminase ; **CE** : CarboxylEstérase ; **Cl** : Chlore ; **CTR** : Copper Transporter ; **CYP2A6** : CYtochrome P450 2A6 ; **Cys** : Cystéine ; **DACH** : 1,2-DiAminoCycloHexane ; **DHF** : DiHydroFolate ; **DHFU** : 5,6-DiHydro-5-FluoroUracile ; **DPD** : DihydroPyrimidine Déshydrogénase ; **dTMP** : désoxyTMP ; **dUMP** : désoxyUridine MonoPhosphate ; **dUTP** : désoxyUridine TriPhosphate ; **ERCC** : Excision Repair Cross-Complementation ; **FdUTP** : 5-FluorodUTP ; **FUTP** : 5-FluoroUridine TriPhosphate ; **GSH réduit** : Glutathion S-Transférase ; **IRI** : IRInotécan ; **LV** : LeucoVorine ; **Met** : Méthionine ; **OCT** : Organic Cation Transporter ; **OX** : Oxaliplatine ; **Pt** : Platine ; **SLC** : SoLute Carrier ; **SN-38G** : SN-38 Glucuronide ; **TDP** : Thymidine DiPhosphate ; **TF** : TriFluoro ; **TFT** : TFThymidine ; **Thy** : Thymine ; **TK** : Thymidine Kinase ; **TMP** : Thymidine MonoPhosphate ; **Top1** : Topoisomérase 1 ; **TP** : Thymidine Phosphorylase ; **TTP** : Thymidine TriPhosphate ; **UGT1A1** : Uridine diphosphate GlucuronosylTransférase 1 polypeptide A1 ; **XEL** : XELOda® ; **XRCC1** : X-ray Repair Cross Complementing 1.

3.2.3. Thérapies ciblées

En seconde ligne de traitement et pour les CCR métastatiques, des thérapies ciblées peuvent également être indiquées.

Le bevacizumab (Avastin®) et le ramucirumab (Cyramza®), le cetuximab (Erbix®) et le panitumumab (Vectibix®) sont des anticorps monoclonaux respectivement dirigés contre le **VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)** et le récepteur EGFR. En effet, le VEGF et l'EGFR sont surexprimés dans le CCR et impliqués respectivement dans l'angiogenèse et la prolifération tumorales (Spano et al., 2005; Wang et al., 2014). Seuls les patients ayant une tumeur avec des gènes *RAS* et *BRAF* non mutés peuvent bénéficier des traitements à base de cetuximab ou panitumumab (Gong et al., 2016). Le ziv-aflibercept (Zaltrap®) est quant à lui une protéine de fusion dirigée contre le VEGF. Le régorafénib (Stivarga®) est une petite molécule inhibitrice de multiples kinases impliquées dans la croissance et l'angiogenèse tumorales (B-RAF, **FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor)**, **KIT**, **PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor)**, **RET (REarranged during Transfection)**, **TIE2 (Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains-2)** ou **VEGFR (VEGF Receptor)**). Enfin, en dernière ligne de traitement, le pembrolizumab (Keytruda®) est un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur **PD-1 (Programmed cell Death 1)** exprimé à la surface des **LT (Lymphocytes T)**. Ce traitement d'immunothérapie a pour but de lever l'inactivation des LT induite par la liaison de PD-1 avec la protéine **PD-Ligand 1 (PD-L1)** présente sur la cellule cancéreuse (**Figure 10**).

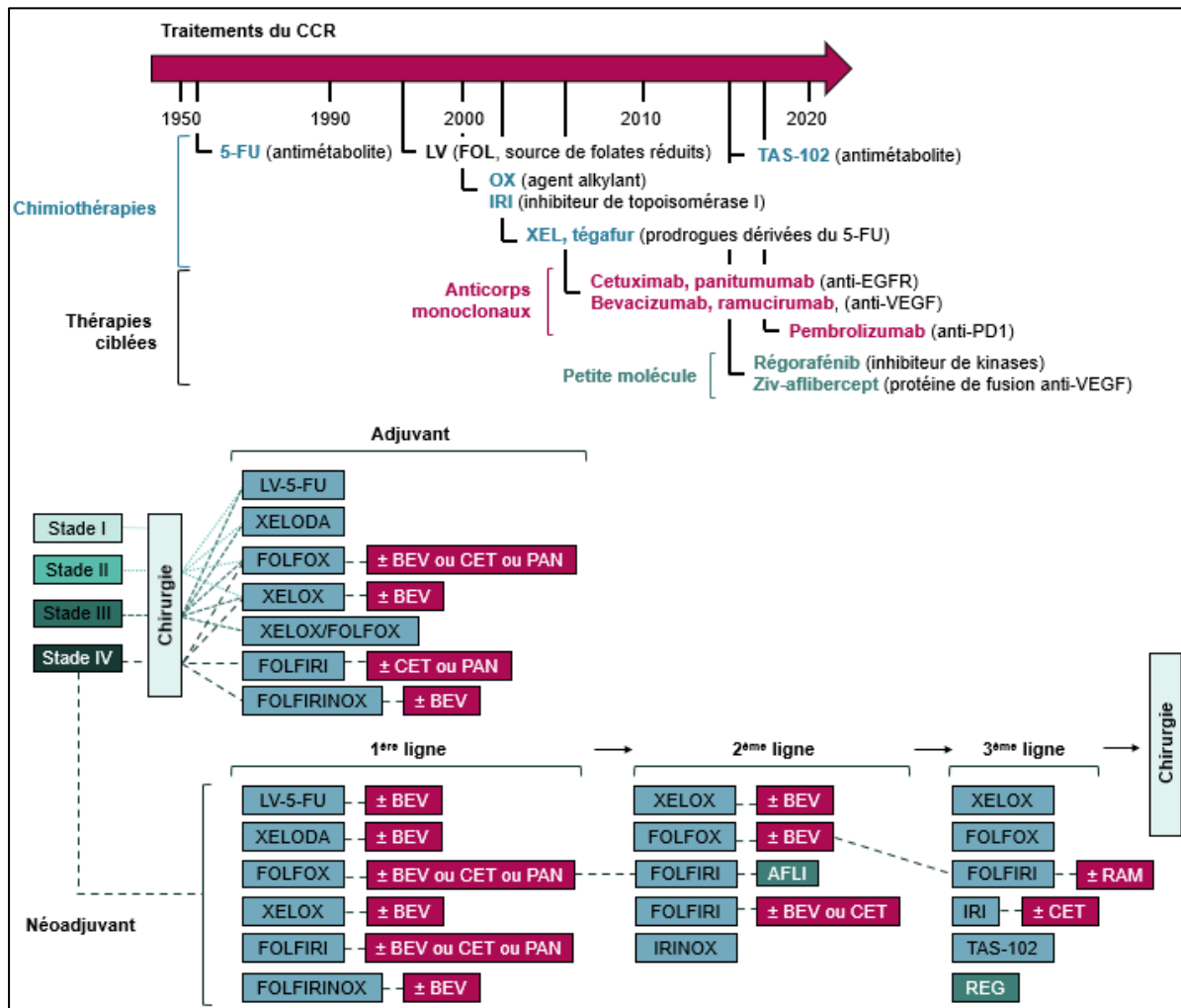


Figure 10 : Traitements du CCR selon la classification actuelle TNM. Chronologie d'utilisation des différentes thérapies du CCR. Options thérapeutiques adjuvantes et néoadjuvantes en 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} lignes de traitement du CCR en France (les pointillés indiquent les traitements successifs). A l'heure actuelle, le pembrolizumab n'a pas obtenu l'AMM européenne. Données issues de la [SNFGE \(https://www.snfge.org/content/4-cancer-colorectal-metastatique\)](https://www.snfge.org/content/4-cancer-colorectal-metastatique).

5-FU : 5-FluoroUracile ; **AFLI** : Ziv-AFLIbercept ; **AMM** : Autorisation de Mise sur le Marché ; **BEV** : BEVacicizumab ; **CCR** : Cancer ColoRectal ; **CET** : CETuximab ; **F** : 5-FU ; **FOL** : acide FOLinique ; **IRI** : IRInotécan ; **LV** : LeucoVorine ; **PAN** : PANitumumab ; **RAM** : RAMucirumab ; **REG** : REGorafénib ; **SNFGE** : Société Nationale Française de Gastro-Entérologie ; **TNM** : Tumor-Node-Metastasis ; **XEL** : XELoda®.

Chapitre 2 :

Le 5-FluoroUracile (5-FU)

Chapitre 2 : Le 5-FluoroUracile (5-FU)

1. Pharmacologie

1.1. Intérêt médical et structure

Intérêt médical

L'intérêt médical de l'utilisation d'analogues d'Uracile (**U**) comme agent anti-cancéreux est basé sur les observations initiales dans les années 1950 de Rutman et collaborateurs (1953) et Heidelberger et collaborateurs (1957). Ils ont montré que les cellules d'hépatome de rat (*Rattus norvegicus*) utilisent davantage l'uracile que les cellules non malignes pour la biosynthèse des acides nucléiques (Rutman et al., 1953; Charles Heidelberger et al., 1957). En 1957, Heidelberger et collaborateurs synthétisent le 5-FU, un analogue fluoré de l'uracile qui est depuis, l'agent chimiothérapeutique de référence dans le traitement du CCR (C. Heidelberger et al., 1957) (**Figures 10 et 11**). Le 5-FU est également couramment utilisé dans le traitement d'autres tumeurs solides telles que celles du sein, du système gastro-intestinal (anus, œsophage, pancréas, estomac), de la tête, du cou et de l'ovaire.

Structure

Le 5-FU appartient à la classe des antimétabolites anti-pyrimidiques qui se distingue de l'uracile par la substitution sur le Carbone en position 5 (**C₅**) du noyau pyrimidique d'un atome d'Hydrogène (**H**) par un atome de Fluor (**F**) (**Figure 11**). Ce dernier a un volume voisin de celui de l'hydrogène mais une réactivité chimique très différente. Notamment, l'atome F possède un plus fort potentiel attracteur d'électrons lui permettant de stabiliser l'interaction avec la **TS** (Thymidylate Synthase) (Avendaño and Menéndez, 2015).

1.2. Pharmacocinétique et toxicités

1.2.1. Pharmacocinétique et distribution tissulaire

Après injection en IV en bolus, la demi-vie plasmatique du 5-FU est de l'ordre de 10 minutes (Fraile et al., 1980). Il est estimé qu'entre 80-85% de la dose initiale administrée de 5-FU sont directement inactivés par la voie catabolique majoritairement au niveau hépatique et qu'une faible proportion (10%) est directement excrétée dans les urines au cours des six premières heures (Heggie et al., 1987). Le catabolisme du 5-FU entraîne la formation de métabolites inactifs dont les produits finaux sont 15% d'urée et de **FBAL** (α -Fluoro-Béta-Alanine) (**Figure 11**) également excrétés dans les urines (Heggie et al., 1987) et 60-80% de dioxyde de carbone (CO₂) exhalé par voie respiratoire pendant 24 heures (Chaudhuri et al., 1958).

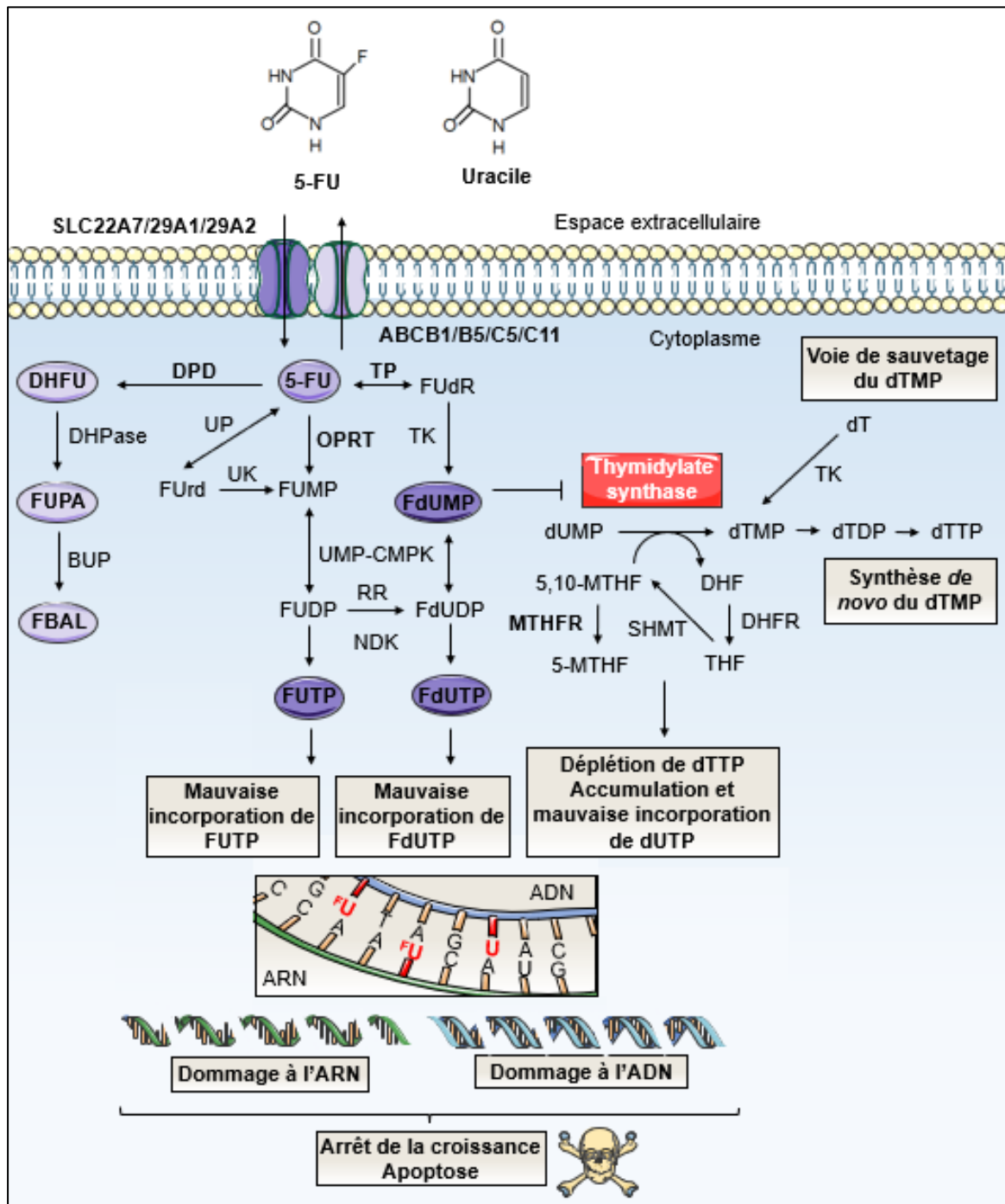


Figure 11 : Métabolisme du 5-FluoroUracile (5-FU). Les voies anaboliques et cataboliques du 5-FU sont respectivement représentées de couleurs foncées et claires. Figure adaptée de [Very et al., 2017](#).

5-FU : 5-FluoroUracile ; **ABC** : ATP-Binding Cassette ; **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique ; **ARN** : Acide RiboNucléique ; **BUP** : Béta-UréidoPropionase ; **DHF** : DiHydroFolate ; **DHFR** : DHF Réductase ; **DHFU** : 5,6-DiHydro-5-FluoroUracile ; **DHPase** : DiHydroPyrimidinase ; **DPD** : DihydroPyrimidine Déshydrogénase ; **dT** : Thymidine ; **dTDP** : dTMP : désoxyThymidine MonoPhosphate ; **dTTP** : désoxyThymidine TriPhosphate ; **dUDP** : désoxyUridine DiPhosphate ; **dUMP** : désoxyUMP ; **dUTP** : désoxyUTP ; **FBAL** : α -Fluoro-Beta-Alanine ; **FdUDP** : 5-FluorodUDP ; **FdUMP** : 5-FluorodUMP ; **FdUTP** : 5-FluorodUTP ; **FUDP** : 5-FluoroUDP ; **FUrd** : FluoroUracile désoxyRibose ; **FUMP** : 5-FluoroUMP ; **FUPA** : Fluoro- β -UreidoPropionic Acid ; **FUrd** : 5-FluoroUridine ; **FUTP** : 5-FluoroUridine TriPhosphate ; **FUTP** : 5-FluoroUTP ; **MTHF** : MéthylèneTrétraHydroFolate ; **MTHFR** : MTHF Réductase ; **NDK** : Nucléoside Diphosphate Kinase ; **OPRT** : Orotate PhosphoRibosylTransférase ; **RR** : Ribonucléotide Réductase ; **SHMT** : Sérine HydroxyMéthylTransférase ; **SLC** : SoLute Carrier ; **THF** : TétraHydroFolate ; **TK** : Thymidine Kinase ; **TP** : Thymidine Phosphorylase ; **UDP** : Uridine DiPhosphate ; **UK** : Uridine Kinase ; **UMP** : Uridine MonoPhosphate ; **UMP-CMPK** : UMP-Cytidine MonoPhosphate Kinase ; **UP** : Uridine Phosphorylase ; **UTP** : Uridine TriPhosphate.

Après injection en IV d'une dose bolus conventionnelle de 5-FU (400-600 mg/m²), la concentration plasmatique atteint un pic compris entre 0,1 et 1 mM. Le catabolisme hépatique rapide conduit à une diminution de cette concentration à environ 10 µM après une heure et à moins de 1 µM après deux heures (van Groeningen et al., 1988). La clairance du 5-FU se situe entre 0,4 et 1,3 L/min et est donc globalement équivalente au débit sanguin hépatique (Casale et al., 2004; Sandström et al., 2016). Suivant une perfusion continue en IV de 5-FU (370-2300 mg/m²/j), l'état d'équilibre de la concentration plasmatique varie entre 0,5 et 7,5 µM (Remick et al., 1990). Dans ce cas, la clairance plasmatique est plus élevée qu'après injection en bolus et peut atteindre plus de 4 L/min témoignant d'une excrétion pulmonaire très importante (Erlichman et al., 1986).

La diffusion tissulaire du 5-FU est très rapide et se fait préférentiellement dans les tissus à croissance et à renouvellement rapide (cellules tumorales, de la moelle épinière et de la muqueuse intestinale) car la liaison du 5-FU aux protéines plasmatiques est très faible (de l'ordre de 10%) (Garrett et al., 1977). De plus, le 5-FU traverse la barrière hémato-encéphalique et pénètre les espaces extracellulaires tels que les liquides céphalo-rachidiens (Bourke et al., 1973) et les cavités pleurales et péritonéales au cours des épanchements pleuraux et des ascites. Ainsi, au bout de 4 heures post-injection, les concentrations de 5-FU sont significativement supérieures dans les tissus normaux à fort potentiel prolifératif par rapport aux tissus à croissance normale (Chaudhuri et al., 1958; Appelgren et al., 1979). Après perfusion continue, les tissus colorectaux cancéreux possèdent également une concentration de 5-FU plus de deux fois supérieures à celle retrouvée dans les tissus sains adjacents (Tanaka-Nozaki et al., 2001).

1.2.2. Toxicités

En raison de sa distribution tissulaire, les principales toxicités induites par l'administration de 5-FU sont : nausée, vomissement, diarrhée, mucite, dermatite, syndrome mains-pieds, neutropénie et myélosuppression (Grenon and Chan, 2009). La transformation du FBAL en **FAC (FluoroACétate)** qui inhibe le cycle de Krebs et la production énergétique serait responsable des toxicités neurologiques (sommolence, syndrome pyramidal, ataxie cérébelleuse et syndrome cérébral organique) et cardiaques (angine, tachycardie, insuffisance congestive, myopathie réversible et infarctus) parfois observées (Gradishar and Vokes, 1990; Arellano et al., 1998; Ki et al., 2002).

2. Métabolisme

2.1. Anabolisme

Le 5-FU est une prodrogue inactive qui pénètre principalement dans la cellule *via* des transporteurs de nucléobases actifs **SLC (SoLute Carrier)** tels que SLC29A1 (aussi nommé **ENT1, Equilibrative Nucleoside Transporter 1**), SLC29A2 (**ENT2**) ou encore SLC22A7 (**OAT2, Organic Anion Transporter 2**) (Kobayashi et al., 2005; Yao et al., 2011; Phua et al., 2013).

Différentes voies anaboliques permettent ensuite la conversion du 5-FU en trois métabolites actifs : le **FUTP** (5-FluoroUridine TriPhosphate), le **FdUTP** (5-FluorodésoxyUridine TriPhosphate) et le **FdUMP** (5-FluorodésoxyUridine MonoPhosphate) (**Figure 11**).

2.2. Dommages aux acides nucléiques

Dommages à l'Acide RiboNucléique (ARN) induits par le 5-FluoroUridine Triphosphate (FUTP)

Tout d'abord, le 5-FU peut être converti par l'**UP** (Uridine Phosphorylase) en **FUrd** (5-FluoroUridine) qui est ensuite phosphorylé en **FUMP** (5-FluoroUMP) par l'**UK** (Uridine Kinase). Alternativement, le 5-FU peut être directement converti en FUMP par l'**OPRT** (Orotate PhosphoRibosylTransférase) qui transfère un ribose phosphate sur le 5-FU à partir du **PRPP** (PhosphoRibosyl PyroPhosphate). Le FUMP est ensuite séquentiellement phosphorylé en **FUDP** (5-FluoroUDP) et FUTP par l'**UMP-CMPK** (UMP-Cytidine MonoPhosphate Kinase) puis la **NDK** (Nucléoside Diphosphate Kinase).

Le FUTP est un substrat des **ARN** (Acide RiboNucléique) polymérase et son incorporation dans les différents types **ARNr**, **ARNt** et **ARNm** (**ARN** ribosomiques, de transfert et messagers) au cours des mécanismes de transcription induit une perturbation des processus de maturation et de modifications post-traductionnelles telles que la pseudouridylation nécessaire à l'épissage des pré-ARNm (Zhao and Yu, 2007; Li et al., 2009) (**Figure 11**).

Dommages à l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) induits par le 5-FluorodésoxyUridine Triphosphate (FdUTP)

La deuxième voie anabolique aboutit à la synthèse du FdUTP par phosphorylations successives du FdUMP et du **FdUDP** (5-FluorodésoxyUridine DiPhosphate) respectivement par l'UMP-CMPK et la NDK ou par réduction du FUDP par la **RR** (Ribonucléotide Réductase).

Le FdUTP peut être incorporé et couplé avec les bases **A** (Adénine) ou **G** (Guanine) par des ADN polymérase dans l'ADN et induire sa fragmentation. En effet, POL α et POL β incorporent le FdUTP avec une efficacité similaire aux dUTP et **dTTP** (désoxyThymidine TriPhosphate) (Caradonna and Cheng, 1980; Tanaka et al., 1981). Enfin, les **dUTPases** (dUTP hydrolases) peuvent également prévenir l'incorporation de FdUTP dans l'ADN en l'hydrolysant en FdUMP. Ce dernier peut alors inhiber la TS (**Figure 11**).

2.3. Inhibition de la synthèse de novo du désoxyThymidine TriPhosphate (dTTP)

Enfin, le 5-FU peut également subir une première conversion réversible par la TP qui substitue l'atome H lié au N₁ par un **dR** (désoxyRibose) permettant d'obtenir le **FuDR** (5-FluoroUracile désoxyRibose) qui est ensuite phosphorylé en FdUMP par la **TK** (Thymidine Kinase).

Le FdUMP se fixe sur les sites **NBS (Nucleotide Binding Site)** de la TS et agit alors comme un inhibiteur compétitif de son substrat naturel, le **dUMP (désoxyUridine MonoPhosphate)**. En effet, la TS possède une affinité similaire pour le FdUMP et le dUMP (constante de dissociation K_d de $1,0 \mu\text{M}^{-1}$ et $1,4 \mu\text{M}^{-1}$ respectivement) (Felder et al., 2002) (Figure 11).

2.3.1. Synthèse de novo du dTTP par la Thymidylate Synthase (TS)

En condition physiologique normale, la TS catalyse la méthylation réductrice du dUMP en **dTMP (désoxyThymidine MonoPhosphate)** en utilisant le **5,10-MTHF (5,10-MéthylèneTrétraHydroFolate)** comme cofacteur donneur du groupement **méthyle (me, CH₃)**. La **DHFR (DiHydroFolate Réductase)** réduit ensuite le **DHF (DiHydroFolate)** en **THF (TétraHydroFolate)** qui est alors converti en 5,10-MTHF par la **SHMT (Sérine HydroxyMéthylTransférase)**. La concentration intracellulaire de 5,10-MTHF est contrôlée par l'activité enzymatique de la **MTHFR (MéthylèneTétraHydroFolate Réductase)** qui transforme de manière irréversible le 5,10-MTHF en **5-MTHF (5-MéthylèneTétraHydroFolate)**. Par l'action successive de la TK et de la NDK, le dTMP est ensuite phosphorylé en **dTDP (désoxyThymidine Di-Phosphate)** puis en dTTP qui est incorporé dans l'ADN par des polymérases.

Ainsi, la réaction enzymatique catalysée par la TS constitue la dernière étape de l'unique voie de synthèse *de novo* du dTMP, un précurseur nucléotidique spécifique de l'ADN essentiel à sa synthèse et à sa réparation, et donc à la division cellulaire. Parallèlement, il existe une « voie de sauvetage » qui permet la synthèse du dTMP à partir de la thymidine par la TK (Dutrillaux and Muleris, 1986) (Figure 11).

2.3.2. Dommages à l'ADN induits par l'inhibition de la TS par le FluorodésoxyUridine Monophosphate (FdUMP)

Le FdUMP forme un complexe ternaire stable avec la TS et le 5,10-MTHF. La TS est ainsi inactivée car ne peut pas transférer le groupement Me sur le FdUMP en raison de la substitution de l'atome H par l'atome F. Ce mécanisme d'inhibition suicide de la TS induit une accumulation de dUMP et de dUTP et une déplétion en dTMP. Cette déplétion en dTMP est également responsable d'une déplétion en dTTP à la base d'une perturbation des processus de synthèse et de réparation de l'ADN. Physiologiquement, les dUTPases hydrolysent le dUTP en dUMP afin de maintenir un faible ratio intracellulaire dUTP/dUMP et d'éviter l'incorporation génomique d'uracile. Après l'incorporation dans l'ADN d'uracile en appariement avec la base A ou G, des **UDG (Uracil-DNA-Glycosylase)** initient rapidement un mécanisme de réparation de l'ADN par excision de base **BER (Base Excision Repair)**. Ici, les fortes concentrations de dUTP induisent la saturation des dUTPases. L'incorporation abondante et rapide de l'uracile dans l'ADN empêche celui-ci d'être réparé et provoque sa fragmentation (Canman et al., 1993) (Figure 11).

La réponse de patients avec un CCR à la chimiothérapie à base de 5-FU n'est pas corrélée à l'incorporation de la drogue dans l'ARN ou l'ADN mais à l'inhibition de la TS (Noordhuis et al., 2004). Ainsi il est considéré que l'inhibition de la TS est le mécanisme cytotoxique majoritaire du 5-FU.

2.4. Catabolisme

Le catabolisme du 5-FU consiste en sa conversion en métabolite inactif, le **DHFU** (5,6-DiHydro-5-FluoroUracile), par la **DPD** (DiHydroPYrimidine Déshydrogénase). Le DHFU est ensuite dégradé en **FUPA** (Fluoro-β-UreidoPropionic Acid) par la **DHPase** (DiHydroPyrimidinase) puis en FBAL par la **BUP** (Béta-UréidoPropionase).

Les transporteurs **ABC** (**ATP** (Adenosine TriPhosphate)-Binding Cassette) ABCB1, ABCB5, ABCC5 (aussi nommé **MRP5**, Multidrug Resistance-associated Protein 5) et ABCC11 (MRP8) sont responsables de l'efflux du 5-FU et/ou de ses métabolites actifs (Guo et al., 2003; Pratt et al., 2005; De Iudicibus et al., 2008; Wilson et al., 2011). Notamment, ABCC5 et ABCC11 transportent le FdUMP (Guo et al., 2003; Oguri et al., 2007) (Figure 11).

3. Effets cytotoxiques

3.1. Arrêt du cycle cellulaire

Le 5-FU modifie la distribution des cellules dans le cycle cellulaire en induisant leur arrêt dans une des phases du cycle (Figure 12).

Lorsque la cytotoxicité est préférentiellement dirigée par les dommages à l'ADN ou l'ARN, les cellules s'accumulent à la transition des phases **G₁/S** (Gap 1)/**S** (Synthèse) ou **G₂/M** (Mitose) respectivement (Petak et al., 2000; Gao et al., 2014; Riahi-Chebbi et al., 2019) (Figure 12). Un excès de thymidine dans le milieu de culture réverse ce phénomène (Petak et al., 2000), ce qui indique que l'inhibition de la progression du cycle cellulaire a pour origine les dommages à l'ADN. L'activation des protéines **CHK** (CHeckpoint KInase) et p53 prend part à ce mécanisme de blocage du cycle cellulaire.

3.1.1. Inactivation des Checkpoint Kinase (CHK)

En réponse aux cassures double-brin de l'ADN (**DSB**, Double-Strand Break), le cycle cellulaire est arrêté en transition **G₁/S** par la cascade d'activation de ATM et CHK2, puis la dégradation protéasomale de CDC25A et l'inhibition du complexe cycline E/CDK2 (Figure 12). Parallèlement, en réponse aux cassures simple-brin (**SSB**, Single-Strand Break) de l'ADN, ATR et CHK1 sont activés puis CDC25A et les complexes cycline A/CDK2 ou cycline E/CDK2 sont inhibés provoquant un arrêt en phase S. D'autre part, CHK1 peut également inhiber CDC25C et activer WEE1 provoquant l'inhibition du complexe cycline B/CDK1 et l'arrêt en transition **G₂/M** (Curtin, 2012) (Figure 12).

Il a été montré que le 5-FU active CHK1 et provoque l'arrêt des cellules en début de phase S (Xiao et al., 2005; Akasaka et al., 2015). D'autre part, Maiuthed et collaborateurs (2018) montrent que le 5-FU active également CHK2 dans des cellules cancéreuses coliques et induit un arrêt à la transition G₁/S (Maiuthed et al., 2018) (Figure 12).

3.1.2. Activation de p53

Un acteur clé de la réponse aux dommages à l'ADN est le suppresseur de tumeur p53. Récemment, il a été montré que le 5-FU augmente la phosphorylation de p53 sur la Ser¹⁵ (Sérine en position 15) dans les cellules cancéreuses coliques LS174 (Riahi-Chebbi et al., 2019). Or, cette phosphorylation peut être induite par le complexe ATM/ATR en réponse aux dommages à l'ADN et être responsable de la stabilisation et de l'activation de p53 (Loughery et al., 2014). Ainsi activé en réponse au 5-FU, p53 induit *in vitro* et *in vivo* l'expression de gènes cibles codant des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire tels que p21^{Cip1} (p21^{CDK-interaction protein 1}) (Pritchard et al., 1998; Riahi-Chebbi et al., 2019). Comme p27^{kip1} (p27^{Kinase-inhibitory protein 1}), p21^{Cip1} est une protéine inhibitrice de CDK (CKI, Cyclin Kinase Inhibitor) dont CDK4 et CDK2 responsables respectivement de la transition G₁/S du cycle cellulaire et de sa progression en phase S. Ainsi, l'arrêt du cycle cellulaire est initié par les voies ATM/CHK2/CDC25 et ATR/CHK1/CDC25 puis maintenu par activation de p53 plusieurs heures après la détection des dommages à l'ADN provoqués par le 5-FU (Sancar et al., 2004) (Figure 12).

Le statut de mutation de TP53 influe sur l'arrêt du cycle cellulaire induit par le 5-FU. *In vitro*, Akasaka et collaborateurs (2015) observent que le 5-FU provoque un arrêt en phase S des cellules cancéreuses coliques avec TP53 muté mais ne modifie pas la répartition dans le cycle cellulaire de celles exprimant TP53 sauvage. Les cellules présentant une perte de fonction de p53 ou de ses voies de régulation ont une perte du point de surveillance G₁/S et sont totalement dépendantes des points de contrôle intra-S et G₂/M pour l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN, notamment par l'activation de CHK1 (Akasaka et al., 2015).

3.2. Apoptose

L'objectif ultime des traitements anti-cancéreux est d'induire la mort des cellules tumorales. Plusieurs études révèlent que le 5-FU induit la mort des cellules par apoptose. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique essentiel qui permet l'élimination des cellules endommagées et anormales afin de conserver l'homéostasie de l'organisme.

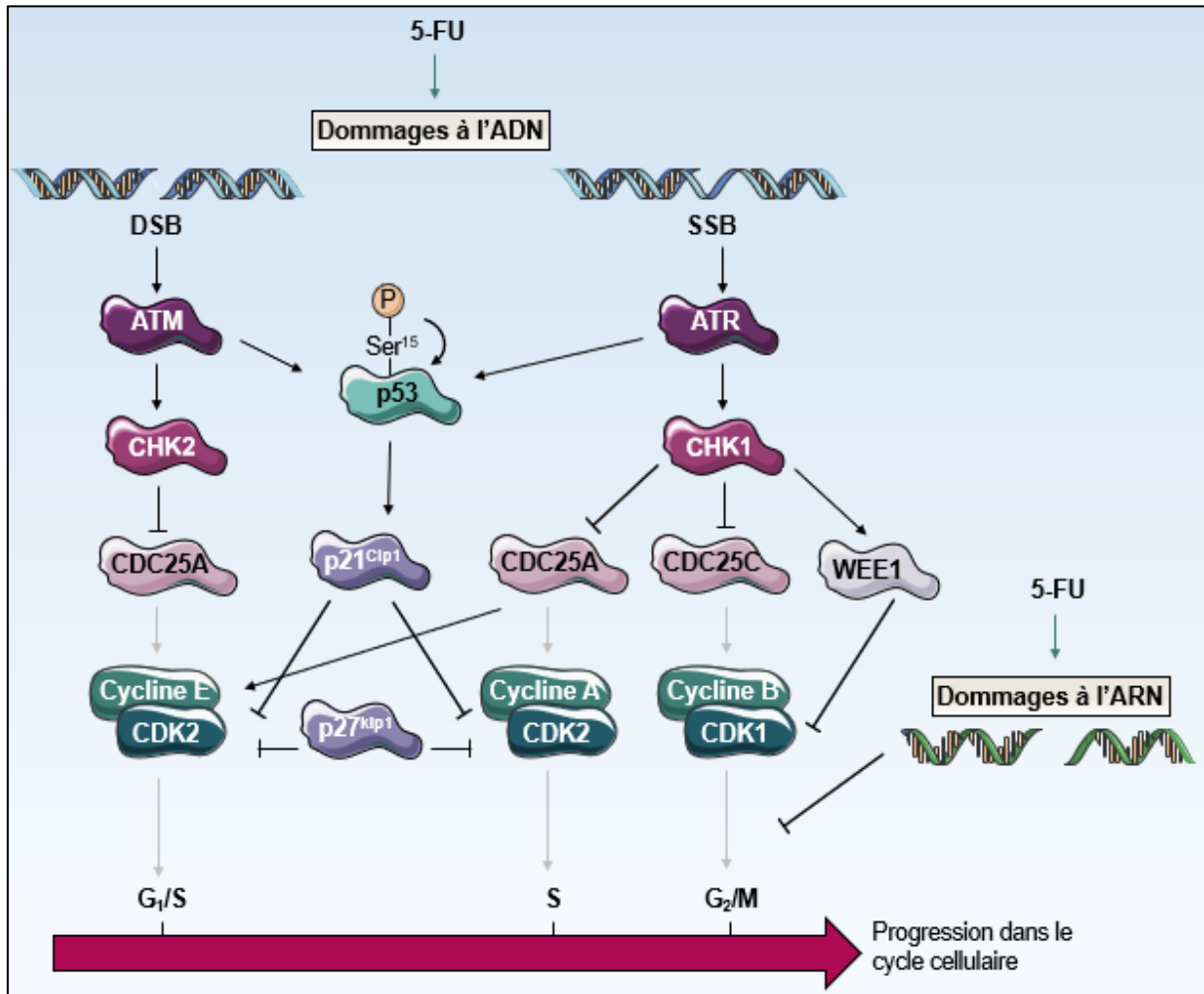


Figure 12 : Effet du 5-FU sur le cycle cellulaire. Les dommages à l'ADN et à l'ARN causés par le 5-FU bloquent le cycle cellulaire dépendamment ou indépendamment de p53.

5-FU : 5-FluoroUracile ; **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique ; **ARN** : Acide RiboNucléique ; **ATM** : Ataxia Telangiectasia Mutated ; **ATR** : Ataxia Telangiectasia and Rad3-related ; **CDC** : Cell Division Control protein ; **CDK** : Cyclin-Dependent Kinase ; **CHK** : CHeckpoint Kinase ; **DSB** : Double-Strand Break ; **G** : Gap phase ; **kDa** : kiloDalton ; **M** : Mitosis phase ; **P** : Phosphate ; **p21^{Cip1}** : protein 21 kDa^{CDK-interaction protein 1} ; **p27^{kip1}** : protein 27 kDa^{Kinase-inhibitory protein 1} ; **p53** : protéine de 53 kDa ; **S** : Synthesis phase ; **SSB** : Single-Strand Break.

L'apoptose se distingue de la nécrose par le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique et du contenu cellulaire évitant ainsi le déclenchement d'une réaction inflammatoire. Elle est caractérisée par un certain nombre de modifications morphologiques telles que la condensation de la chromatine et du cytoplasme, la fragmentation cellulaire en corps apoptotiques et la fragmentation de l'ADN en oligonucléosomes. En fonction du stimulus, deux voies apoptotiques principales peuvent être engagées : la voie extrinsèque des récepteurs de mort ou la voie intrinsèque mitochondriale (Jin and El-Deiry, 2005) (Figure 13). Ces deux voies sont simultanément activées dans les cellules cancéreuses coliques en réponse au 5-FU (Akpınar et al., 2015) (Figures 14 et 15).

3.2.1. Voie apoptotique extrinsèque

L'activation des voies de signalisation p53, **NF-κB** (Nuclear Factor-kappa B) et **AP-1** (Activator Protein 1) sont des médiateurs importants de l'apoptose extrinsèque induite par le 5-FU (Figure 14).

La voie dépendante de p53

In vivo, l'administration de 5-FU induit une apoptose aiguë avec une perte de la cellularité des villosités du côlon transverse murin. En revanche, l'apoptose est significativement diminuée chez les souris déficientes en *TP53* (Pritchard et al., 1998). *In vitro*, les cellules cancéreuses coliques *TP53* muté subissent un arrêt prolongé en phase S suivi d'une apoptose retardée alors que les cellules *TP53* sauvage présentent une apoptose aiguë (Petak et al., 2000). En réponse au 5-FU, p53 peut induire l'apoptose extrinsèque en modulant les voies de signalisation Fas et **TRAIL** (TNF (Tumor Necrosis Factor) Related Apoptosis Inducing Ligand) ou en agissant directement sur la caspase-2 (Figure 14).

p53 est, en effet, un activateur de la voie de signalisation Fas (Petak et al., 2000; Longley et al., 2004). Müller et collaborateurs (1998) ont montré que p53 augmente l'expression de *FAS* dans les cellules d'hépatocarcinome Hep3B. Ils ont, de plus, identifié un élément de réponse positif à p53 au niveau du premier intron et trois éléments putatifs au niveau du promoteur du gène *FAS* (Müller et al., 1998). Dans les cellules coliques *TP53* muté, la transfection de *TP53* sauvage induit l'expression de Fas et sensibilise les cellules au 5-FU (Petak et al., 2000). Ainsi, dans différentes lignées cancéreuses, Fas est surexprimé en réponse au traitement au 5-FU (Tillman et al., 1999; Longley et al., 2004). L'utilisation d'un anticorps monoclonal CH-11 agoniste du récepteur Fas augmente synergiquement l'apoptose induite par la drogue (Longley et al., 2004). L'inactivation de p53 dans les lignées cancéreuses coliques HCT116 *TP53*^{-/-} et H630 *TP53* muté atténue la surexpression de Fas en réponse au 5-FU et inhibe l'activation de l'apoptose induite par le CH-11 et le 5-FU (Longley et al., 2004). En réponse aux dommages à l'ADN causés par le 5-FU dans les cellules HCT116, p53 pourrait également induire l'activation de la caspase-2 initiateur au niveau du complexe **DISC** (Death-Inducing Signaling Complex) constitué de Fas et/ou du complexe PIDDosome. Une fois activée, la caspase-2 engendrerait l'accumulation de **tBid** (truncated BH3 interacting-domain death agonist) pro-apoptotique puis l'activation de la voie apoptotique intrinsèque (Olsson et al., 2009) (Figure 14).

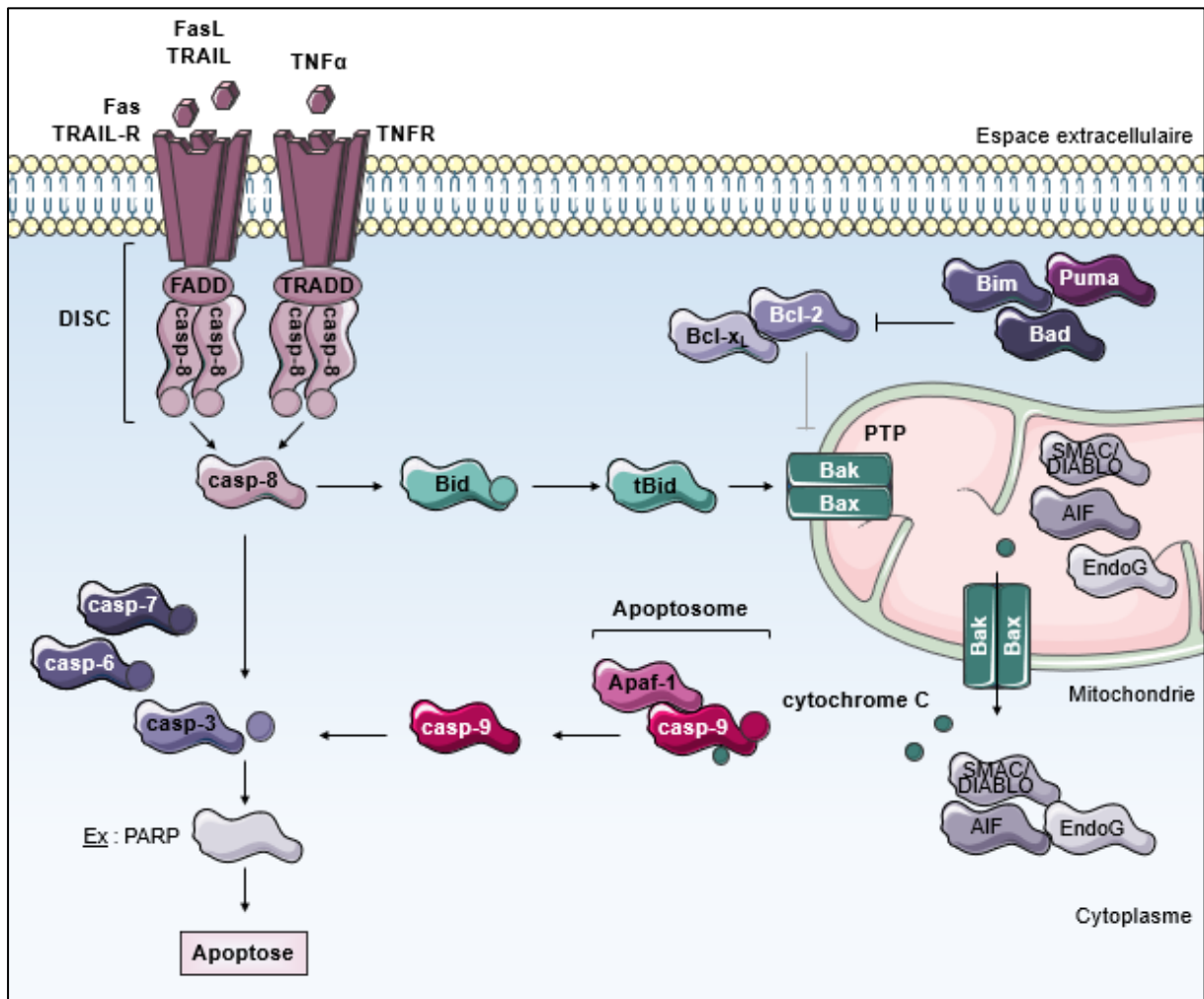


Figure 13 : Voies de signalisation extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. L'apoptose extrinsèque est initiée par l'activation des récepteurs de mort à la surface cellulaire et l'apoptose intrinsèque par des protéines intracellulaires pro-apoptotiques qui induisent l'ouverture du PTP. Ces deux voies activent des caspases initiatrices et effectrices à l'origine de la mort cellulaire.

ADN : Acide DéoxyriboNucléique ; **AIF** : Apoptosis-Inducing Factor ; **Apaf-1** : Apoptotic peptidase activating factor 1 ; **Asp** : Aspartate ; **Bad** : Bcl-2 associated agonist of cell death ; **Bak** : Bcl-2 homologous antagonist killer ; **Bax** : Bcl-2-associated x ; **Bcl-2** : B-cell lymphoma 2 ; **Bcl-x_L** : B-cell lymphoma-extral Large ; **Bid** : BH3 interacting-domain death agonist ; **Bim** : Bcl-2 interacting mediator of cell death ; **casp** : caspase ; **Cys** : Cystéine ; **DD** : Death Domain ; **DIABLO** : Direct Inhibitor of Apoptosis Binding protein with LOW pl ; **DISC** : Death-Inducing Signaling Complex ; **EndoG** : Endonucléase G ; **FADD** : Fas-Associated protein with DD ; **FasL** : Fas Ligand ; **MOMP** : Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization ; **PARP** : Poly(Adénosine diphosphate-Ribose) Polymérase ; **PTP** : Pore de Transition de Perméabilité ; **Puma** : Protein 53 kilodaltons upregulated modulator of apoptosis ; **SMAC** : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase ; **tBid** : truncated Bid ; **TNFR** : TNF Receptor ; **TNFα** : Tumor Necrosis Factor α ; **TRADD** : TNFR Associated DD ; **TRAIL** : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand ; **TRAIL-R** : TRAIL-Receptor.

Le 5-FU induit également l'apoptose extrinsèque par l'activation du récepteur **TRAIL-R2** (**TRAIL-Receptor 2**). En effet, dans les cellules HCT116 traitées au 5-FU, p53 est responsable de l'expression de Fas mais également de TRAIL-R2 (Kuribayashi et al., 2011) (**Figure 14**). Or, la diminution de l'expression de **TNFRS10B** (**TNFR (TNF Receptor) Superfamily member 10B**) codant TRAIL-R2 diminue presque totalement l'activité des caspases-3 et -7 induite par le 5-FU. De manière intéressante, des expériences de combinaison de **siRNA** (small interfering RiboNucleic Acid) montrent que la diminution de l'expression de **TNFRS10B** suivie de celle de **FAS** n'a pas d'effet additionnel sur l'inhibition des caspases. Ainsi, la signalisation TRAIL/TRAIL-R2 aurait un rôle dans l'apoptose induite par Fas (Kuribayashi et al., 2011). Dans ce sens, il a été montré, *in vivo*, que les lésions hépatiques induites par Fas sont accélérées en présence de TRAIL *via* l'activation de JNK et la phosphorylation activatrice de la protéine pro-apoptotique **Bim** (**Bcl-2 interacting mediator of cell death**). Ces résultats révèlent qu'il existe un chevauchement fonctionnel entre la voie de signalisation Fas et la voie apoptotique intrinsèque (Corazza et al., 2006). Kuribayashi et collaborateurs (2011) montrent également que Fas activerait **Puma** (**P53 upregulated modulator of apoptosis**) et Bax pour générer des signaux qui clivent les caspases-3 et -7 (Kuribayashi et al., 2011). D'autre part, JNK possède d'autres cibles que Bim dont c-Jun qui active le facteur de transcription AP-1 (Corazza et al., 2006). Ainsi, TRAIL pourrait également activer la voie de signalisation Fas par augmentation de l'expression de **FASLG** (**FAS LiGand**) induite par AP-1 (**Figure 14**).

La voie dépendante de Nuclear Factor-kappa B (NF-κB) et Activator Protein 1 (AP-1)

Le 5-FU induit l'expression de **FasL** (**Fas Ligand**) dans les cellules HT-29. Aussi, l'utilisation d'anticorps monoclonaux NOK-1 et NOK-2, inhibiteurs des interactions entre Fas et FasL, diminue la cytotoxicité du 5-FU (Tillman et al., 1999). Dans les cellules cancéreuses coliques GC₃/c1, le 5-FU augmente l'expression de **FASLG** (Houghton et al., 1997) mais aussi de **NF-κB** et de **AP-1** (Harwood et al., 2000), des facteurs de transcription impliqués dans l'induction de l'apoptose en réponse aux dommages à l'ADN. Des éléments de réponses à NF-κB et AP-1 ont été identifiés dans les régions promotrices de **FASLG**. Les mutations de leur site de liaison sur le gène **FASLG** inhibe leur transactivation (Kasibhatla et al., 1998) (**Figure 14**).

Ensemble, ces résultats démontrent que l'apoptose extrinsèque induite par le 5-FU est due à l'activation des facteurs de transcription p53, NF-κB et AP-1 en réponse aux dommages à l'ADN et à la surexpression du récepteur Fas et de son ligand FasL (**Figure 14**).

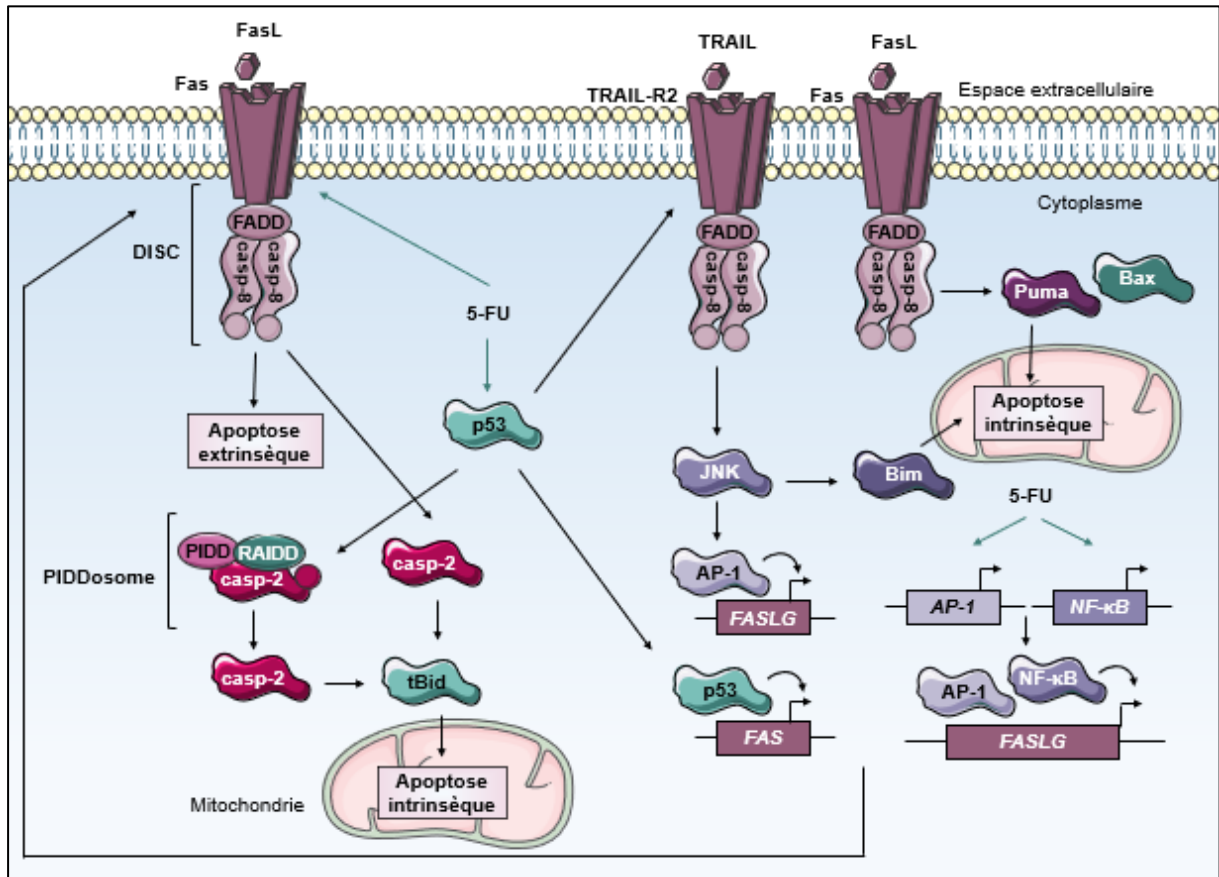


Figure 14 : Effet du 5-FU sur la voie apoptotique extrinsèque. Les dommages induits par le 5-FU augmentent l'expression de Fas et de son ligand FasL *via* l'activation des facteurs de transcription p53, AP-1 et NF-κB. Il existe un chevauchement fonctionnel entre les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque puisque les voies Fas/FasL et TRAIL/TRAIL-R2 activent les protéines pro-apoptotiques t-Bid, Puma, Bax et Bim respectivement.

5-FU : 5-FluoroUracile ; **AP-1** : Activator Protein 1 ; **Bax** : Bcl-2-associated x ; **Bcl-2** : B-cell lymphoma 2 ; **Bim** : Bcl-2 interacting mediator of cell death ; **casp-2** : caspase-2 ; **DD** : Death Domain ; **DISC** : Death-Inducing Signaling Complex ; **FADD** : Fas-Associated protein with DD ; **FasL** : Fas Ligand ; **FASLG** : *FAS LiGand* ; **NF-κB** : Nuclear Factor κB ; **p53** : protéine de 53 kiloDaltons ; **PIDD** : P53-Induced protein with a DD ; **Puma** : P53 upregulated modulator of apoptosis ; **RAIDD** : Receptor-interacting protein-Associated ICH1/CED-3-homologous protein with a DD ; **tBid** : truncated BH3 interacting-domain death agonist ; **TRAIL** : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand ; **TRAIL-R2** : TRAIL-Receptor 2.

3.2.2. Voie apoptotique intrinsèque

La voie dépendante de p53

En réponse aux dommages à l'ADN, p53 engage l'apoptose intrinsèque en activant des facteurs pro-apoptotiques (ex : Bax, Puma et **Bnip3L** (**Bcl-2 interacting protein 3-Like**)) tout en inhibant des facteurs anti-apoptotiques (ex : Bcl-2) mais également en stimulant la production de **ROS** (**Reactive Oxygen Species**) (**Figure 15**).

Dans les cellules cancéreuses coliques COLO 201, le 5-FU induit l'apoptose par suppression de l'expression de *BCL2* et l'induction de l'expression de *BAX* (Koshiji et al., 1997). Or, le gène *BAX* est activé par p53 (Miyashita and Reed, 1995) et le promoteur de *BCL2* contient un élément de réponse négatif à p53 suggérant que *BCL2* est également une cible directe de p53 (Miyashita et al., 1994) (**Figure 15**). L'apoptose est donc altérée dans les cellules HCT116 *TP53*^{-/-} et *BAX*^{-/-} par rapport aux cellules non mutées (Sturm et al., 2006). Dans les cellules HCT116, le 5-FU induit également l'activation de p53 puis l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax et Puma ainsi que Bnip3L (Kuribayashi et al., 2011), une protéine mitochondriale qui interagit avec Bcl-2 et **Bcl-x_L** (**B-cell lymphoma-extra Large**) et qui induit l'apoptose en altérant la perméabilité membranaire mitochondriale (Imazu et al., 1999). En plus de *BAX*, les gènes *BNIP3L* et **BBC3** (**BCL2 Binding Component 3**) codant Puma sont également des cibles directes de p53 (Fei et al., 2004; P. Wang et al., 2007) (**Figure 15**).

D'autre part, p53 induit l'apoptose par activation de l'expression de gènes codant des protéines mitochondriales susceptibles de stimuler la production de ROS (Hwang et al., 2001). Notamment dans les cellules cancéreuses coliques HCT116, p53 est un activateur direct du gène *FDXR* (**FDX** (**FerréDoXine**) **Réductase**) codant une cytochrome P-450 réductase mitochondriale (Hwang et al., 2001). Cette enzyme est responsable du transfert d'électrons à partir du **NADPH₂** (**Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit**), *via* la navette FDX, vers des substrats tels que le cholestérol. Dans des conditions de quantité limitée de substrat, les électrons peuvent fuir ce système de navette et réduire le dioxygène (O₂) en ion superoxyde (O₂⁻) (Hanukoglu et al., 1993) (**Figure 15**). De manière intéressante, l'expression de *FDXR* et la production de ROS sont induites en réponse au 5-FU dans le clone HCT116 avec *TP53* sauvage mais pas dans le clone avec *TP53* muté. L'apoptose induite par le 5-FU est réduite après traitement cellulaire par l'antioxydant ubiquinone ainsi que dans les clones HCT116 *FDXR*^{+/-} par rapport au clone parental (Hwang et al., 2001).

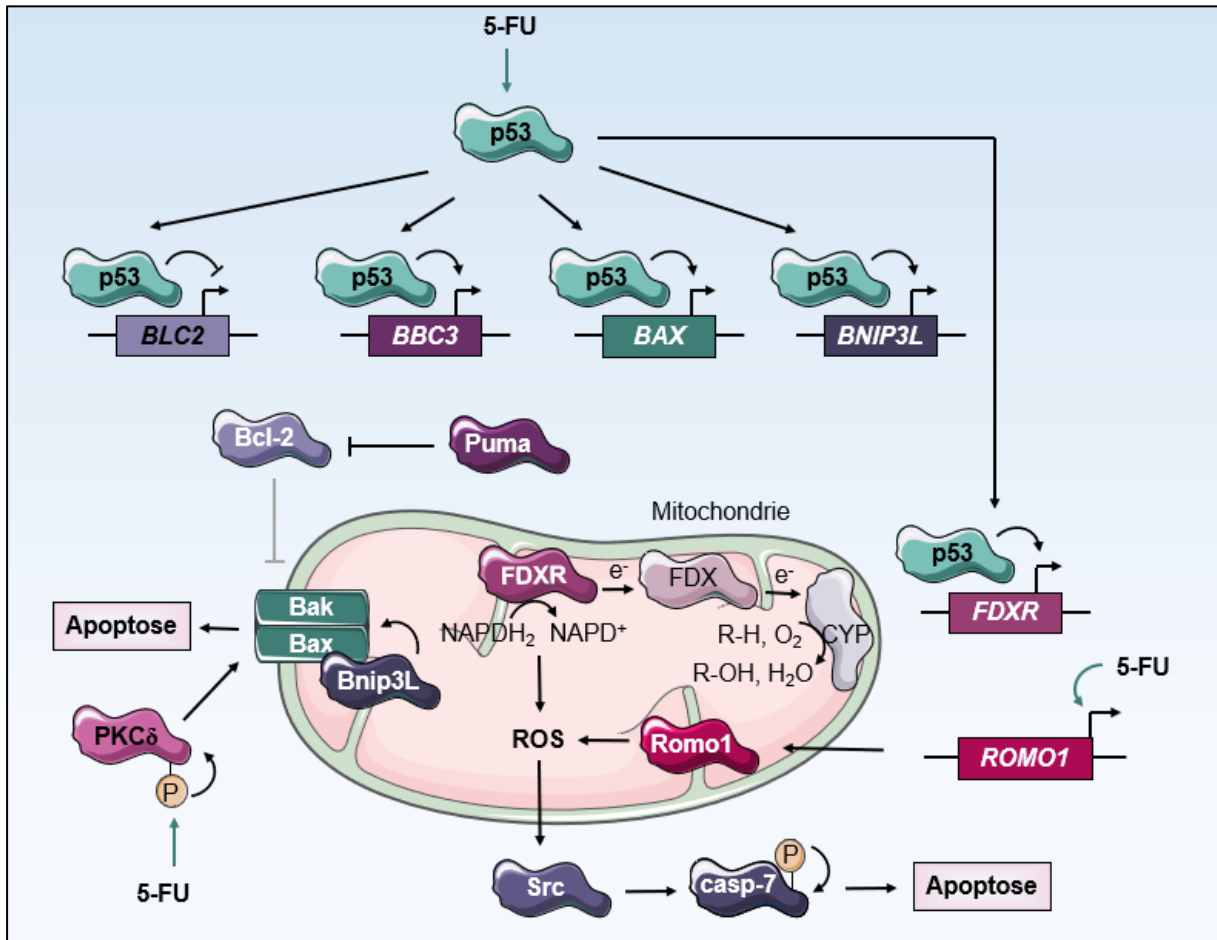


Figure 15 : Effet du 5-FU sur la voie apoptotique intrinsèque. Le facteur de transcription p53 activé par les dommages induits par le 5-FU inhibe l'expression du gène anti-apoptotique *BCL2* mais active celle des gènes pro-apoptotiques *BBC3*, *BAX*, *BNIP3L* et *FDXR*. Le 5-FU active également la voie apoptotique intrinsèque *via* *PKCδ*. Enfin, l'apoptose est induite par l'accumulation de ROS provoquée par *FDXR* et *Romo1*.

5-FU : 5-FluoroUracile ; **Bak** : Bcl-2 homologous antagonist killer ; **Bax** : Bcl-2-associated x ; **BBC3** : *BCL2* Binding Component 3 ; **Bcl-2** : B-cell lymphoma 2 ; **Bnip3L** : Bcl-2 interacting protein 3-Like ; **casp-7** : caspase-7 ; **CYP** : CYtochrome P450 ; **FDX** : FerréDoXine ; **FDXR** : *FDX* Réductase ; **NADP** : Nicotinamide Adénine DiNucléotidePhosphate ; **NADP⁺** : *NADP* oxydé ; **NADPH₂** : *NADP* réduit ; **P** : Phosphate ; **p53** : protéine de 53 kilodaltons ; **PKCδ** : Protéine Kinase Cδ ; **Puma** : P53 upregulated modulator of apoptosis ; **Romo1** : Reactive oxygen species modulator 1 ; **ROS** : Reactive Oxygen Species ; **Src** : v-src avian sarcoma (Schmidt-ruppin A-2) viral oncogene homolog.

D'autre part, Chung et collaborateurs (2006) montrent que le traitement au 5-FU induit l'expression de **ROMO1** (*Reactive Oxygen species MODulator-1*) également responsable de la production de ROS dans la mitochondrie (Chung et al., 2006). Fu et collaborateurs (2014) montrent que le 5-FU génère des ROS dans les cellules cancéreuses coliques HT-29 et SW480 et que leur co-traitement avec des antioxydants diminue l'apoptose induite par le 5-FU seul. Les auteurs montrent que les ROS activent la protéine **Src** (v-src avian sarcoma (Schmidt-ruppin A-2) viral oncogene homolog) qui peut alors interagir et phosphoryler la caspase-7 sur de multiples **Tyr** (Tyrosines) (Tyr⁵⁸, Tyr¹⁵¹, Tyr²²⁹ et Tyr²³⁰). Cette phosphorylation augmente l'activité enzymatique de la caspase-7 et ainsi l'apoptose induite par le 5-FU (Fu et al., 2014) (Figure 15).

La voie dépendante de Protéine Kinase C-δ (PKCδ)

Mhaidat et collaborateurs (2014) montrent que l'apoptose intrinsèque induite par le 5-FU dépend également de l'activation de **PKCδ** (Protéine Kinase C-δ) et de la caspase-9. En effet, dans les cellules HCT116, l'apoptose est inhibée par traitement avec le rottlerin et le Z-LEHD-fmk, des inhibiteurs spécifiques de PKCδ et de caspase-9 respectivement. En réponse au 5-FU, PKCδ est surexprimée, phosphorylée sur les résidus **Thr** (Thréonine)⁵⁰⁵ et Ser⁶⁴⁵ puis clivée en sa forme active (Mhaidat et al., 2014). Ainsi activée, PKCδ pourrait exercer son activité pro-apoptotique sur la voie intrinsèque en activant la voie de signalisation **Abl** (c-Abelson murine leukemia viral oncogene)-PKCδ-p38MAPK puis les protéines Bax et **Bak** (Bcl-2 homologous antagonist killer) (Choi et al., 2006) (Figure 15).

Chapitre 3 :

Mécanismes de résistance au
5-fluorouracile dans le cancer
colorectal

Chapitre 3 : Mécanismes de résistance au 5-fluorouracile dans le cancer colorectal

Le taux de réponse des patients avec un CCR métastatique, traité par chimiothérapie à base de 5-FU, est d'environ 57% (Ychou et al., 2013) et leur taux de survie à 5 ans de seulement 12,5% (Siegel et al., 2014). L'échec des thérapies anti-cancéreuses est principalement dû au développement de mécanismes de résistance. Ceux-ci peuvent avoir plusieurs origines telles qu'une inactivation de la drogue par l'augmentation de son catabolisme ou, à l'inverse, la diminution de son anabolisme ; une altération de sa cible ou encore l'inhibition de son effet cytotoxique.

1. Inactivation du 5-FU

1.1. Activation du catabolisme du 5-FU

1.1.1. Rôle des transporteurs Adenosine triphosphate-Binding Cassette (ABC)

Les transporteurs ABCB1, ABCB5, ABCC5 et ABCC11 sont responsables de l'efflux du 5-FU et/ou de ses métabolites actifs (Guo et al., 2003; Pratt et al., 2005; Wilson et al., 2011) (*confer, cf. 2.4 page 57*). Une activation de ces transporteurs provoque donc une diminution de la concentration intracellulaire en 5-FU et une résistance à la drogue.

In vitro, différentes études montrent que les cellules cancéreuses résistantes au 5-FU surexpriment ABCB1, ABCB5, ABCC5 ou ABCC11 par rapport aux cellules parentales (Pratt et al., 2005; Oguri et al., 2007; T. Wang et al., 2015; Kugimiya et al., 2015). Parallèlement l'inhibition de ces transporteurs par l'utilisation de siRNA ou d'inhibiteurs pharmacologiques augmente la sensibilité de ces cellules au 5-FU (Oguri et al., 2007; Wilson et al., 2011; Kugimiya et al., 2015) (**Figure 16**).

In vivo, la présence de SNP dans la région codante de ABCB1 réduit la survie des patients traités au 5-FU. Le polymorphisme 2677G>T (rs2032582) de substitution Ala⁸⁹³Ser (Alanine 893 en Ser) et le polymorphisme silencieux 3435C>T (rs1045642) en sont des exemples. Ces mutations augmentent l'activité de transport de ABCB1 pour différentes drogues *in vitro* (Schaefer et al., 2006; Tan, 2019) et sont associées à un taux de survie significativement diminué chez les patients porteurs de la mutation par rapport aux patients homozygotes non mutés (De Iudibus et al., 2008; De Mattia et al., 2013). ABCB5 est surexprimé dans un sous-ensemble de cellules résistantes au 5-FU au sein de tumeurs rectales primitives (Wilson et al., 2011). Les patients CCR traités par chimiothérapie à base de 5-FU ont également une survie sans progression (PFS, Progression-Free Survival) significativement plus courte lorsque leurs cellules tumorales circulantes expriment ABCC5 (Gazzaniga et al., 2010). Enfin, l'expression de ABCC11 est également négativement corrélée à la réponse et à l'issue des patients CCR (Hlavata et al., 2012) (**Figure 16**).

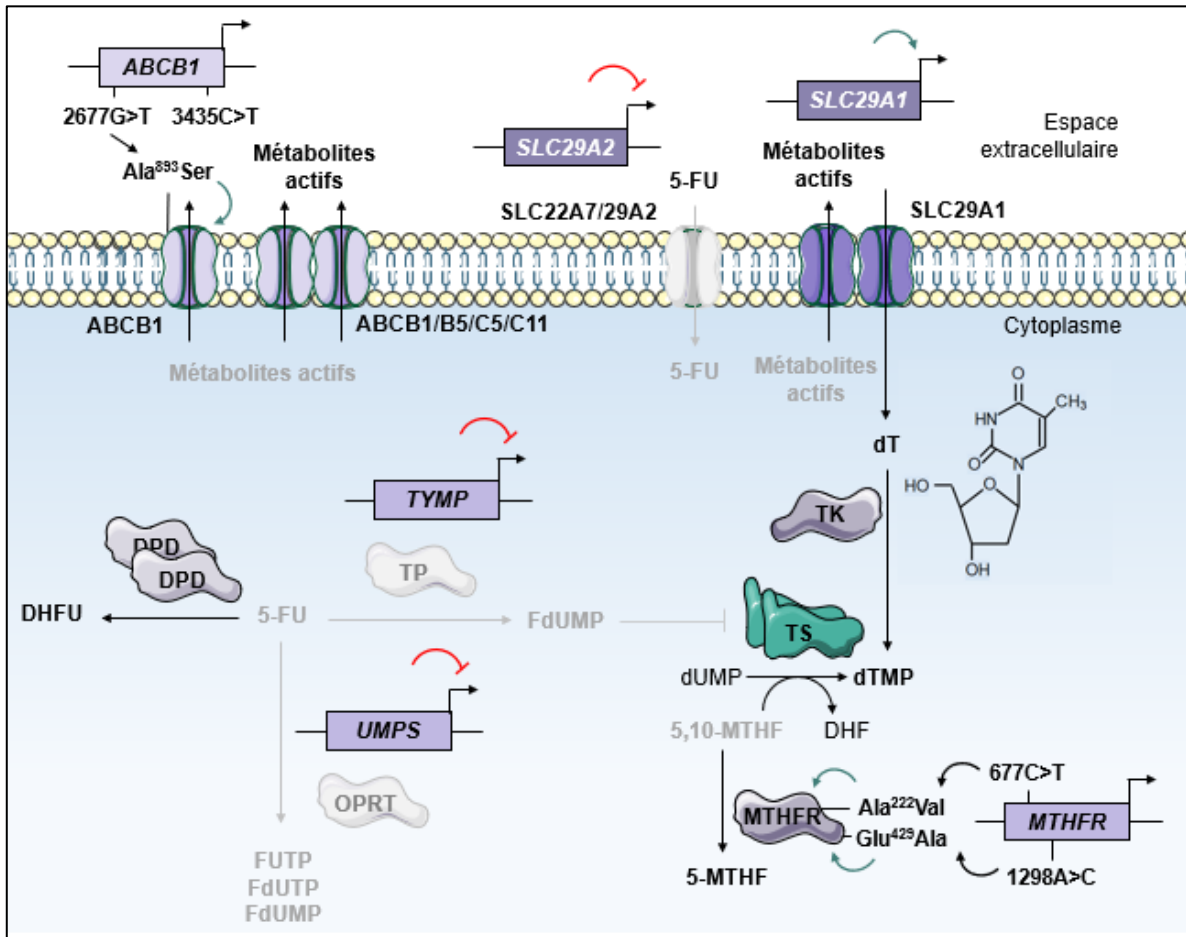


Figure 16 : Résistance au 5-FU induite par la régulation de son métabolisme. La résistance au 5-FU peut avoir pour origine une diminution de son anabolisme (diminution de son influx par les transporteurs SLC et, de sa conversion en métabolites actifs par la TP et l'OPRT), une augmentation de son catabolisme (augmentation de son efflux par les transporteurs ABC et de sa conversion en métabolites inactifs par la DPD) ou une altération de sa cible (surexpression de la TS et activation de la MTHFR).

5-FU : 5-FluoroUracile ; **A** : Adénine ; **ABC** : Adenosine triphosphate-Binding Cassette ; **Ala** : Alanine ; **C** : Cytosine ; **DHF** : DiHydroFolate ; **DHFU** : 5,6-DiHydro-5-FluoroUracile ; **DPD** : DihydroPYrimidine Déshydrogénase ; **dT** : Thymidine ; **dTMP** : désoxyThymidine MonoPhosphate ; **dUMP** : désoxyUMP ; **FdUMP** : 5-FluorodUMP ; **FdUTP** : 5-FluorodésoxyUTP ; **FUTP** : 5-FluoroUTP ; **G** : Guanine ; **Glu** : Glutamate ; **MTHF** : MéthylèneTrétraHydroFolate ; **MTHFR** : MTHF Réductase ; **OPRT** : Orotate PhosphoRibosylTransférèse ; **SLC** : SoLute Carrier ; **T** : Thymine ; **TK** : Thymidine Kinase ; **TP** : Thymidine Phosphorylase ; **TS** : Thymidylate Synthase ; **TYMP** : *ThYMidine Phosphorylase* ; **UMP** : Uridine MonoPhosphate ; **UMPS** : *UMP Synthase* ; **UTP** : Uridine TriPhosphate ; **Val** : Valine.

1.1.2. Résistance et toxicité liées à l'activation de la DihydroPyrimidine Déshydrogénase

(DPD)

La DPD est responsable de la conversion du 5-FU en métabolite inactif DHFU (cf. 2.4 page 57). Une augmentation de l'activité de la DPD accélère le catabolisme du 5-FU et engendre une résistance à la drogue.

In vitro, l'augmentation de l'expression (Takebe et al., 2001) ou de l'activité (Beck et al., 1994) de la DPD est associée à une augmentation de la résistance cellulaire au 5-FU. Un faible niveau d'expression intratumorale de DPD prédit un meilleur taux de réponse et une meilleure survie des patients présentant des tumeurs colorectales traitées par chimiothérapie à base de 5-FU (Salonga et al., 2000; Kornmann et al., 2003; Tokunaga et al., 2005; Ciaparrone et al., 2006; Jensen et al., 2006; Yanagisawa et al., 2007). De plus, l'activité de la DPD est négativement corrélée à la sensibilité des tumeurs colorectales au 5-FU (Isshi et al., 2002) (Figure 16).

Néanmoins, les individus ayant une déficience en DPD présentent une élévation persistante de la concentration sanguine de 5-FU et souffrent d'une toxicité accrue liée à la drogue (Deenen et al., 2016) (cf. 1.2.2 page 54). A l'heure actuelle, plus d'une centaine de polymorphismes du gène *DPYD* (*DihydroPYrimidine Déshydrogénase*) ont été identifiés et trois ont été particulièrement étudiés. Notamment, le polymorphisme *IVS14+1G>A* (rs3918290) qui interrompt une séquence de reconnaissance d'épissage dans l'intron 14. Cette mutation provoque la délétion des acides aminés correspondant à l'exon 14 du gène *DPYD* et génère une protéine tronquée catalytiquement inactive. Les polymorphismes *1679T>G* (rs67376798) et *2846A>T* (rs55886062) induisent, quant à eux, les substitutions Ile (Isoleucine)⁵⁶⁰Ser et Asp⁹⁴⁹Val (Aspartate⁹⁴⁹Valine) respectivement. Le SNP *2846A>T* conduit à un changement de la structure tridimensionnelle de l'enzyme DPD qui interfère avec la liaison du cofacteur ou le transport d'électrons (Kuilenburg et al., 2002). Des méta-analyses montrent que les SNP *IVS14+1G>A*, *1679T>G* et *2846A>T* sont associés à une diminution de l'activité de la DPD (de 12,5% ; 12,5-25% et 41% respectivement) (Offer et al., 2014) et une augmentation des toxicités sévères liées au 5-FU (événements indésirables liés au 5-FU de grade supérieur à 3 : *IVS14+1G>A* : 88% ; *1679T>G* : 50%, *2846A>T* : 82% ; non muté : 33%) (Lee et al., 2014). Ces SNP pathologiques sont rares puisque seulement 4% des patients possèderaient l'une d'entre elles (Etienne-Grimaldi et al., 2017).

Des stratégies d'administration de doses personnalisées de 5-FU sur la base du génotype *DPYD* ont montré des bénéfices. Dans l'essai clinique prospectif de Deenen et collaborateurs (2016), les patients devant recevoir une chimiothérapie à base de 5-FU ou de capécitabine ont été génotypés pour le SNP *IVS14+1G>A* (*DPYD*2A*) avant le début du traitement et ceux présentant l'allèle variant hétérozygote ont bénéficié d'une réduction de la dose initiale de la chimiothérapie de 50%. Ainsi, par rapport à une dose standard, les risques de toxicité sévère liée au traitement et la mortalité d'origine médicamenteuse sont significativement réduits de 73% à 28% et de 10% à 0% chez les patients hétérozygotes *DPYD*2A*

(Deenen et al., 2016). De même, il est préconisée une réduction de 25% de la dose de 5-FU pour les porteurs hétérozygotes des SNP 1679T>G et 2846A>T (Henricks et al., 2015).

1.2. Inhibition de l'anabolisme du 5-FU

1.2.1. Rôle des transporteurs Solute Carrier (SLC)

Les transporteurs SLC29A1, SLC29A2 et SLC22A7 sont responsables de l'influx du 5-FU (Kobayashi et al., 2005; Yao et al., 2011; Phua et al., 2013) (cf. 2.1 page 54). Une inhibition de ces transporteurs empêcherait l'accumulation intracellulaire du 5-FU et provoquerait une résistance à la drogue (Figure 16).

Les niveaux de SLC29A2 et SLC22A7 corréleraient positivement avec la réponse des patients traités par chimiothérapie à base de 5-FU (Phua et al., 2013; Tashiro et al., 2014). A l'inverse, les niveaux de SLC29A1 corréleraient négativement avec la sensibilité *in vitro* de cellules cancéreuses coliques et à la réponse *in vivo* au 5-FU (Boyer et al., 2002; Yoshinare et al., 2003; Phua et al., 2013). Les auteurs suggèrent que SLC29A1 augmente la sensibilité des cellules tumorales au 5-FU par augmentation de l'export de ses métabolites actifs ou de l'import de thymine permettant de sauver les cellules du TLD (ThymineLess Death) causée par l'inhibition de la TS (Yoshinare et al., 2003) (Figure 16).

1.2.2. Inhibition de la Thymidine Phosphorylase (TP) et rôle pro-angiogénique

La TP est l'enzyme limitante dans l'activation du 5-FU, elle réalise la première étape de conversion du 5-FU en FdUR qui sera ensuite métabolisé en FdUMP actif (cf. 2.3 page 55). Théoriquement, les cellules avec des niveaux plus élevés de TP devraient être plus sensibles au 5-FU en raison d'une augmentation de la concentration en FdUMP formés (Figure 16). Toutefois, différentes études montrent des résultats contradictoires sur la corrélation entre niveau d'expression de TP et réponse à la chimiothérapie à base de 5-FU.

In vitro, la surexpression de TP dans les cellules cancéreuses coliques augmente la formation de FdUMP et la sensibilité de ces cellules au 5-FU (Schwartz et al., 1995; Evrard et al., 1999) (Figure 16). Néanmoins, *in vivo*, Gustavsson et collaborateurs (2009) et Tokunaga et collaborateurs (2005) montrent que l'expression de la TP est corrélée positivement à la progression du CCR mais négativement au pronostic des patients (Tokunaga et al., 2005; Gustavsson et al., 2009). Salonga et collaborateurs (2000) révèlent également que les tumeurs colorectales sensibles au 5-FU présentent un niveau d'expression du gène *TYMP* (ThYMidine Phosphorylase) plus faible par rapport à la valeur seuil des tumeurs résistantes (Salonga et al., 2000). Enfin, Mitselou et collaborateurs (2012) établissent la corrélation positive entre expression intratumorale cytoplasmique de TP et survie des patients (Mitselou et al., 2012). D'autres études montrent en revanche qu'il n'existe pas de corrélation entre les niveaux intratumoraux des transcrits ou des protéines TP et le pronostic des patients traités par chimiothérapie à base de 5-FU (Ciaparrone et al., 2006; Yanagisawa et al., 2007; Soong et al., 2008).

La TP joue également un rôle dans l'angiogenèse. Tsujitani et collaborateurs (2004) ont montré une corrélation entre les taux de TP et de VEGF, et la densité des micro-vaisseaux dans des tumeurs gastriques (Tsujitani et al., 2004). Dans les tumeurs colorectales, l'expression intratumorale de la TP cytoplasmique est également associée à l'expression intratumorale et vasculaire de VEGF (Mitselou et al., 2012). La TP catalyse la conversion réversible de la thymidine en **dR-1-P** (**désoxyRibose-1-Phosphate**) et thymine. Par cette activité enzymatique, la TP génère des produits pro-angiogéniques. D'une part, le dR-1-P crée un état de stress oxydatif local puisqu'il est un agent de glycation des protéines et un générateur de ROS (Brown et al., 2000). Brown et collaborateurs (2000) suggèrent que la synthèse de ROS implique l'oxydation du dR-1-P catalysée par des ions métaux de transition oxydés tels que les ions **Cu²⁺** (**Cuivre II**) ou les ions **Fe³⁺** (**Fer III**). Le stress oxydatif induit la sécrétion des facteurs pro-angiogéniques VEGF, **IL-8** (**InterLeukine 8**) et **MMP-1** (**Matrix MetalloProteinase 1**) (Brown et al., 2000). D'autre part, le dR formé par déphosphorylation du dR-1-P puis relargué dans le milieu extracellulaire (Hotchkiss et al., 2003) a également un rôle pro-angiogénique. En effet, le dR stimule la migration et l'invasion des cellules endothéliales notamment par activation de la **FAK** (**Focal Adhesion Kinase**) (Hotchkiss et al., 2003) et de **S6K1** (**S6 Kinase 1**) (Seeliger et al., 2004). La FAK a un rôle important dans l'invasion et la migration cellulaire (McLean et al., 2005) et S6K1, cible importante de **mTOR** (**mammalian Target Of Rapamycin**), régule la prolifération cellulaire, le métabolisme et l'angiogenèse (Chiang and Abraham, 2007). Ainsi un niveau intratumoral élevé de TP entraîne une augmentation de l'angiogenèse et est donc associé à un mauvais pronostic (Takebayashi et al., 1996).

1.2.3. Inhibition de l'Orotate PhosphoRibosylTransférase (OPRT)

L'enzyme OPRT est codée par le gène **UMPS** (**UMP Synthase**) et catalyse la conversion du 5-FU en FUMP nécessaire à la production des métabolites actifs FUTP et FdUTP (cf. 2.2 page 55). Une diminution de l'expression de l'OPRT serait donc responsable d'une résistance au 5-FU par diminution de la production de ces métabolites actifs.

In vitro, les cellules cancéreuses coliques MIP101 résistantes au 5-FU sous-expriment l'OPRT par rapport aux cellules parentales. De plus, la sous-expression de **UMPS** par siRNA dans les cellules MIP101 parentales ainsi que dans les lignées HCT116, HT-29 et SW620 diminue leur sensibilité au 5-FU (Muhale et al., 2011; Griffith et al., 2013). *In vivo*, l'expression de l'OPRT est négativement corrélée à la progression du CCR et est positivement corrélée au taux de survie des patients traités par chimiothérapie à base de 5-FU (Tokunaga et al., 2007). D'autre part, les patients non répondeurs expriment significativement plus faiblement le gène **UMPS** par rapport aux patients répondeurs (Matsuyama et al., 2006; Kunicka et al., 2016). Enfin, l'activité de l'OPRT est positivement corrélée à la sensibilité des tumeurs colorectales au 5-FU et à la survie globale des patients (Isshi et al., 2002; Fujii et al., 2003; Ochiai et al., 2006) (**Figure 16**). Plusieurs SNP ont été identifiés sur le gène **UMPS** de

patients CCR mais n'ont pas été analysés pour leur association avec la réponse à la chimiothérapie (Panczyk, 2014).

2. Altération de la séquestration de la TS

2.1. Activation de la MéthylèneTétraHydroFolate Réductase (MTHFR)

La MTHFR est responsable de la conversion du 5,10-MTHF en 5-MTHF, ce qui diminue la quantité du cofacteur réduit 5,10-MTHF et l'activité de la TS (*cf.* **2.3.1 page 56**). Une augmentation de l'expression ou de l'activité de la MTHFR engendrerait donc une résistance au 5-FU par diminution de la concentration en 5,10-MTHF et donc de la formation du complexe 5,10-MTHF/FdUMP/TS.

L'utilisation d'oligodésoxynucléotides anti-sens de *MTHFR* augmente la sensibilité au 5-FU des cellules cancéreuses coliques SW-620 *in vitro* mais également *in vivo* en xénotransgreffe chez la souris (Stankova et al., 2005). Plusieurs SNP ont été identifiés dans le gène *MTHFR* et associés à une meilleure réponse au 5-FU *in vitro* et *in vivo* (K.-J. Sohn et al., 2004; Etienne-Grimaldi et al., 2010). En particulier, les polymorphismes 677C>T (rs1801133) et 1298A>C (rs1801131) responsables respectivement des substitutions Ala²²²Val et Glutamate (Glu)⁴²⁹Ala ont été montrés pour diminuer l'activité de l'enzyme MTHFR à des degrés variables. En effet, chez les patients avec des défauts du tube neural, l'activité enzymatique de MTHFR est réduite de 75% et 39% pour les individus avec les mutations homozygotes 677TT et 1298CC respectivement par rapport aux individus homozygotes sains (van der Put et al., 1998). Ces SNP engendrent une diminution des niveaux de 5-MTHF et une augmentation de ceux de 5,10-MTHF (Weisberg et al., 1998; Bagley and Selhub, 1998; K.-J. Sohn et al., 2004). L'accumulation en cofacteur réduit 5,10-MTHF favorise l'inhibition de la TS par formation du complexe 5,10-MTHF/FdUMP/TS et accroît donc l'effet cytotoxique du 5-FU (**Figure 16**). De manière intéressante, Wilcken et collaborateurs (2009) montrent que la fréquence du SNP 677C>T diffère selon les distributions ethnique et géographique. En effet, l'allèle T est plus fréquent en Chine (39,5%) et en Amérique (35,2%) qu'en Océanie (28,7%) ou au Moyen-Orient (25,7%). Il est également plus fréquent chez les Américains d'origine hispanique (41,1%) ou européenne (31,7%) que d'origine asiatique (21,2%) ou africaine (12,6%) (Wilcken et al., 2003).

2.2. Activation de la TS

La TS catalyse la méthylation réductrice du dUMP en dTMP en utilisant le cofacteur 5,10-MTHF. Elle est la cible principale du 5-FU par l'intermédiaire du métabolite actif FdUMP (*cf.* **2.3.2 page 56**). Une augmentation de l'expression ou de l'activité de la TS peut donc induire une résistance à la drogue. Ce chapitre sera détaillé ultérieurement (*cf.* **chapitre 4 page 86**).

3. Inhibition de l'effet cytotoxique du 5-FU

3.1. Perturbation du cycle cellulaire

Une perturbation du cycle cellulaire pourrait être impliquée dans la résistance au 5-FU. En effet, un ralentissement du cycle cellulaire pourrait empêcher l'incorporation dans l'ADN de métabolites actifs du 5-FU et permettre aux cellules cancéreuses de réparer les dommages à l'ADN (**Figure 17**).

3.1.1. Inhibition des complexes cycline/Cyclin-Dependent Kinase (CDK)

In vitro, les cellules cancéreuses coliques H630R10 résistantes au 5-FU présentent un retard du cycle cellulaire en phases G₁ et S précoce et un temps de synthèse d'ADN prolongé par rapport aux cellules parentales. Cette perturbation du cycle cellulaire pourrait être due à un déficit en complexes cycline E/CDK2 et cycline A/CDK2 impliqués respectivement dans la transition G₁/S et la progression en phase S du cycle cellulaire (*cf.* **3.1 page 57**). En effet, dans les cellules résistantes au 5-FU, l'expression de p21^{Cip1} et de p27^{Kip1} est augmentée et l'expression de cycline A, de CDK2 ainsi que la phosphorylation activatrice de CDK2 sur la Thr¹⁶⁰ sont réduites (**Guo et al., 2008**) (**Figure 17**).

In vivo, la présence du SNP 870G>A (rs9344) dans le gène *CCND1* codant la cycline D1 est associée à la réponse de patients avec un CCR de stade II ou III traités à la chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU (**Absenger et al., 2014**). Le gène *CCND1* code pour deux variants d'épissage majoritaires que sont les ARNm *CCND1a* contenant les exons 1 à 5 et *CCND1b* ne possédant pas l'exon 5 mais un exon 4 plus long en raison d'une polyadénylation alternative dans l'intron 4. La mutation 870G>A est située à la limite exon 4/intron 4 et est responsable d'une absence d'épissage de l'intron 4 et de la génération du variant *CCND1b*. Celui-ci code pour une protéine cycline D1b plus stable et plus active. Cette fonction oncogénique est associée à l'absence de la région **C-ter** (**Carboxy-terminale**) normalement responsable de sa dégradation rapide et de son export nucléaire (**Betticher et al., 1995**). Solomon et collaborateurs (2003) montrent que l'association du variant *CCND1b* avec CDK4 réduit la phosphorylation et l'inhibition de **pRB** (**protéine du RétinoBlasome**). L'avancée dans la phase S du cycle cellulaire est ainsi altérée (**Solomon et al., 2003**). De plus, contrairement à la cycline D1b, le recrutement de la cycline D1a à la chromatine permet celui de facteurs de réparation de l'ADN tels que ATM, nibrine ou **MDC1** (**Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1**) afin d'initier la réponse aux dommages à l'ADN (**Li et al., 2010**) (**Figure 17**). Les patients avec les génotypes 870GA ou 870AA présentent une réduction significative du délai de récurrence par rapport aux patients avec le génotype homozygote 870GG (**TTR** (**Time-to-Tumor Recurrence**) médian des génotypes 870GA et 870AA est de 60 mois et celui du génotype 870GG de 124 mois) (**Absenger et al., 2014**). D'autre part, l'expression de cycline D1a nucléaire est positivement associée à la survie des patients. En effet, les patients avec une forte expression nucléaire de cycline D1a présentent une survie sans rechute (**RFS, Relapse-Free Survival**) à 5 ans de 81% et une survie spécifique du CCR (**CSS, Colorectal cancer-Specific Survival**) à 5 ans de 84% (contre 63% et 77% respectivement chez les patients présentant une faible expression).

3.1.2. Acquisition du phénotype de Cellule Souche Cancéreuse (CSC)

Comme les CS pluripotentes normales, les CSC possèdent une longue durée de vie et une certaine quiescence leur permet d'échapper au traitement anti-cancéreux visant la division cellulaire (Bao et al., 2013) (cf. 2.1.3 page 32).

Plusieurs études ont notamment démontré que les cellules résistantes au 5-FU expriment les marqueurs CD133, CD24 et CD44 de CSC. Ces protéines de surface sont essentiellement retrouvées au niveau de radeaux lipidiques qui régulent les récepteurs membranaires et servent de plateformes pour la signalisation transmembranaires. CD133 est une glycoprotéine potentiellement impliquée dans l'organisation membranaire par sa localisation dans les protrusions membranaires et les radeaux lipidiques et sa capacité à se lier au cholestérol (Corbeil et al., 2001). Elle pourrait également être impliquée dans la polarité et la migration cellulaire par des interactions intercellulaires ou avec la MEC (Matrice ExtraCellulaire) (Giebel et al., 2004). CD24 est une sialoglycoprotéine liée à la membrane plasmique par son ancre GPI (GlycosylPhosphatidyInositol) et impliquée dans les interactions cellule-cellule ou cellule-MEC (Pierres et al., 1987). Enfin, CD44 est le principal récepteur de l'acide hyaluronique et est impliqué dans la croissance, la survie, la différenciation et la motilité cellulaires (Aruffo et al., 1990).

La première preuve que les CSC sont responsables de la résistance au 5-FU provient d'études sur des cellules cancéreuses coliques primaires isolées. En effet, il a été observé que les cellules cancéreuses exprimant CD133 (CD133⁺) étaient plus résistantes au 5-FU que les cellules ne l'exprimant pas (CD133⁻) (Todaro et al., 2007). L'expression de CD133 est négativement corrélée à la réponse et à la survie des patients avec un CCR traité par chimiothérapie à base de 5-FU (Ong et al., 2010). Néanmoins, la considération de CD133⁺ comme seul phénotype des CSC est contestée puisqu'il est estimé qu'une seule cellule tumorale CD133⁺ sur 262 est une CSC (O'Brien et al., 2007). Récemment, Paschall et collaborateurs (2016) ont montré que la combinaison de l'expression de CD133 et de la faible expression de CD24 (CD24^{lo}) caractérise le phénotype des CSC résistantes au 5-FU. Des études supplémentaires leur sont nécessaires pour confirmer si l'expression de CD44 et la forte expression de ALDH (ALDH^{hi}) font également partie du phénotype de ces cellules (Paschall et al., 2016). Néanmoins des études *in vitro* et *in vivo* semblent accréditer la présence de CD44 comme marqueur des CSC résistantes au 5-FU. En effet, les cellules cancéreuses coliques HT-29 résistantes au 5-FU présentent également une augmentation de la proportion de cellules avec les marqueurs CD133 et/ou CD44, une diminution de la prolifération cellulaire ainsi qu'une augmentation de la capacité à former des colonies ancrage-indépendantes (Dallas et al., 2009). D'autre part, la majorité des CSC CD133⁺ et CD44⁺ isolées de patients avec un CCR traité par chimiothérapie à base de 5-FU ou de capécitabine se trouve dans la phase G₀/G₁ du cycle cellulaire et leur présence est négativement corrélée à la survie des patients (Zahran et al., 2019) (Figure 17).

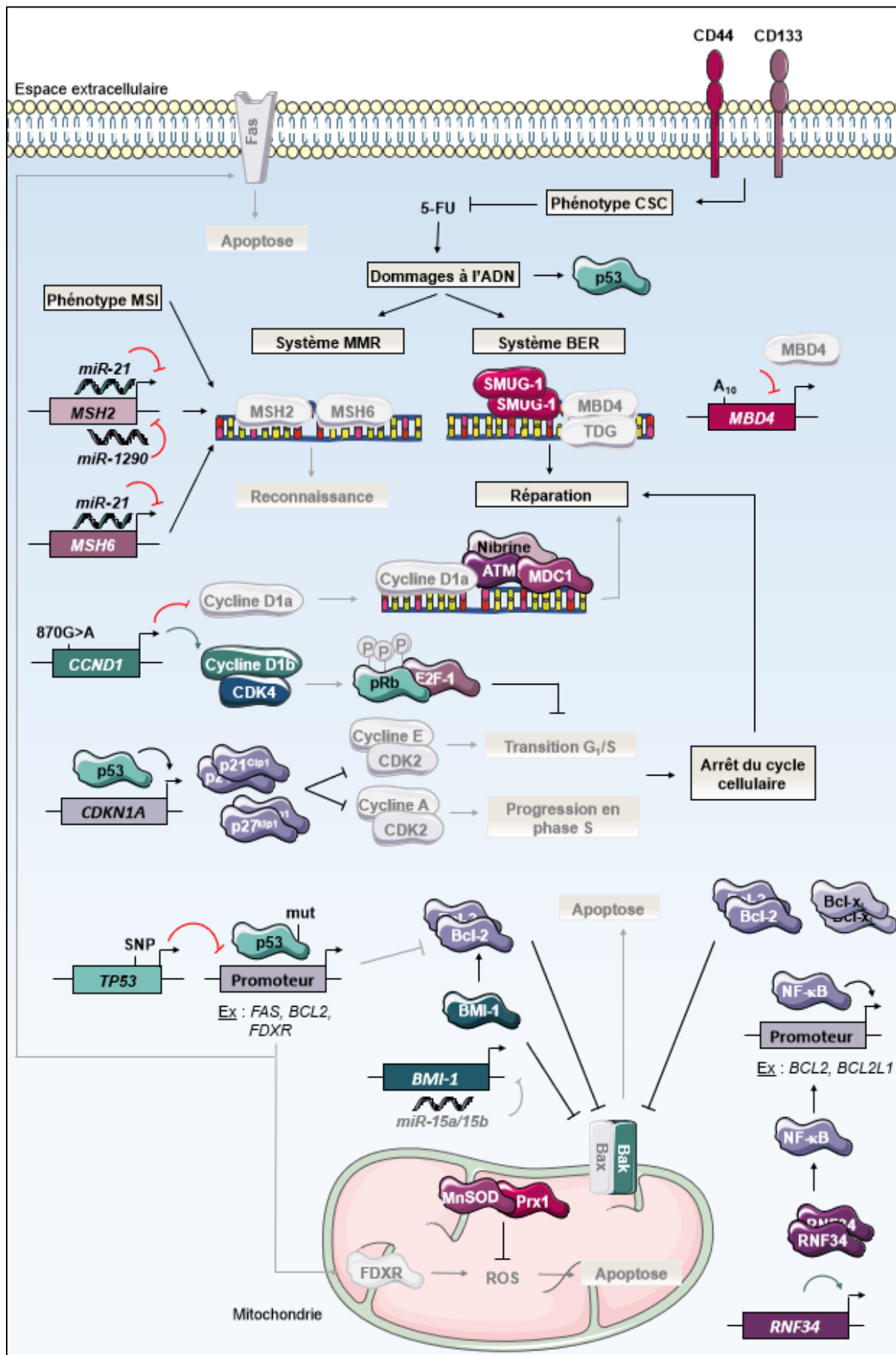


Figure 17 : Résistance au 5-FU induite par l'inhibition de son effet cytotoxique. La résistance au 5-FU peut avoir pour origine un défaut de reconnaissance des dommages à l'ADN par les systèmes MMR et BER, l'arrêt du cycle cellulaire par activation de p53 et de la cycline D1b, la réparation des dommages à l'ADN par SMUG-1, l'inhibition de l'apoptose par p53 mutée, BMI-1, RNF34 et les enzymes antioxydantes (MnSOD et Prx1) ou encore le phénotype CSC.

5-FU : 5-FluoroUracile ; **A** : Adénine ; **ADN** : Acide DéoxyriboNucléique ; **ATM** : Ataxia Telangiectasia Mutated ; **Bak** : Bcl-2 homologous antagonist killer ; **Bax** : Bcl-2-associated x ; **Bcl-2** : B-cell lymphoma 2 ; **BCL2L1** : BCL2-Like protein 1 ; **Bcl-x_L** : B-cell lymphoma-extral Large ; **BER** : Base Excision Repair ; **BMI** : B-cell-specific Moloney murine leukemia virus Insertion site ; **CDKN1A** : CDK INhibitor 1A ; **CCND1** : CyCliN D1 ; **CD** : Cluster de Différenciation ; **CDK** : Cyclin-Dependent Kinase ; **CSC** : Cellule Souche Cancéreuse ; **DNA** : DeoxyriboNucleic Acid ; **FDXR** : FerréDoXine Réductase ; **G₁** : Gap 1 phase ; **kDa** : kiloDalton ; **MBD4** : Methyl-CpG-Binding Domain protein 4 ; **MDC1** : Mediator of DNA damage Checkpoint protein 1 ; **miR** : micro-acide Ribonucléique ; **MMR** : MisMatch Repair ; **MnSOD** : Manganese SuperOxide Dismutase ; **MSH** : MutatorS Homolog ; **MSI** : MicroSatellite Instable ; **mut** : muté ; **NF-κB** : Nuclear Factor κB ; **p21^{Cip1}** : protein 21 kDa^{CDK-interaction protein 1} ; **p27^{kip1}** : protein 27 kDa^{Kinase-inhibitory protein 1} ; **p53** : protéine de 53 kDa ; **pRB** : protéine du RétinoBlastome ; **Prx1** : Peroxyrédoxine 1 ; **RNF34** : Really interesting new gene Finger Protein 34 ; **ROS** : Reactive Oxygen Species ; **S** : Synthesis phase ; **SMUG-1** : Single-strand selective Monofunctional Uracil DNA Glycosylase 1 ; **SNP** : Single-Nucleotide Polymorphism ; **TDG** : Thymidine DNA Glycosylase ; **TP53** : Tumor P53.

3.2. Inactivation de la reconnaissance des dommages à l'ADN

Une inactivation de la reconnaissance des dommages à l'ADN induits par le 5-FU pourrait prévenir de l'apoptose sous-jacente et provoquer une résistance à la drogue.

3.2.1. Inactivation du système MMR et activation des micro-ARN (miR)

Les hétérodimères Mut α et Mut β du système MMR (cf. 2.3.1 page 41) peuvent spécifiquement reconnaître et lier l'ADN modifié par le 5-FU afin d'induire la mort cellulaire (Tajima et al., 2004; Iwaizumi et al., 2011; Tajima et al., 2011). Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* démontrent une activité cytotoxique moins importante du 5-FU dans les cellules déficientes en MMR (Figure 17).

En effet, les cellules cancéreuses coliques HCT116 déficientes en MMR sont moins sensibles au 5-FU que les cellules HCT116+ch3 compétentes en MMR avec le phénotype MSS malgré une incorporation similaire de métabolites actifs du 5-FU dans l'ADN (Carethers et al., 1999). Le statut MSI est également prédictif de la réponse *in vivo* de tumeurs coliques de stade II et III à la chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU. La survie globale est ainsi augmentée chez les patients avec des tumeurs MSS ou MSI-L mais pas chez les patients avec des tumeurs **MSI-H (MSI-High frequency)** (Ribic et al., 2003; Carethers et al., 2004). De manière intéressante, dans un microenvironnement tumoral acide, l'expression de MLH1 est réduite dans les cellules cancéreuses coliques SW480 mais celle-ci n'augmente pas la résistance de cellules au 5-FU (Iwaizumi et al., 2013). Les auteurs suggèrent l'implication de certaines protéines du système **Base Excision Repair (BER)** dans la cytotoxicité de la drogue (Figure 17).

Récemment, des **miR (micro-ARN)** ont été identifiés comme régulateurs de l'expression des protéines du système MMR et de la réponse au 5-FU. Ye et collaborateurs (2017) ont montré que *miR-1290* cible la région 3' non traduite (**3'-UTR, 3'-Untranslated Transcribed Region**) du gène *MSH2* et éteint son expression. Ainsi, l'inhibition de *miR-1290* augmente la sensibilité au 5-FU des cellules cancéreuses coliques HCT116 *in vitro* et *in vivo* après xénogreffe chez la souris en induisant l'apoptose *via* l'activation de *MSH2*. L'expression de *miR-1290* est négativement corrélée *in vitro* à la réponse au 5-FU, *in vivo* au statut de compétence du système MMR (présence de l'expression de l'ensemble des protéines MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) et à la réponse de patients avec un CCR de stade II ou III traités par chimiothérapie à base de 5-FU (Ye et al., 2017) (Figure 17). D'autre part, *miR-21* peut également cibler le 3'-UTR des gènes *MSH2* et *MSH6* et induire une diminution de leur taux protéique (Valeri et al., 2010). Dans les cellules cancéreuses coliques LoVo, la surexpression de *miR-21* réduit leur arrêt en phase G₂/M et leur mort par apoptose notamment par inhibition de *MSH2*. Elle induit également leur résistance au 5-FU dans un modèle de xénogreffe chez la souris (Valeri et al., 2010). Par ailleurs, l'expression de *miR-21* est négativement corrélée à la survie des patients traités par chimiothérapie à base de 5-FU (Schetter et al., 2008) (Figure 17).

3.2.2. Activation du système Base Excision Repair (BER)

Les UDG du système BER **MBD4** (**Methyl-CpG-Binding Domain protein 4**) (Petronzelli et al., 2000), **SMUG-1** (**Single-strand selective Monofunctional Uracil DNA Glycosylase-1**) (An et al., 2007), **TDG** (**Thymidine DNA Glycosylase**) (Hardeland et al., 2000) et **UNG2** (**Uracil-DNA Glycosylase 2**) (Grogan et al., 2011) sont capables d'exciser le FU incorporé et apparié aux bases G et A de l'ADN (**Figure 18**). Plusieurs études montrent que la surexpression de *SMUG-1* et la sous-expression de *MBD4* ou de *TDG* augmentent la résistance au 5-FU tandis que *UNG2* n'est pas impliquée dans la cytotoxicité du 5-FU (Andersen et al., 2005).

In vitro, la sous-expression et la surexpression de *SMUG-1* augmente et diminue respectivement la sensibilité au 5-FU des fibroblastes **MEF** (**M**ouse **E**mbyronic **F**ibroblast) et des cellules de glioblastome LN-428 (An et al., 2007; Nagaria et al., 2013) (**Figure 17**). Au contraire, l'inactivation par l'utilisation de siRNA et la surexpression de *TDG* diminue et augmente respectivement la sensibilité des cellules cancéreuses du col de l'utérus HeLa (Kunz et al., 2009). L'excision du FU incorporé dans l'ADN par TDG engendre des cassures persistantes, active CHK1 et retarde la progression des cellules en phase S. Kunz et collaborateurs (2009) expliqueraient ces résultats contradictoires par des modes de dissociation de l'ADN distincts pour SMUG-1 et TGD (Kunz et al., 2009). En effet, l'**APE1** (**AP** (**AP**urique/**AP**yrimidique) **E**ndonucléase **1**) entre directement en compétition avec SMUG-1 (Pettersen et al., 2007) au niveau du site AP généré alors que TDG doit être SUMOylée pour se dissocier de l'ADN (Hardeland et al., 2002). Le mécanisme de réparation BER en aval de SMUG-1 est rapide alors que celui en aval de TDG est retardé. Ainsi, certains sites AP générés par TDG échapperaient à la réparation jusqu'à ce qu'ils interfèrent avec la réplication de l'ADN et entraînent l'arrêt du cycle cellulaire (**Figure 17**).

Parallèlement, la déficience en MBD4 augmente la résistance *in vitro* des fibroblastes MEF (Cortellino et al., 2003) et *in vivo* dans les cryptes intestinales murines (Sansom et al., 2003). Plus récemment, Collura et collaborateurs (2014) ont identifié la mutation de *MBD4* comme marqueur moléculaire bénéfique de la chimiothérapie à base de 5-FU avec une augmentation de la RFS des patients avec un CCR de stade II ou III présentant un phénotype MSI (Collura et al., 2014). De manière intéressante, il existe un lien entre MBD4 et le système MMR. D'une part, MBD4 interagit avec MLH1 au niveau de son domaine glycosylase (Bellacosa et al., 1999) et, d'autre part, des mutations du gène *MBD4* ont été rapportées dans des CCR avec un phénotype MSI (Riccio et al., 1999; Bader et al., 1999; Bader et al., 2000). En effet, la séquence codante de *MBD4* humain contient une répétition A₁₀ au niveau du codon 310-313 qui peut être sujet à une mutation de raccourcissement du cadre de lecture (A₁₀ à A₉) produisant la protéine **TruMBD4** (**T**runcated **M**BD4) dépourvue de son domaine glycosylase.

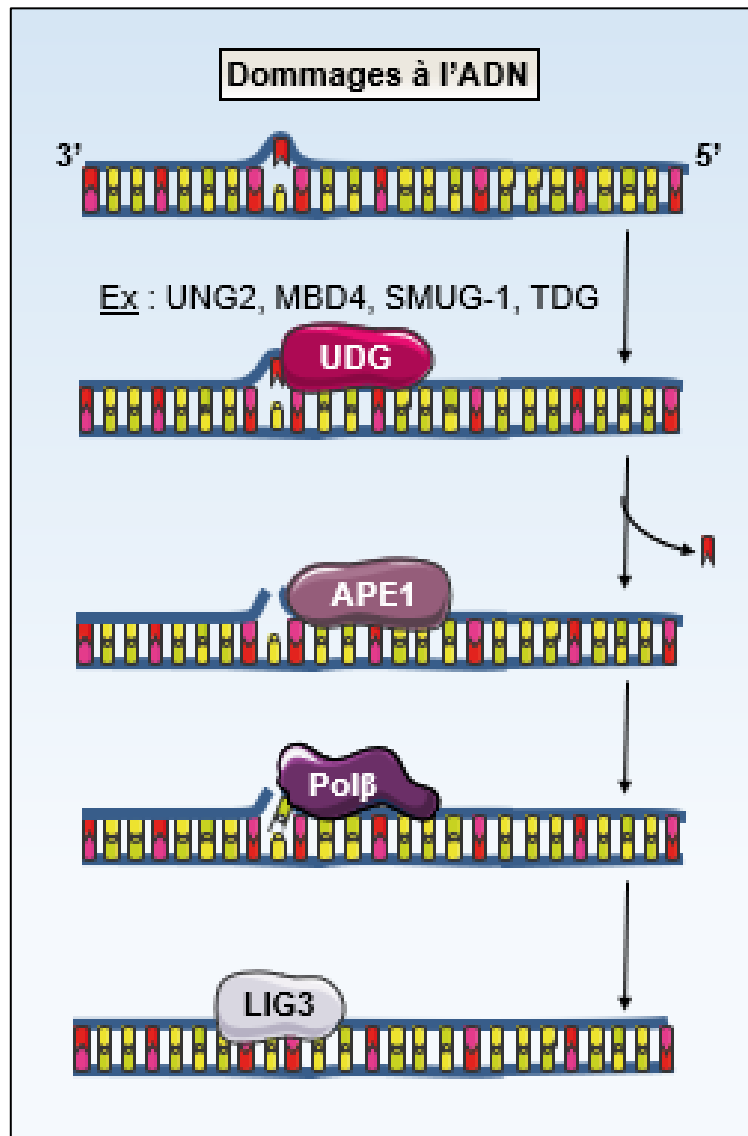


Figure 18 : Mécanisme de réparation des dommages à l'ADN par le système Base Excision Repair (BER). Les principales étapes du système BER comprennent l'élimination d'une base inappropriée par une ADN glycosylase (UDG pour l'uracile), le clivage du squelette phosphodiester au site abasique AP par APE1, le remplacement du nucléotide excisé par POLβ et la suture du brin réparé par LIG3.

ADN : Acide DéoxyriboNucléique ; **AP** : APurine/APyrimidine ; **APE1** : AP Endonucléase 1 ; **BER** : Base Excision Repair ; **DNA** : DeoxyriboNucleic Acid ; **LIG3** : ADN LIGase 3 ; **MBD4** : Methyl-CpG-Binding Domain protein 4 ; **POLβ** : ADN POLymérase β ; **SMUG-1** : Single-strand selective Monofunctional Uracil DNA Glycosylase 1 ; **TDG** : Thymidine DNA Glycosylase ; **UDG** : Uracil-DNA-Glycosylase ; **UNG2** : Uracil-DNA Glycosylase 2.

La déficience en MBD4 ou la présence de TruMBD4 pourrait différemment moduler la cytotoxicité du 5-FU. D'un côté, Wyatt et Wilson (2009) suggèrent que la déficience en MBD4 pourrait induire une réponse aux dommages à l'ADN dépendante d'un système MMR altéré et augmenter la résistance au 5-FU (Wyatt and Wilson, 2009). De l'autre côté, Suzuki et collaborateurs (2016) montrent dans des cellules cancéreuses coliques que TruMBD4 lie le FU incorporé dans l'ADN avec une plus grande affinité que MBD4 et qu'il réduit également l'affinité de liaison à la drogue des protéines de reconnaissance MSH3 et MSH6 du complexe MMR. En revanche, la surexpression de *TruMBD4* augmente l'arrêt en phase S induit par le 5-FU indépendamment de MLH1. Les auteurs confirment ainsi que les patients avec des CCR déficients en MMR et présentant une résistance caractéristique au 5-FU pourraient être plus sensibles à la drogue dans le cas d'une mutation engendrant la protéine TruMBD4 (Suzuki et al., 2016) (Figure 17).

3.3. Inactivation de l'apoptose

3.3.1. Inactivation de p53

Les voies apoptotiques extrinsèque et intrinsèque induites par le 5-FU sont partiellement dépendantes de p53 (cf. 3.2 page 58). Ainsi, une inactivation de ce suppresseur de tumeur pourrait être à l'origine d'un défaut d'initiation de l'apoptose et d'une résistance à la drogue.

Le statut mutationnel de *TP53* a été corrélé à la réponse du CCR au 5-FU. *In vitro*, les cellules déficientes ou mutées pour le gène *TP53* sont significativement plus résistantes au 5-FU que les lignées avec *TP53* sauvage (O'Connor et al., 1997; Bunz et al., 1999). Plusieurs études montrent que, par rapport à *TP53* sauvage, la mutation de *TP53* diminue la survie globale et le temps d'apparition de métastases pour les patients avec un CCR traité par chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU (Ahmed et al., 2008; Kandioler et al., 2015). La majorité des mutations identifiées *in vitro* et *in vivo* ont lieu dans le domaine de liaison à l'ADN de p53. Ce domaine reconnaît et se lie aux séquences d'ADN consensus spécifiques présentes dans les régions régulatrices des gènes cibles (Hollstein et al., 1994; O'Connor et al., 1997). En plus d'empêcher l'activation des gènes régulateurs du cycle cellulaire et pro-apoptotiques tels que *CDKN1A* codant p21^{Cip1}, *FAS* et *BCL2*, une autre hypothèse envisagée est que la mutation de *TP53* conférerait un gain de fonction à la protéine avec des activités anti-apoptotiques et pro-métastatiques contribuant à l'agressivité du cancer (Oren and Rotter, 2010) (Figure 17). Certains polymorphismes sont par ailleurs de bon pronostic. Ainsi, le SNP dans l'exon 4 de *TP53* entraînant la substitution **Arg(Arginine)⁷²Pro(Proline)** (rs1042522) augmente la capacité de p53 à lier l'ADN et à activer la transcription de ses gènes cibles. Les patients avec un CCR de stade Dukes C (stade III AJCC) arborant la mutation Arg⁷²Pro bénéficient de la chimiothérapie post-opératoire à base de 5-FU (Godai et al., 2009). Récemment, Gokare et collaborateurs (2017) ont montré par « *KI* » (*Knock-In*) dans les fibroblastes MEF traités au 5-FU, que les allèles *TP53* homozygotes Arg⁷²Pro diminuent plus fortement l'expression du gène *DPYD* codant l'enzyme DPD du catabolisme du 5-FU que les allèles homozygotes sauvages (Gokare et al., 2017) (Figure 17).

3.3.2. Régulation des membres de la famille B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)

Les membres de la famille Bcl-2 jouent un rôle crucial dans la régulation du mécanisme d'apoptose intrinsèque (cf. 3.2.2 page 64). Ainsi une inhibition des protéines pro-apoptotiques (ex : Bax et Bak) et/ou une activation des protéines anti-apoptotiques (ex : Bcl-2 et Bcl-x_L) peuvent protéger les cellules de cette mort induite par le 5-FU et les rendre résistantes à la drogue. Plusieurs études révèlent que l'oncogène **BMI-1** (**B**-cell-specific **M**oloney murine leukemia virus **I**nsertion site **1**) et l'E3 ubiquitine ligase **RNF34** (**R**ING (**R**eally **I**nteresting **N**ew **G**ene) **F**inger **P**rotein **34**) sont impliqués dans la protection des cellules cancéreuses de l'apoptose par régulation des membres de la famille Bcl-2.

Dans les cellules de carcinomes nasopharyngé et hépatique, l'inactivation de *BMI-1* par siRNA diminue l'activation de AKT et l'expression de Bcl-2, augmente l'expression de Bax et sensibilise les cellules au 5-FU (Qin et al., 2008; Wu et al., 2012). De manière intéressante, BMI-1 a été identifié comme cible directe de *miR-15a* et *miR-15b* (Sun et al., 2012; Wu et al., 2016). Or, récemment, l'expression de ces micro-ARN a été positivement corrélée à la réponse du CCR à la chimiothérapie à base de 5-FU (Fesler et al., 2017; Ji et al., 2018) (Figure 17).

Parallèlement, Sasaki et collaborateurs (2005) ont montré que l'expression de *RNF34* est également positivement corrélée à la résistance au 5-FU des cellules cancéreuses coliques *in vitro* et *in vivo* après xénotransgreffe chez la souris (Sasaki et al., 2005). De plus, la surexpression de *RNF34* dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 diminue l'apoptose intrinsèque induite par le 5-FU et leur sensibilité à la drogue (Konishi et al., 2006). En effet, la surexpression de *RNF34* augmente l'activité transcriptionnelle de *NF-κB* qui régule positivement l'expression des gènes anti-apoptotiques *BCL2* et *BCL2L1* codant Bcl-x_L, et augmente le rapport relatif d'expression des gènes *BCL2/BAX* et *BCL2/BAK1* (Konishi et al., 2006; Sasaki et al., 2006). L'activation de *NF-κB* est le mécanisme clé de cette résistance au 5-FU puisque l'utilisation d'inhibiteurs de ce facteur de transcription réverse la régulation de *BCL2* et *BCL2L1* ainsi que la résistance acquise par les cellules surexprimant *RNF34* (Konishi et al., 2006). De manière intéressante, en plus d'inhiber l'apoptose intrinsèque, la surexpression de *RNF34* protège les cellules HCT116 de l'apoptose extrinsèque induite par TNFα et TRAIL (Konishi et al., 2005). Compte tenu de l'implication de *NF-κB* dans l'apoptose extrinsèque induite par le 5-FU (cf. 3.2.2 page 64), une surexpression de *RNF34* pourrait également inhiber ce processus de mort cellulaire et provoquer une résistance (Figure 17).

3.3.3. Régulation du stress oxydant

La réponse adaptative cellulaire au ROS est un autre mécanisme de résistance au 5-FU. Alors que le stress oxydant aigu déclenche l'apoptose, le stress oxydant chronique induit une instabilité génomique et est impliqué dans la progression tumorale et la résistance au médicament.

In vitro, en réponse au 5-FU, p53 active l'expression de *FDXR* qui est responsable de la production de ROS participant au mécanisme d'apoptose (Hwang et al., 2001) (cf. 3.2.2 page 64). De manière intéressante, Ichikawa et collaborateurs (2006) montrent que l'expression du gène *FDXR* est positivement corrélée à la réponse et à la survie des patients avec un CCR de stade IV traité par régime 5-FU/LV (Ichikawa et al., 2006). De plus, l'expression de *FDXR* est diminuée chez les patients avec une mutation de *TP53* (Ichikawa et al., 2006), mutation qui a été préalablement montrée pour être de mauvais pronostic (Ahmed et al., 2008; Kandioler et al., 2015) (Figure 17).

In vitro, Yao et collaborateurs (2017) montrent que le niveau de ROS est plus élevé dans les cellules cancéreuses coliques SNUC5 résistantes au 5-FU que dans les cellules parentales sensibles (Yao et al., 2017). L'inactivation de *ROMO1* par l'utilisation de siRNA bloque la synthèse de ROS générés par le 5-FU (Hwang et al., 2007). Les cellules cancéreuses pulmonaires H1299 qui s'adaptent au stress oxydatif induit par la transfection stable de *ROMO1* surexpriment les enzymes antioxydantes **MnSOD** (**M**anganese **S**uper**O**xide **D**ismutase), **Prx1** (**P**eroxyrédoxine **1**) ainsi que Bcl-2 et deviennent résistantes au 5-FU. Récemment, l'expression de *ROMO1* a été négativement corrélée à la survie des patients avec un CCR traité par chimiothérapie à base de 5-FU (Kim et al., 2017) (Figure 17).

Chapitre 4 :

La Thymidylate Synthase (TS)

Chapitre 4 : La Thymidylate Synthase (TS)

1. Caractéristiques générales de la TS

Mise en évidence pour la première fois dans les années 1950 (Friedkin and Roberts, 1956), la TS (EC :2.1.1.45) est une enzyme ubiquitaire nucléocytoplasmique et mitochondriale (Samsonoff et al., 1997) hautement conservée. Elle est retrouvée dans l'ensemble des tissus humains avec des niveaux plus abondants dans les testicules, les ovaires, la moelle épinière, la prostate et le côlon (Li et al., 2001).

1.1. Gène *ThYMidylate Synthase* (*TYMS*)

Chez l'Homme, le gène *TYMS* (*ThYMidylate Synthase*) est localisé dans la région télomérique du chromosome 18 (en position 18p11.32) (Hori et al., 1990) et est constitué de 7 exons et de 6 introns (Kaneda et al., 1990) (Figure 19).

La région 5'-UTR du gène *TYMS* ne contient pas de séquences promotrices eucaryotes consensus tels que les boîtes TATA, CAAT ou GC (Kaneda et al., 1990). En revanche, une boîte CACCC de liaison aux facteurs de transcription à doigts de zinc de la famille Kruppel tel que **Sp1** (Specificity protein 1) (localisée dans la région -228 à -221 nucléotides (nt) en amont du codon initiateur ATG) et un motif GAGGCGGAG de liaison à Sp1 (localisée dans la région -150 à -142 nt) constituent les principales séquences activatrices (Horie and Takeishi, 1997). La boîte CACCC est flanquée par deux séquences régulatrices négatives **NRS** (Negative Regulatory Sequence) (localisées dans les régions -338 à -270 et -212 à -202 nt) qui présentent le motif consensus TTCCC de liaison à E2F (Horie and Takeishi, 1997). D'autres motifs potentiels de liaison aux facteurs de transcription Sp1, E2F, **Ets** (E26 transformation-specific) et **LSF** (Late Simian Virus 40 Factor) ont été identifiés au niveau des régions promotrice et intronique du gène *TYMS* (Dong et al., 2000) (Figure 19).

1.2. Structure

Dans les années 1990, les structures cristallines de la TS bactérienne et humaine ont été résolues et ont permis de mettre en évidence une conformation tridimensionnelle hautement conservée entre les différentes espèces (Hardy et al., 1987; Schiffer et al., 1991). Structurellement, la TS est composée de sept hélices α et de dix brins β disposés en trois couches ancrées dans un large feuillet β . Les feuillets β des monomères s'agencent l'un contre l'autre pour former l'interface dimérique (Almog et al., 2001). La TS est caractérisée par un grand domaine (résidus ¹Met-Ala⁹⁸ et ¹³⁰Asp-Val³¹³) présentant une structure mixte α/β et constituant le noyau conservé de l'enzyme, et par un petit domaine très variable (résidus ⁹⁹Lys-Gly¹²⁹) en termes d'extensions et de structures entre les différents organismes (Figure 20).

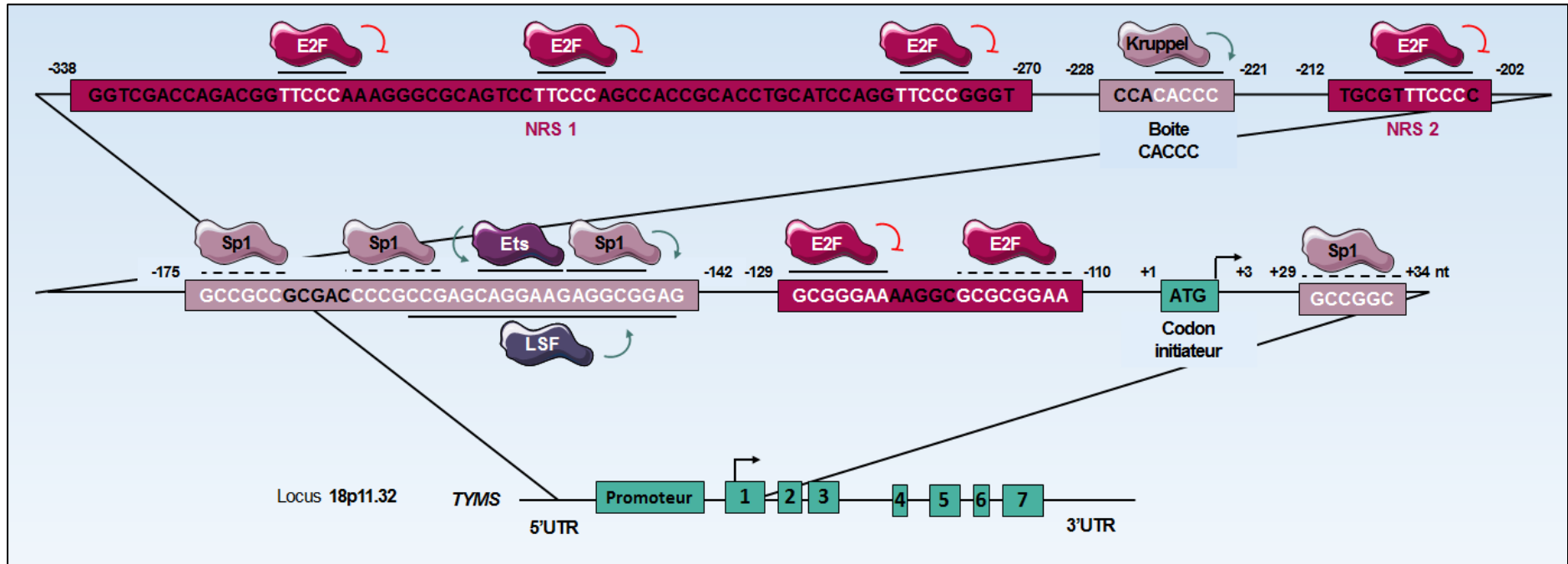


Figure 19 : Gène de la Thymidylate Synthase (TS) humaine. Le gène *TYMS* est constitué de 7 exons (boîtes vertes) et de 6 introns. Sa région 5'-UTR contient des séquences de liaison avérées (trait plein) ou potentielles (trait en pointillés) aux facteurs de transcription, Sp1, de la famille Kruppel, E2F, Ets et LSF qui peuvent avoir une activité transcriptionnelle positive (boîte CACCC) ou négative (régions NRS 1 et 2).

A : Adénine ; **C** : Cytosine ; **Ets** : E26 transformation-specific ; **G** : Guanine ; **LSF** : Late Simian virus 40 Factor ; **NRS** : Negative Regulatory Sequence ; **nt** : nucléotide ; **Sp1** : Specificity protein 1 ; **T** : Thymine ; **TYMS** : *ThYMidylate Synthase*.

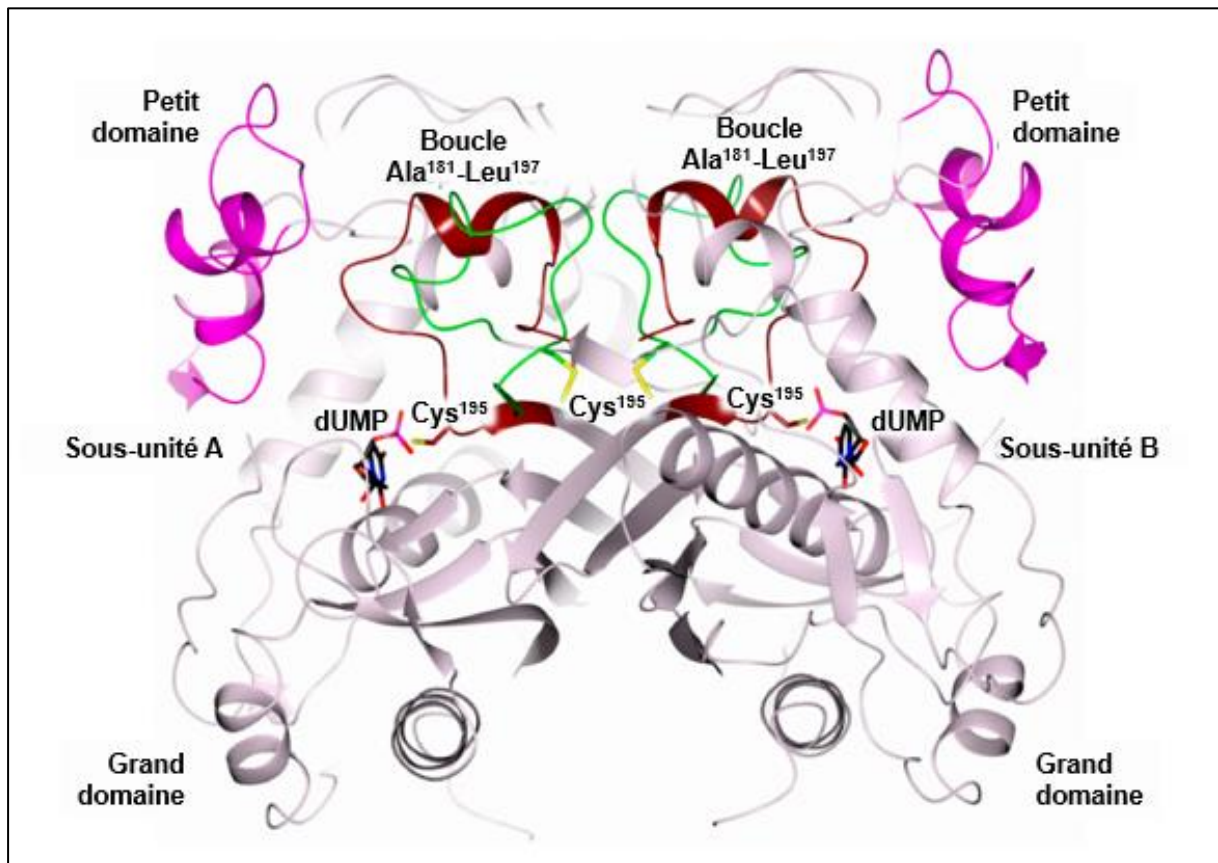


Figure 20 : Structure de la TS humaine. La TS est un homodimère symétrique dont chaque monomère de 36 kDa est constitué de 7 hélices α et 10 feuillets β à l'interface dimérique. La TS possède un grand domaine conservé (en rose pâle, résidus $^1\text{Met-Ala}^{98}$ et $^{130}\text{Asp-Val}^{313}$) contenant la boucle catalytique (résidus $^{181}\text{Ala-Leu}^{197}$), ainsi qu'un petit domaine très variable entre les organismes (en rose vif, résidus $^{99}\text{Lys-Gly}^{129}$) contenant la région de liaison au 5,10-MTHF (résidus $^{107}\text{Lys-Ser}^{114}$). Le site catalytique Cys 195 est représenté dans sa conformation inactive à l'interface dimérique (en vert) et active liant le substrat dUMP dans la cavité catalytique (en marron). Figure de la structure cristallographique de l'homodimère de la TS humaine complexée ou non au dUMP adaptée de [Pozzi, Ferrari, et al., 2019](#).

5,10-MTHF : 5,10-MéthylèneTrétraHydroFolate ; **Ala** : Alanine ; **Cys** : Cystéine ; **dUMP** : désoxyUridine MonoPhosphate ; **kDa** : kiloDalton ; **Leu** : Leucine ; **TS** : Thymidylate Synthase.

Chez l'Homme, la structure quaternaire de la TS consiste en un homodimère symétrique composé de deux sous-unités de 36 kDa qui possèdent chacune un site actif. La TS est une enzyme allostérique qui bascule entre les conformations active et inactive par le biais de réarrangements structurels étendus impliquant la boucle catalytique située au niveau des résidus ¹⁸¹Ala-**Leu** (**Leucine**)¹⁹⁷ (Pozzi, Ferrari, et al., 2019) (Figure 20).

1.3. Activité enzymatique

Les deux sous-unités de la TS présentent des sites de fixation pour le 5,10-MTHF (résidus ¹⁰⁷Lys-Ser¹¹⁴) et des sites de liaison nucléotidiques NBS conservés (Chen et al., 2017). La réaction enzymatique de la TS bactérienne (*Escherichia coli*) suit une cinétique enzymatique bi-bi ordonnée avec, en premier lieu, la liaison covalente du dUMP dans le site actif puis celle du 5,10-MTHF (Figure 21). Une flexibilité plus importante dans l'ordre de liaison des substrats serait retrouvée chez la TS humaine (Islam et al., 2018). Il s'agit d'une activité enzymatique engageant la « moitié du site » car les deux monomères de la TS coopèrent négativement entre eux (Dev et al., 1994; Lovelace et al., 2007). En effet, la liaison du dUMP et du 5,10-MTHF sur un des sites actifs de l'enzyme TS fongique (*Pneumocystis carinii*) entraînerait des changements de conformation qui diminuent l'affinité du second site actif pour ces mêmes substrats (Anderson et al., 1999). Très récemment, sur l'observation initiale de structures cristallographiques de la TS humaine liant simultanément le dUMP dans les deux sites actifs, Bonin et collaborateurs (2019) ont montré une coopération positive de liaison du dUMP entre les deux monomères. Ce mécanisme implique d'autres étapes du cycle de réaction à l'origine de l'activité « moitié du site » du dimère TS (Bonin et al., 2019).

1.4. Phylogénie

La TS représente l'une des enzymes les mieux conservées entre les organismes vivants avec une homologie de séquence en acides aminés très élevée entre les homologues procaryotes et eucaryotes. Il existe 53% d'homologie entre la TS humaine et celle d'*Escherichia coli* (Takeishi et al., 1985).

En particulier, un certain nombre d'acides aminés clés sont conservés parmi l'ensemble des espèces incluant de nombreux résidus essentiels pour la réaction catalytique. Ainsi, la séquence entre les résidus ¹⁹²Leu-**His** (**Histidine**)¹⁹⁶ et contenant la Cys¹⁹⁵, résidu pivot du site catalytique, est conservée dans l'ensemble des organismes vivants. Au contraire, une région **N-ter** (**amino-terminale**) composée d'une vingtaine d'acides aminés supplémentaires est retrouvée dans l'ensemble des organismes vivants hormis les bactéries. Cette région hautement désordonnée est impliquée dans la stabilité de l'enzyme (Peña et al., 2006; Peña et al., 2009) (cf. 2.2.3.2 page 107).

De manière intéressante, chez les protozoaires et les plantes, la protéine TS existe sous la forme d'un polypeptide bi-fonctionnel présentant à la fois les activités TS et DHFR au niveau C-ter et N-ter respectivement (Ivanetich and Santi, 1990; Lazar et al., 1993). Les organismes eucaryotes du règne animal possèdent quant à eux deux gènes *TYMS* et *DHFR* indépendants et distincts codant des enzymes agissant en parallèle.

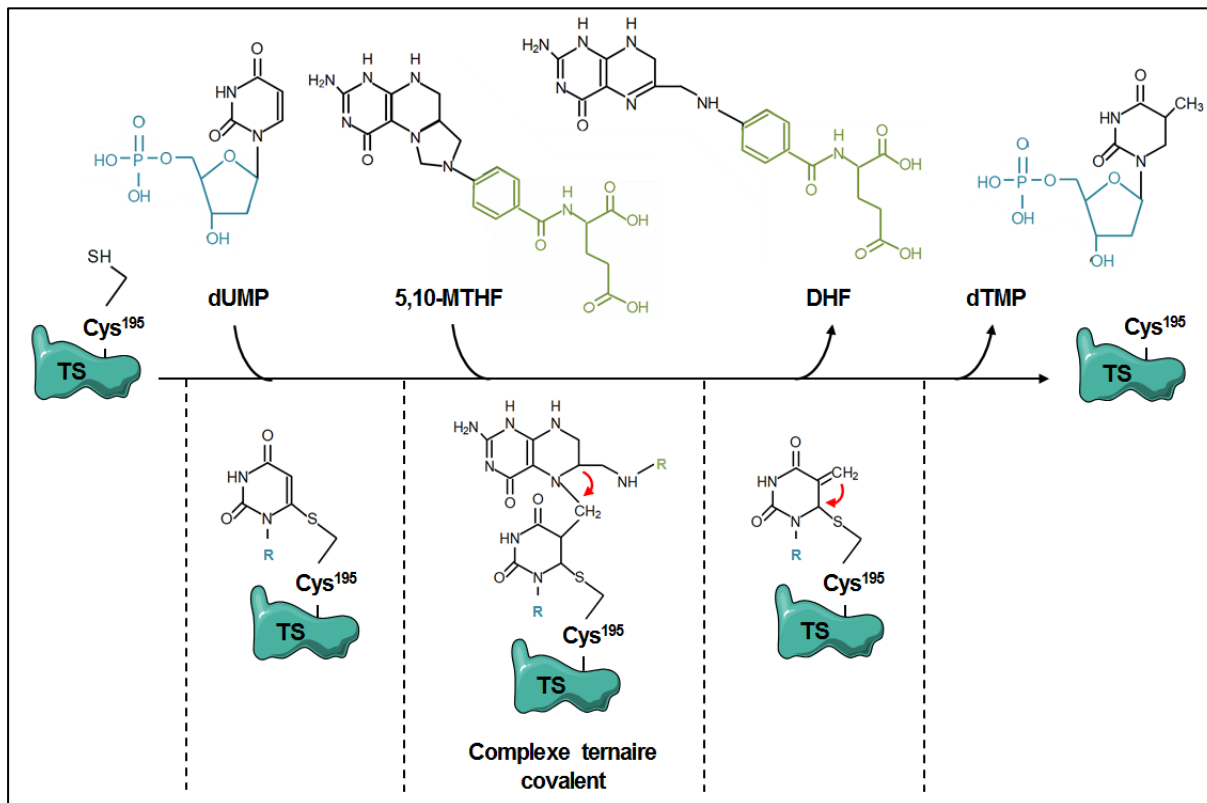


Figure 21 : Réaction enzymatique de la TS. L'attaque nucléophile du C₆ de l'uracile par le groupement thiol (SH) de la Cys¹⁹⁵ de la TS résulte en la formation d'un intermédiaire énolate activé au niveau du C₅. L'énolate attaque ensuite l'ion iminium au niveau du groupe méthylène (CH₂) du 5,10-MTHF engendrant la formation d'un complexe ternaire covalent. Cette étape est suivie par l'abstraction du proton en C₅ de l'uracile et la β-élimination du THF générant un intermédiaire méthylène exocyclique. Finalement, le transfert de l'ion hydruure du THF au niveau du C₅ de l'uracile et la β-élimination de l'enzyme permet la formation des produits dTMP et DHF.

5,10-MTHF : 5,10-MéthylèneTrétraHydroFolate ; **Cys** : Cystéine ; **DHF** : DiHydroFolate ; **dTMP** : désoxyThymidine MonoPhosphate ; **dUMP** : désoxyUridine MonoPhosphate ; **TS** : Thymidylate Synthase.

2. Régulation de la TS

2.1. Régulation physiologique de la TS au cours du cycle cellulaire

L'expression et l'activité de la TS sont régulées au cours du cycle cellulaire en réponse aux besoins cellulaires. Ainsi ces niveaux sont plus importants au cours de la phase S et diminuent en phase G₂ (Jenh et al., 1985; Nagarajan and Johnson, 1989; Johnson, 1994; Le François et al., 2007). Au cours de la phase S, la voie de biosynthèse *de novo* du dTMP s'assemble, dans le noyau, sous la forme d'un complexe multienzymatique associé à la lamine et composé de SHMT1, TS, DHFR ainsi que d'autres acteurs de la machinerie de réplication et de réparation de l'ADN tels que **PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen)** (Anderson et al., 2012). Dans la mitochondrie, la voie de biosynthèse *de novo* du dTMP nécessite la localisation de SHMT2, TS et **DHFRL1 (DHFR-Like 1)** au niveau de la membrane interne et de la matrice mitochondriales (Anderson et al., 2011).

Les résultats démontrant que la TS est une enzyme dépendante de la phase S du cycle cellulaire proviennent d'études réalisées sur des cellules synchronisées. Ainsi, dans les fibroblastes murins 3T6 synchronisés par sélection mitotique, l'ARNm *TYMS* est augmenté de 5 à 10 fois à mesure que les cellules progressent de la phase G₁ à la mi-phase S (Nagarajan and Johnson, 1989). Dans ces mêmes cellules synchronisées par privation de sérum, l'activité de la TS est augmentée 17 fois après l'addition de sérum et l'entrée des cellules en phase S (Navalgund et al., 1980). Dans les fibroblastes TIG-1 synchronisés par privation de sérum, la réplication de l'ADN commence 12 heures après la stimulation par le sérum et atteint son maximum après 24 heures. En parallèle, les niveaux d'ARNm et l'activité de la TS sont augmentés jusqu'à environ 14 fois et 10 fois respectivement après 24 heures de stimulation (Ayusawa et al., 1986).

Des événements transcriptionnels, post-transcriptionnels et post-traductionnels régulent l'expression, l'activité et la localisation subcellulaire de la TS. Ainsi, ces événements assurent des niveaux suffisants de TS nécessaires à la synthèse d'un pool de dTMP et au maintien de l'intégrité de l'ADN par prévention de l'incorporation d'uracile en excès durant la réplication (**Figure 22**).

2.1.1. Régulation transcriptionnelle

L'expression de la TS est notamment régulée par les facteurs de transcription E2F-1 et LSF ainsi que par des protéines régulatrices de la **TS (rTS)**.

Au cours de la transition G₁/S, l'inactivation de pRB par hyper-phosphorylation permet le relargage d'E2F-1. En retour, E2F-1 est capable d'activer la transcription de la TS et d'autres enzymes impliquées dans la synthèse des désoxynucléotides telles que DHFR, TK et RR dans les cellules fibroblastiques embryonnaires de rat REF52 (DeGregori et al., 1995; Helin, 1998) (**Figure 22**).

Dans les fibroblastes murins NIH-3T3 synchronisés et restimulés, LSF induit l'expression de la TS en phase S en se fixant sur les régions promotrice et intronique du gène *TYMS*. Le blocage de l'activité endogène de LSF par l'utilisation d'un allèle muté dominant négatif de LSF a permis de démontrer qu'en absence d'activité de ce facteur de transcription, le niveau basal de TS est insuffisant pour permettre une répllication correcte de l'ADN et induit, en conséquence, sa fragmentation (Powell et al., 2000) (Figure 22).

Des études sur le gène humain *TYMS* ont également permis de mettre en évidence des protéines régulatrices rTS α (41 kDa), rTS β (47 kDa) et rTS γ (52 kDa). Celles-ci sont codées par épissage alternatif du gène *rTS* (également nommé **ENOSF1 (ENOlase (ENO) SuperFamily member 1)** qui chevauche l'extrémité 3'-UTR de *TYMS*. Plusieurs données révèlent une implication directe des produits du gène *rTS* dans l'expression et/ou la fonction de la TS (Figure 22). Il a ainsi été montré qu'au cours des phases exponentielles tardives et plateau de la croissance des cellules cancéreuses hépatiques HepG2 et coliques H630, les taux de transcrits de TS, et de rTS α et rTS β diminuent et augmentent respectivement en fonction du temps (Dolnick et al., 1997; Chu and Dolnick, 2002). L'ARN anti-sens rTS α , essentiellement nucléaire (Faghihi and Wahlestedt, 2006), diminue l'expression de la TS en se fixant et en induisant le clivage de l'ARNm *TYMS* au niveau d'un site d'édition (Dolnick, 1993) (Figure 23). L'ARN anti-sens rTS β , qui présente un exon supplémentaire de 116 nt, n'est quant à lui pas complémentaire de l'ARNm *TYMS* (Dolnick and Black, 1996). *In vitro*, la protéine nucléocytoplasmique rTS β catalyse le transfert du carbone carboxyle de la **Met (Méthionine)** à partir du donneur **SAM (S-Adénosyl-L-Méthionine)** sur une molécule accepteur lipophile. Ainsi, Dolnick et collaborateurs (2003) suggèrent que rTS β , produit majeur du gène *rTS*, diminue le taux de TS par production de métabolites méthionine lipophiles diffusibles (Dolnick et al., 2003). Ces métabolites seraient similaires à des **Acyl Homosérine Lactones (AHL)**, des molécules largement utilisées par les microorganismes pour réguler l'expression génique. Ces AHL diminuent le taux de TS possiblement en affectant sa capacité à lier son propre ARNm et à autoréguler sa traduction (Dolnick et al., 2005) (Figure 22). Récemment, sur la base de l'homologie de séquence de rTS β avec les membres du sous-groupe des **MR (Mandelate Racemase)** de la famille ENOSF, Wichelecki et collaborateurs (2014) suggèrent que rTS β serait dépourvue d'activité enzymatique mais serait capable de s'associer physiquement et de modifier l'activité de rTS α , TS ou DHFR (Wichelecki et al., 2014). Enfin, l'isoforme rTS γ diffère de rTS β par la présence de 27 acides aminés N-ter additionnels qui contiendraient une séquence d'adressage à la mitochondrie **MTS (Mitochondrial Targeting Sequence)** (Liang et al., 2005). Plus tard, Wichelecki et collaborateurs (2014) montrent que cette séquence serait également nécessaire pour conserver la stabilité de la protéine et lui conférer une activité catalytique L-fuconate déshydratase. Cette dernière intervient dans le métabolisme du L-fucose exprimé à la surface cellulaire (Wichelecki et al., 2014).

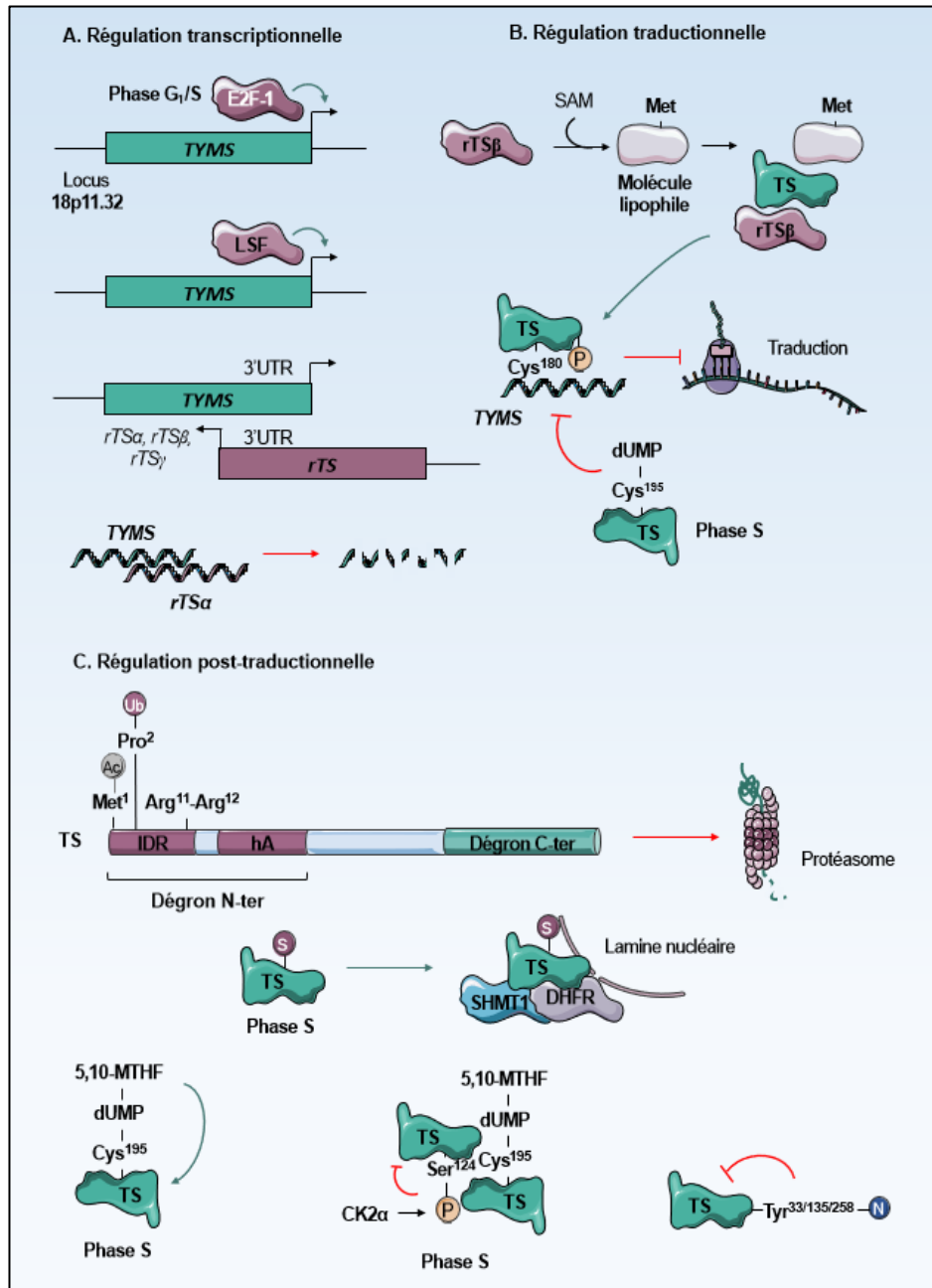


Figure 22 : Mécanismes de régulation transcriptionnelle, traductionnelle et post-traductionnelle de la TS. Le taux d'ARNm *TYMS* est régulé positivement par les facteurs de transcription E2F-1 et LSF et négativement par l'ARN anti-sens *rTSα*. L'activité auto-régulatrice négative de la TS sur son propre ARNm est augmentée par *rTSβ* et diminuée par liaison de la TS avec son substrat dUMP au cours de la phase S. La stabilité, la localisation nucléaire et l'activité de la TS sont régulées par liaison de ses substrats et par acétylation, ubiquitination, SUMOylation, Tyr-nitration et phosphorylation par CK2α.

3'-UTR : 3' Untranslated Transcribed Region ; **5,10-MTHF** : 5,10-MéthylèneTrétraHydroFolate ; **Ac** : Acétylé ; **Arg** : Arginine ; **ARN** : Acide RiboNucléique ; **ARNm** : ARN messenger ; **CDK** : Cyclin-Dependent Kinase ; **CK2α** : Casein Kinase 2α ; **C-ter** : Carboxy-terminal ; **Cys** : Cystéine ; **DHFR** : DiHydroFolate Réductase ; **dUMP** : désoxyUridine MonoPhosphate ; **G₁** : Gap 1 phase ; **G** : N-acétylGlucosamine ; **hA** : hélice α Amphipathique ; **IDR** : Intrinsically Disordered Region ; **LSF** : Late Simian virus 40 Factor ; **Met** : Méthionine ; **N** : Nitro ; **N-ter** : amino-terminal ; **P** : Phosphate ; **Pro** : Proline ; **rTS** : protéine régulatrice de la TS ; **S** : SUMO ; **SUMO** : Small Ubiquitin-related MOdifier ; **S** : Synthesis phase ; **SAM** : S-Adénosyl-L-Méthionine ; **SHMT1** : Sérine HydroxyMéthylTransférase 1 ; **TS** : Thymidylate Synthase ; **TYMS** : *ThYMIdylate Synthase* ; **Tyr** : Tyrosine ; **Ub** : Ubiquitine .

2.1.2. Régulation traductionnelle

L'ARNm *TYMS* a été un des premiers découverts pour être auto-régulé au niveau traductionnel (N. Tai et al., 2004). Au cours de la phase G₁, il n'y a pas de traduction de la TS. En absence de ses substrats, le dUMP et le 5,10-MTHF, la TS peut se lier à deux séquences agissant en *cis* sur son ARNm afin de réprimer sa traduction (Welsh et al., 2000; N. Tai et al., 2004). La première séquence de 30 pb est localisée dans la structure tige-boucle du site d'initiation de la traduction (AUG). La seconde séquence de 70 pb (nucléotides 480 à 550) est suffisante pour conférer un signal traductionnel indépendant du premier élément (Lin et al., 2000). En plus de se lier à son propre ARNm, la TS est également capable de lier et de bloquer la traduction des ARNm de *MYC* (Chu et al., 1995) et *TP53* (Chu et al., 1999). L'activité de liaison à l'ARN de la TS est respectivement augmentée et diminuée en présence d'agents réducteurs et oxydants ce qui suggère que cette activité est régulée par l'ajout réversible d'un groupement sulfhydryle sur au moins une des Cys de l'enzyme (Chu et al., 1994). Des études de mutagenèse dirigée ont permis, en effet, de mettre en évidence le rôle essentiel de la Cys¹⁸⁰ dans la régulation de la traduction de la TS (Lin et al., 2003). Les auteurs suggèrent que le groupement sulfhydryle pourrait former un adduit direct avec le carbone C₆ du cycle uracile, que l'occupation du résidu Cys¹⁸⁰ pourrait empêcher la liaison de l'ARNm par encombrement stérique ou encore que la Cys¹⁸⁰ serait essentielle à la mise en conformation tridimensionnelle de la TS et à l'accessibilité du domaine de liaison à l'ARNm.

Lors de l'entrée en phase S et après liaison de ses substrats, la TS subit un changement conformationnel d'un état inactif (où le résidu catalytique Cys¹⁹⁵ est éloigné du dUMP (Phan et al., 2001; Cardinale et al., 2011)) à un état actif (où le groupement thiol (R-SH) de la Cys¹⁹⁵ est dirigé vers le cycle pyrimidine du dUMP (Almog et al., 2001)) l'empêchant de se lier à son ARNm (Welsh et al., 2000). Des effecteurs allostériques liés au cycle cellulaire et à la synthèse des nucléotides seraient capables de se lier à l'interface des deux sous-unités homodimériques de la TS afin de réguler son état d'activation (Chen et al., 2017) (Figure 22).

2.1.3. Régulation post-traductionnelle

2.1.3.1. Localisation subcellulaire

Des données immunohistologiques révèlent que la TS possède une localisation majoritairement nucléocytoplasmique dans la muqueuse et le stroma colorectaux mais également dans les tissus cancéreux (Bissoon-Haqqani et al., 2006). La translocation nucléaire de la TS au cours de la phase S (Anderson et al., 2012) n'est pas dépendante d'une séquence NLS (Nuclear Localization Signal) mais de sa SUMOylation.

2.1.3.2. Conformation tridimensionnelle

Plusieurs études révèlent que l'induction de l'expression de la TS après liaison de l'enzyme à ses substrats ne serait pas seulement due à des changements dans les mécanismes de transcription et de traduction mais également à des changements conformationnels de l'enzyme (Kitchens, Forsthoefel, Barbour, et al., 1999). En effet, la forme complexée de l'enzyme serait plus stable que la forme libre. Au

cours de la formation du complexe ternaire catalytique et après liaison du 5,10-MTHF, la TS subit un changement de conformation dans lequel ses résidus C-ter se referment sur la cavité du site actif permettant l'orientation correcte des substrats pour l'amorce de la réaction enzymatique. Cette conformation est alors stabilisée par un réseau de liaisons hydrogènes impliquant le résidu Val³¹³ de la TS (Perry et al., 1993) et diminue la sensibilité *in vitro* de la TS aux enzymes protéolytiques (Abdel Mohsen et al., 1995). Ces résultats suggèrent que l'augmentation du taux de TS au cours de la phase S pourrait être également liée à une diminution de son turnover (Forsthoefel et al., 2004) (Figure 22).

2.1.3.3. Dégradation protéasomale

La dégradation de la TS est effectuée par le protéasome 26S mais ne nécessiterait pas le signal d'ubiquitination. En effet, l'altération génétique de la voie de conjugaison de l'ubiquitine (Forsthoefel et al., 2004) et la substitution de l'ensemble des résidus Lys de la TS (Peña et al., 2006) n'ont pas d'effet sur sa stabilité. De manière similaire à celle de l'ODC (Ornithine DéCarboxylase), elle serait contrôlée par la conformation d'une région flexible désordonnée qui régulerait la capacité de l'enzyme à reconnaître et/ou entrer dans la chambre protéasomale. L'équipe de Berger et collaborateurs a défini les 45 premiers acides aminés de la région N-ter comme la séquence dégron qui serait le déterminant primaire de la stabilité de l'enzyme (Peña et al., 2006; Peña et al., 2009). Celle-ci est constituée de deux sous-domaines : une région intrinsèquement désordonnée **IDR** (Intrinsically Disordered Region) couvrant les résidus ¹Met-Pro²⁷ et une hélice α **Amphipathique (hA)** couvrant les résidus ³¹Leu-Arg⁴² (Melo et al., 2011). Entre les espèces de mammifères, la région IDR est hypervariable contrairement au segment hA qui, lui, est conservé (Peña et al., 2009). De manière intéressante, la fonction du dégron exige la présence des deux sous-domaines mais pas leur juxtaposition (Barbour et al., 2013). La dégradation nécessiterait la présence dans l'IDR d'un groupement amino (NH) libre et non modifié sur la Pro² conservée (Peña et al., 2006) ainsi que la conformation hélicoïdale du sous-domaine hA. Il est suggéré que la région hA qui comprend les résidus clés His³⁹ et Arg⁴² (Melo et al., 2011) permettrait la reconnaissance d'une ou plusieurs sous-unités du protéasome alors que la région IDR présentant le motif Arg¹¹-Arg¹² (Melo et al., 2010) permettrait l'entrée dans la chambre protéasomale puis la protéolyse. Il existe également une séquence dégron « cryptique » au niveau des résidus ²⁷⁶Phe-Val³¹³ du domaine C-ter ; celle-ci serait active uniquement en présence de grandes délétions ou certaines substitutions dans la TS. Elle pourrait avoir un rôle dans la régulation de la dégradation de l'enzyme lorsque le dégron N-ter est bloqué ou inactivé (Barbour et al., 2013) (Figure 22).

2.1.3.4. Modification Co- et Post-Traductionnelles (MCT et MPT)

Plusieurs **MCT** (Modification Co-Traductionnelle) telle que la **N^α-acétylation** (acétylation de l' α -amine en N-ter) et **MPT** (Modification Post-Traductionnelles) telles que l'ubiquitination, la SUMOylation, la phosphorylation, la Tyr-nitration et la Glu-méthylation ont été identifiées sur la TS (Figure 23). Ces modifications régulent les interactions, l'activité enzymatique, la stabilité ou encore la localisation subcellulaire de la TS.

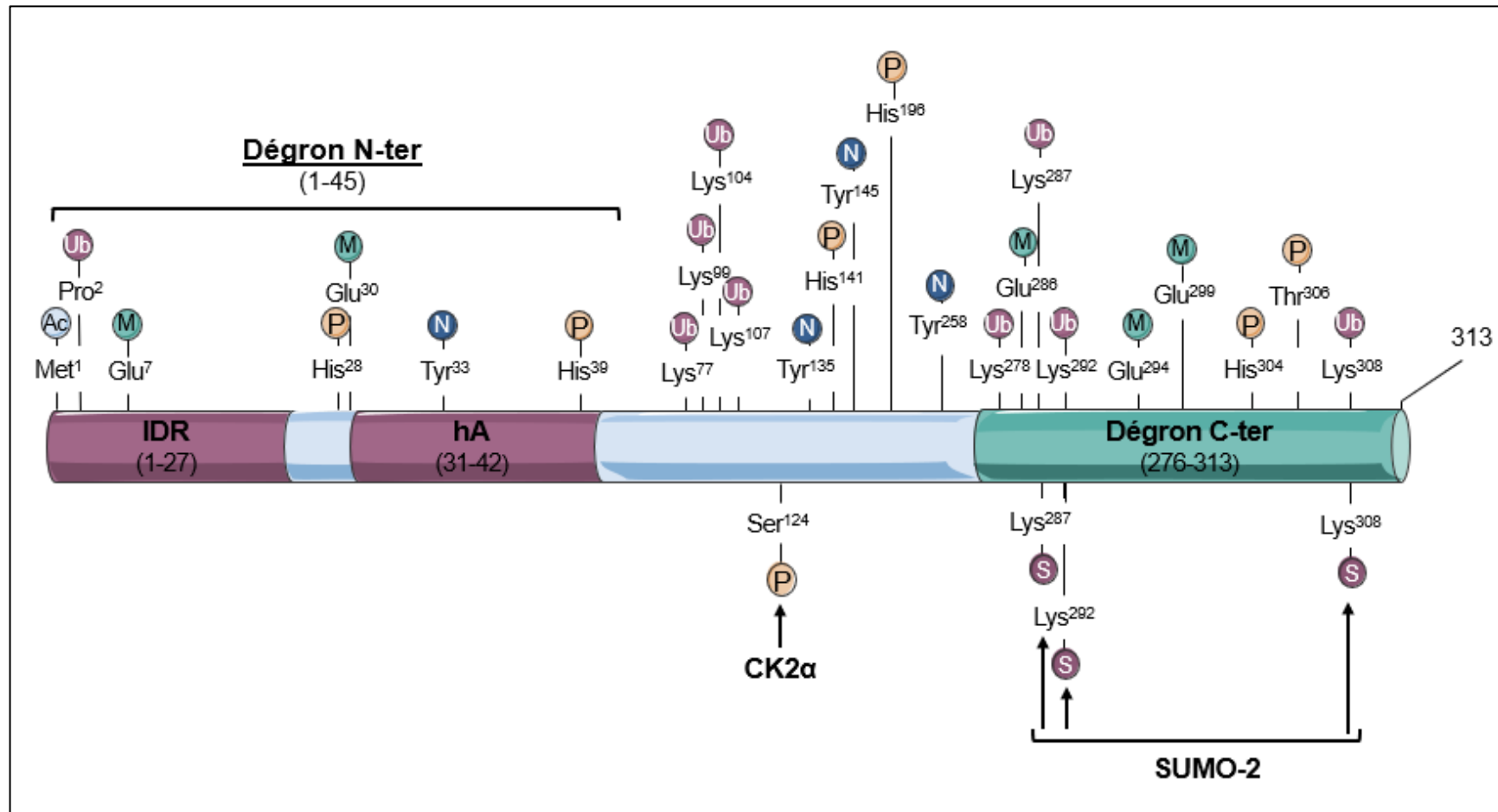


Figure 23 : Modifications co- et post-traductionnelles de la TS. La TS est la cible d'acétylation, d'ubiquitination, de phosphorylation, de Glu-méthylation, de Tyr-nitration et de SUMOylation.

Ac : Acétyle ; **CK2α** : Casein Kinase 2α ; **C-ter** : Carboxy-terminal ; **Glu** : Glutamate ; **hA** : hélice α Amphipathique ; **His** : Histidine ; **IDR** : Intrinsically Disordered Region ; **Lys** : Lysine ; **M** : Méthyle ; **Met** : Méthionine ; **N** : Nitro ; **N-ter** : amino-terminal ; **P** : Phosphate ; **Pro** : Proline ; **S** : SUMO ; **Ser** : Sérine ; **SUMO-2** : Small Ubiquitin-related MOdifier 2 ; **TS** : Thymidylate Synthase ; **Tyr** : Tyrosine ; **Ub** : Ubiquitine.

Acétylation de l'α-amine de l'extrémité amino-terminale (N^α-acétylation)

La N^α-acétylation est une MCT qui apparaît sur plus de 80% des protéines cytosoliques de mammifères. Cette modification est catalysée par des **NAT (N-α-AcetylTransférases)** qui transfèrent le groupement acétyl (COCH₃) de l'**acétyl-CoA (acétyl-Coenzyme A)** sur le groupement α-amine N-ter (NH₂) de la protéine cible. Aucune **NDAC (N-ter DeACétylase)** n'a été découverte et il est considéré que la N^α-acétylation serait une modification irréversible (Ree et al., 2018). Chez les mammifères, la N^α-acétylation se réalise lorsque les 25-50 premiers résidus d'acides aminés de la protéine cible sont sortis du ribosome. Les résidus Met, Ser, Ala, **Gly (Glycine)** et Thr sont les acides aminés préférentiellement ciblés. Les déterminants de la séquence cible de cette modification ne sont pas bien définis mais il semble que le résidu N-ter en position 2 soit important. Ainsi, les résidus Asp ou Glu favorisent la N^α-acétylation alors que la Pro, la **Lys (Lysine)** et l'Arg l'inhibent dans la plupart des cas (Polevoda and Sherman, 2003).

Des approches protéomiques par électrophorèse bidimensionnelle montrent que les molécules TS instables ont des extrémités N-ter libres non-acétylées alors que les molécules stables présentent une N^α-acétylation. Les auteurs suggèrent qu'il est nécessaire que l'extrémité N-ter soit libre pour l'entrée de la TS dans la chambre protéasomale. Récemment, Frączyk et collaborateurs (2015) ont localisé par nano-chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem **NanoLC-MS/MS (Nano-Liquid Chromatography tandem-Mass Spectrometry)** la N^α-acétylation sur l'initiateur de la traduction Met¹ de la TS dans les cellules leucémiques murines L1210 (Frączyk et al., 2015). La caractérisation de différents mutants a révélé que la Pro² protège l'extrémité N-ter de la N^α-acétylation après le clivage post-traductionnel de Met¹. Néanmoins, la présence d'une extrémité N-ter libre non-acétylée n'est pas suffisante pour induire la dégradation de l'enzyme suggérant que d'autres caractéristiques structurales sont nécessaires (Peña et al., 2009) (**Figures 22 et 23**).

Ubiquitination

La voie de dégradation des protéines dite « ubiquitine-dépendante » permet le catabolisme des protéines ayant subi un marquage spécifique par une petite protéine de 76 acides aminés, l'**Ub (Ubiquitine)**. L'ubiquitination est une MPT liant la Gly en position C-ter de l'Ub est généralement au groupement ε-amine d'une Lys de la protéine cible liée par une liaison covalente isopeptidique. La réaction d'ubiquitination est réversible et nécessite plusieurs étapes impliquant des enzymes E1 d'activation, des enzymes E2 de conjugaison, des ligases E3 et des **DUB (DésUBiquitinases)**. Il n'existe pas de séquence consensus stricte pour l'ubiquitination mais les sites modifiés semblent être localisés dans des régions intrinsèquement désordonnées ou non structurées de la protéine cible (Radivojac et al., 2010). Les protéines peuvent être mono-, multi- ou poly-ubiquitinylées et la poly-ubiquitination constitue un signal classique de dégradation par le protéasome 26S (Ravid and Hochstrasser, 2008).

Très récemment, la stratégie d'enrichissement et d'identification des sites ubiquitinylés du protéome des cellules HepG2 et Jurkat ont permis d'identifier sur la TS plusieurs sites d'ubiquitination sur les Lys⁷⁷, Lys⁹⁹, Lys¹⁰⁴, Lys¹⁰⁷, Lys²⁷⁸, Lys²⁸⁷, Lys²⁹² et Lys³⁰⁸ ainsi qu'un site d'ubiquitination N-ter sur la Pro² (Akimov et al., 2018). Le rôle de ces MPT n'a, par ailleurs, pas été étudié. Néanmoins, la dégradation protéasomale de la TS ne serait pas induite par le signal d'ubiquitination sur des Lys (Forsthoefel et al., 2004) (Figures 22 et 23).

SUMOylation

La SUMOylation est une MPT qui consiste en l'ajout covalent d'une ou plusieurs protéines **SUMO** (**S**mall **U**biquitin-related **M**odifier) sur la protéine cible au niveau d'un résidu Lys localisé, généralement, au niveau d'une séquence consensus de type Ψ -Lys-X-Glu où Ψ est un acide aminé hydrophobe. Il y a formation d'une liaison isopeptidique entre la Gly C-ter de SUMO et le groupement ϵ -amine de la Lys cible. Comme l'ubiquitination, la SUMOylation résulte d'une cascade de réactions enzymatiques initiées par **SUMO-E1** (enzyme **E1** d'activation de **SUMO**) puis relayées par SUMO-E2 et SUMO-E3. La désSUMOylation est quant à elle assurée par les **SENP** (**SEN**trin specific **P**roteases).

Woeller et collaborateurs (2007) ont montré que SHMT1 possède une séquence consensus de SUMOylation à l'extrémité N-ter et que sa translocation nucléaire au cours de la phase S est dépendante de sa SUMOylation et de sa liaison à la petite protéine G **Ran-GDP** (**R**as-related nuclear protein-**G**uanosine **D**iPhosphate) (Woeller et al., 2007). L'importine 13 a été démontrée pour être impliquée dans le transport nucléaire régulé par Ran de la SUMO-E2 **Ubc9** (**U**biquitin-conjugating enzyme E2I) et probablement d'autres protéines SUMOylées (Mingot et al., 2001). Notamment, PCNA est SUMOylée par Ubc9 au cours de la phase S afin de promouvoir la synthèse de l'ADN (Hoegel et al., 2002). *In vitro*, SHMT1 est SUMOylée en présence de SUMO-1, de l'enzyme SUMO-E1 constituée des sous-unités hétérodimériques **Aos1** (**A**ctivation of **s**mt3p **1**) et **Uba2** (**U**biquitin activating enzyme **2**), de Ubc9 et de la SUMO-E3 **RanBP2** (**R**an-**B**inding **P**rotein **2**) qui est physiologiquement associée au pore nucléaire (Woeller et al., 2007). Il s'avère que la TS et la DHFR sont SUMOylées, *in vitro*, par SUMO-1 en présence de Aos1/Uba2 et de Ubc9 (Anderson et al., 2007). Une stratégie de cartographie globale des sites SUMOylés des protéines endogènes des cellules HeLa menée par Hendriks et collaborateurs (2014) a permis d'identifier les résidus Lys²⁸⁷, Lys²⁹² et Lys³⁰⁸ de la TS comme cibles de la SUMOylation par SUMO-2 (Hendriks et al., 2014) (Figure 26). Ainsi, la SUMOylation de TS, SHMT1 et DHFR permettrait leur translocation nucléaire au cours de la phase S afin de synthétiser efficacement du dTMP (Figures 22 et 23).

Phosphorylation

La phosphorylation est une MPT majoritaire puisqu'elle concernerait 75% des protéines humaines (Sharma et al., 2014). Elle consiste en l'ajout covalent du groupement phosphate en position γ de l'ATP par formation d'une liaison phosphoester avec le groupement hydroxyle d'un acide aminé Ser, Thr ou Tyr de la protéine cible. La phosphorylation d'autres acides aminés tels que l'His ou l'Asp, historiquement considérée comme un signal de régulation de la réponse chimiotactique procaryote, a également été retrouvée récemment dans des cellules cancéreuses de prostate PHEC (Lapek et al., 2015). La phosphorylation est une réaction enzymatique rapide et réversible catalysée par des kinases alors que les phosphatases hydrolysent la liaison phosphoester. La spécificité de substrat des kinases dépend de séquences peptidiques consensus spécifiques mais également de certains résidus voisins de ces séquences (Miller and Turk, 2016).

La phosphorylation de la TS a été initialement observée dans les cellules d'hépatome de rat H35 (Samsonoff et al., 1997) puis dans des cellules leucémiques murines L1210 (Cieśła et al., 2006). Plus tard, l'analyse par NanoLC-MS/MS a permis d'identifier la présence de phosphorylation sur les résidus His²⁸, His³⁹, Ser¹²⁴ et Thr³⁰⁶ chez l'Homme et sur les résidus His³³ (His³⁹ chez l'Homme), His¹³⁵, His¹⁹⁰, His²⁹⁸, Ser¹⁰, Ser¹⁶, Ser¹¹⁸ (Ser¹²⁴), Thr⁴⁵, Thr³⁰⁰ (Thr³⁰⁶) chez la souris (Frączyk et al., 2015) (**Figure 23**). Contrairement à la O-phosphorylation sur la Ser, la Thr ou la Tyr, la N-phosphorylation de l'His est labile en condition acide et peut être transférée sur un acide aminé environnant de manière intra- ou intermoléculaire. De plus, le changement de l'état d'ionisation positif vers négatif de l'His par la phosphorylation pourrait réguler l'interaction de la TS avec des protéines ou des acides nucléiques (Adam and Hunter, 2018). Frączyk et collaborateurs (2015) ont démontré que seule l'isoforme phosphorylée de la TS, qui est retrouvée de manière minoritaire (environ 1% des formes totales), est capable de lier et d'inhiber la traduction *in vitro* de son propre ARNm ainsi que d'autres ARNm hétérologues (codant la DHFR, la DCD (dCMP Désaminase), la SHMT ou encore la TK). Les auteurs suggèrent ainsi que la phosphorylation pourrait augmenter les interactions protéine-ARN ou les interactions protéine-protéine entre, par exemple, la TS et le ribosome (Frączyk et al., 2015).

Comme dit précédemment, une seule des deux sous-unités enzymatiques de la TS lie ses substrats, or, une seule des deux sous-unités est phosphorylée suggérant un lien entre ces deux événements (Frączyk et al., 2015). *In vitro*, CK2 α catalyse la phosphorylation de la TS humaine sur des résidus Ser, notamment la Ser¹²⁴, entraînant une diminution de son activité catalytique (Frączyk et al., 2010). Cette phosphorylation diminuerait la capacité de l'enzyme à se lier à ses deux ligands, le dUMP et le THF, par répulsion électrostatique entre le phosphate du dUMP et celui de la Ser¹²⁴ (Jarmuła et al., 2010). La phosphorylation de la Ser¹²⁴ pourrait ainsi être responsable de l'asymétrie des sous-unités de la TS dans leur capacité à lier les substrats (**Figure 22**).

Glutamate-méthylation (Glu-méthylation)

La Glu-méthylation est une MPT réversible qui consiste au transfert d'un groupement Me à partir de la SAM sur un atome O de l'acide aminé Glu cible. Elle est catalysée par des méthyltransférases dépendantes de la SAM et des déméthylases. Elle est largement retrouvée chez les bactéries. En effet, la Glu-méthylation de protéines transmembranaires senseurs bactériens (appelées **MCP**, **Methyl-accepting Chemotaxis Protein**) est impliquée dans la régulation du phénomène de chimiotaxie. Cette modification est catalysée par la méthyltransférase CheR qui reconnaît la séquence Ser/Ala-Ser/Ala-X-X-Phe/**Gln** (**Glutamine**)-Phe/Gln/X-Ala-Ala de la MCP cible et réversée par la méthylestérase CheB (Janardhan et al., 2018). Jusqu'à récemment, la Glu-méthylation eucaryote avait été identifiée sur la **GAPDH** (**GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase**) de cellules HeLa humaines et de levure *Saccharomyces cerevisiae* (Sprung et al., 2008).

L'analyse par NanoLC-MS/MS de la TS endogène de cellules leucémiques murines L1210 a permis d'identifier les résidus Glu⁷, Glu¹⁸, Glu²⁴, Glu⁹⁴, Glu¹³⁹, Glu²⁸⁰, Glu²⁸⁸ et Glu²⁹³ comme cibles de la méthylation (Frączyk et al., 2015) (**Figure 22**). La présence de Glu-méthylation sur des protéines eucaryotes pourrait modifier la structure, les interactions et les fonctions de la protéine cible (Sprung et al., 2008). De plus, les résidus Glu sont présents dans de nombreux motifs de reconnaissance de MPT telles que la SUMOylation ou la phosphorylation, la Glu-méthylation pourrait donc affecter les mécanismes de régulation liés à ces deux MPT.

Tyrosine-nitration (Tyr-nitration)

La Tyr-nitration est une MPT qui correspond à l'ajout covalent d'un groupement nitro (R-NO₂⁺) sur un résidu Tyr de la protéine cible pour former une **3-NT** (**3-NitroTyrosine**). Le groupement nitro provient généralement du dioxyde d'azote (NO₂), un agent oxydant provenant de la réaction entre l'oxyde nitrique (**NO**, **Nitric Oxide**) et l'O₂ ou de la décomposition du peroxy-nitrite (ONOO⁻). Il semblerait que les structures secondaires et tertiaires de la protéine cible ainsi que l'accessibilité des solvants soient les facteurs les plus importants pour la sélectivité de la Tyr-nitration (Bayden et al., 2011).

La Tyr-nitration de la TS a été initialement découverte chez *Lactobacillus casei* en présence de **TNM** (**TétraNitroMéthane**), elle est responsable de l'inactivation de l'enzyme (Rosson et al., 1980). Plus récemment, la Tyr-nitration de la TS a également été retrouvée dans des cellules et tissus animaux (Dąbrowska-Maś et al., 2012). La Tyr-nitration *in vitro* de la TS en présence de peroxy-nitrite a confirmé que cette modification n'affecte pas la liaison de l'enzyme à ses substrats mais diminue son activité enzymatique (Dąbrowska-Maś et al., 2012). Notamment, Dąbrowska-Maś et collaborateurs (2012) montrent que la diminution de l'activité de la TS humaine provoquée par la Tyr-nitration des résidus Tyr³³, Tyr¹³⁵ et Tyr²⁵⁸ est due à un changement de sa conformation induisant une déviation de l'alignement de liaison entre le dUMP et le 5,10-MTHF dans le site actif (Dąbrowska-Maś et al., 2012) (**Figures 22 et 23**).

2.2. Régulation de la TS dans le CCR et modulation de la réponse au 5-FU

En 2004, Rahman et collaborateurs démontrent que la TS est un oncogène. En effet, la surexpression ectopique de la TS catalytiquement active est suffisante pour transformer les cellules de mammifères avec une augmentation de la formation des foyers, de la croissance indépendante de l'ancrage et de la formation de tumeurs après xénogreffe chez la souris. Les auteurs suggèrent que le phénotype néoplasique observé est dépendant de l'augmentation de la synthèse d'ADN initiée par l'activité élevée de la TS (Rahman et al., 2004). Il est également observé une augmentation de l'expression et de l'activité de la TS dans les cellules proliférant rapidement par rapport aux cellules quiescentes (Derenzini et al., 2002; Le François et al., 2007).

Des études cliniques montrent que les niveaux d'ARNm, de protéines et d'activité catalytique TS sont augmentés dans les tissus cancéreux colorectaux par rapport aux tissus sains adjacents (Li et al., 2001; Xi et al., 2008; Ishikawa et al., 2008; Kristensen et al., 2010). De plus, l'expression de la TS serait associée à la progression tumorale avec un niveau plus élevé dans les tumeurs primaires comparées aux tumeurs métastatiques (Aschele et al., 2000; Xi et al., 2008). D'autre part, les niveaux d'ARNm et de protéines TS sont négativement associés à la réponse *in vitro* de cellules cancéreuses coliques au 5-FU et *in vivo* du CCR à la chimiothérapie à base de 5-FU/LV (Johnston et al., 1995; Peters et al., 2002; W. Wang et al., 2007). Une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de la TS peut donc participer à la tumorigenèse du CCR mais également à sa résistance à la chimiothérapie. En effet, des doses plus élevées de 5-FU seraient nécessaires pour éradiquer les cellules surexprimant la TS, sa cible principale (W. Wang et al., 2007) (cf. 2.3.2 page 56).

2.2.1. Régulation génique et polymorphismes

L'expression de la TS peut être modifiée par des variations génétiques sur le gène *TYMS*. A ce jour, trois polymorphismes importants dans le CCR ont été distingués (Figure 24).

Polymorphisme du nombre variable de répétitions en tandem de 28 paires de bases (pb) (rs34743033)

Au niveau de la région promotrice **TSER (TS Enhancer Region)** dans la région 5'-UTR, des Répétitions « R » variables de 2 à 9 copies d'un tandem hautement polymorphique d'une séquence de 28 pb (paires de bases) (2R à 9R) ont été décrits (Horie et al., 1995). A l'échelle mondiale, les répétitions 2R et 3R sont les plus fréquentes (46% de répétitions 2R et 54% de répétitions 3R dans la population caucasienne) et les répétitions 4R et 9R sont presque exclusivement observées dans les populations d'origine africaine (Marsh et al., 2000).

In vitro, la répétition 3R engendre une activité transcriptionnelle significativement plus élevée comparée à la répétition 2R. En effet, l'activité du gène rapporteur lié au fragment 5' terminal du gène *TYMS* était 2,6 fois plus élevée en présence de la répétition 3R que de la répétition 2R (Horie et al., 1995). Kawakami et collaborateurs (2001) ont également montré que la répétition 3R augmente plus de trois fois l'efficacité traductionnelle par rapport à la répétition 2R (Kawakami et al., 2001).

In vivo, les patients présentant un CCR métastatique avec le variant homozygote 3R/3R ont des niveaux transcriptionnels de *TYMS* significativement plus élevés que les patients avec le variant homozygote 2R/2R (Pullarkat et al., 2001). L'influence du nombre de répétitions sur l'expression de la TS serait due à la présence d'un élément de réponse consensus E-box à la famille **USF** (Upstream Stimulatory Factor) dans les unités de répétitions contenant une guanine en position 12. Plusieurs études révèlent que ce polymorphisme est un biomarqueur prédictif de la réponse à la chimiothérapie à base de 5-FU (Pullarkat et al., 2001; Iacopetta et al., 2001) avec un plus fort taux de réponse et une survie plus longue pour les patients homozygotes 2R/2R que les patients homozygotes 3R/3R (Figures 24 et 25). En revanche, Lecomte et collaborateurs (2004) n'ont trouvé aucune corrélation entre ce polymorphisme et la réponse des patients CCR au traitement par 5-FU seul ou associé à l'OX ou à l'IRI (Lecomte et al., 2004).

Enfin, en plus de son caractère prédictif de réponse, ce polymorphisme est également associé à la toxicité du traitement avec les génotypes 3R/3R. Ces derniers présentent moins de toxicités sévères que les autres génotypes possiblement du fait d'un niveau d'expression plus élevé de la TS et d'une inhibition moins efficace par le 5-FU (Pullarkat et al., 2001; Lecomte et al., 2004).

Polymorphisme de substitution Guanine en Cytosine (G>C) (rs2853542)

Au niveau du 12^{ème} nucléotide de la seconde répétition de l'allèle 3R, existe un polymorphisme de substitution G>C (correspondant aux allèles 3RG et 3RC respectivement).

In vitro, la séquence 3RG a une efficacité 2 fois supérieure de transcription (Mandola et al., 2003) et 3,5 fois supérieure de traduction (Kawakami and Watanabe, 2003) que la séquence 3RC. La substitution G>C induirait la perte d'un site de fixation pour le facteur de transcription USF-1 et abolirait l'effet « *enhancer* » de l'allèle 3R sur la traduction (Mandola et al., 2003). *In vivo*, l'allèle 3RG est associé à un niveau plus élevé d'expression du gène *TYMS* par rapport à l'allèle 3RC (Morganti et al., 2005) (Figures 24 et 25).

Cette mutation est présente dans 56% des allèles 3R de la population caucasienne (Mandola et al., 2003) et pourrait expliquer, en partie, les résultats contradictoires observés sur la corrélation entre le polymorphisme de répétitions 2R/3R et la réponse tumorale au 5-FU. La distinction des polymorphismes 2R/3R et G>C permet de redéfinir la distribution des patients répondeurs ou non au 5-FU selon le génotype et l'expression prédictive « basse » ou « haute » du gène *TYMS*. Ainsi, deux études rétrospectives ont montré une corrélation significative entre expression prédictive « faible » et augmentation de la survie globale des patients avec un CCR traité par 5-FU (Kawakami and Watanabe, 2003; Marcuello et al., 2004) (Figures 24 et 25).

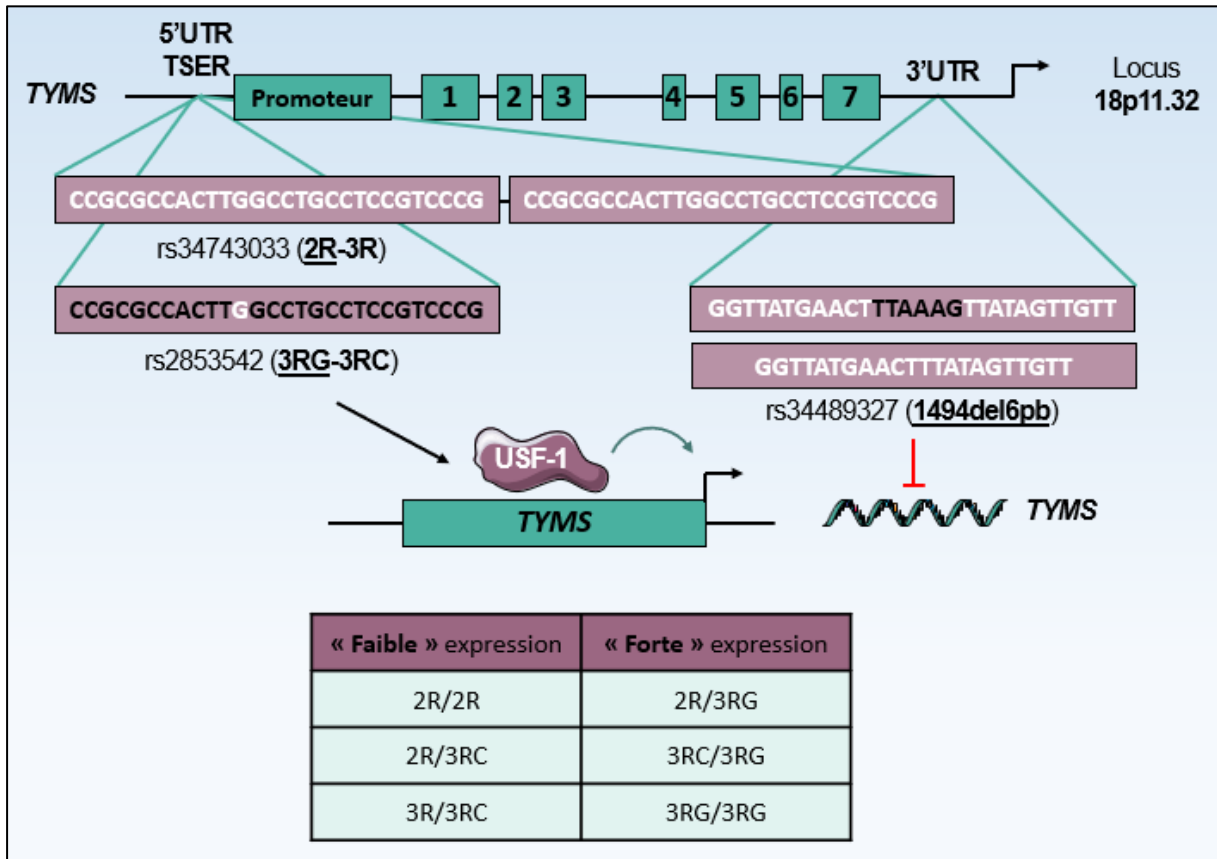


Figure 24 : Polymorphismes du gène *ThYMidylate Synthase (TYMS)* dans le CCR. L'expression de *TYMS* est augmentée par la présence des SNP 3R et 3RG dans le 5'-UTR du gène qui créent un élément de réponse pour le facteur de transcription USF-1. En revanche, elle est diminuée par la présence du SNP 1494del6pb dans le 3'-UTR qui déstabilise l'ARNm *TYMS*.

A : Adénine ; **ARNm** : Acide RiboNucléique messenger ; **C** : Cytosine ; **CCR** : Cancer ColoRectal ; **del** : délétion ; **G** : Guanine ; **pb** : paire de bases ; **R** : Répétition ; **SNP** : Single-Nucleotide Polymorphism ; **T** : Thymine ; **TSER** : Thymidylate Synthase Enhancer Region ; **TYMS** : *ThYMidylate Synthase* ; **USF-1** : Upstream Stimulatory Factor 1 ; **UTR** : Untranslated Transcribed Region.

Polymorphisme d'insertion-délétion de 6 pb au niveau du nucléotide 1494 (rs34489327)

Une insertion-délétion de 6 pb (TTAAAG) au niveau du nucléotide 1494 dans le 3'-UTR affecte la stabilité de l'ARNm *TYMS*.

En effet, la délétion de 6 pb est associée à une diminution de la stabilité du transcrit *in vitro* (Mandola et al., 2004). *In vivo*, la délétion de 6 pb présente chez 29% des caucasiens (Ulrich et al., 2000) est associée à une diminution de l'expression intratumorale de la TS et à une augmentation du taux de réponse et de la survie des patients CCR traités au 5-FU (Mandola et al., 2004; Hitre et al., 2005; Stoehlmacher et al., 2008) (Figures 24 et 25).

2.2.2. Régulation transcriptionnelle

Une dérégulation des facteurs de transcription activateurs E2F-1 et LSF ainsi que des rTS inhibitrices de la TS peut induire une augmentation de l'expression de la TS et une résistance au 5-FU (Figure 25).

In vitro, E2F-1 joue un rôle important dans l'acquisition de la résistance au 5-FU. D'une part, les cellules cancéreuses coliques DLD-1 résistantes au 5-FU présentent un niveau de phosphorylation sur pRB et une activité transcriptionnelle de E2F-1 plus importants que dans les cellules parentales sensibles ; l'utilisation d'oligodésoxynucléotides dirigés contre *E2F1* augmente la sensibilité de ces cellules à la drogue (Obama et al., 2002). D'autre part, la surexpression de *E2F1* dans les cellules de fibrosarcome HT-1080 induit une augmentation de l'expression et de l'activité de la TS, et diminue la sensibilité de ces cellules au 5-FU (Banerjee et al., 1998). *In vivo*, les expressions intratumorales des gènes *TYMS* et *E2F1* sont étroitement corrélées chez les patients CCR (Banerjee et al., 2000; Kasahara et al., 2000). Le niveau de E2F-1 pourrait être prédictif du niveau de TS et de la réponse au 5-FU dans le CCR. En effet, il a été montré récemment par immunohistochimie une corrélation négative entre niveaux de E2F-1 et de TS, et survie des patients avec un CCR traité par chimiothérapie à base de 5-FU (survie à 3 ans de 100% pour les patients E2F-1-/TS- et de 69% pour les patients E2F-1+/TS+) (Sulzyc-Bielicka et al., 2016).

In vitro, dans les cellules humaines de carcinome hépatocellulaire, la surexpression de **AEG-1** (**Astrocyte Elevated Gene-1**) (Yoo et al., 2009) ou de **GRP78** (**Glucose-Regulated Protein 78 kDa**) (Gu et al., 2015) augmente l'expression de la TS par le biais de LSF et induit la résistance de ces cellules au 5-FU. Au contraire, l'inhibition de LSF diminue le niveau de TS et resensibilise ces cellules à la drogue (Yoo et al., 2009; Gu et al., 2015). L'implication de LSF dans la réponse du CCR au 5-FU n'a pas été étudiée *in vivo*.

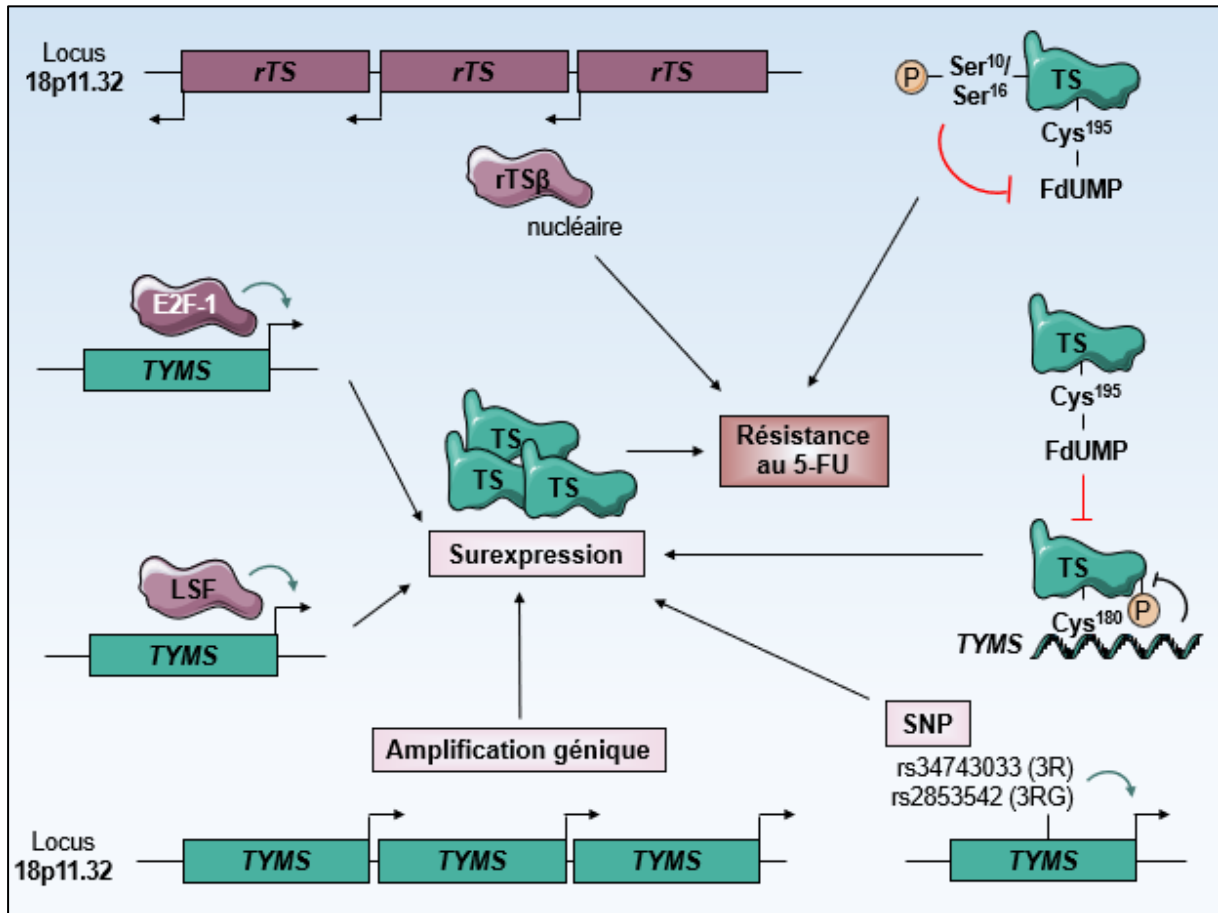


Figure 25 : Résistance au 5-FU induite par la régulation de la TS. La résistance au 5-FU peut avoir pour origine une surexpression de la TS. Celle-ci peut être due à une amplification génique, la présence des SNP 3R et 3RG sur le gène *TYMS*, l'augmentation de sa transcription *via* les facteurs de transcription E2F-1 et LSF, la diminution de l'activité autorégulatrice négative de la TS sur son propre ARNm après liaison du FdUMP. Elle peut également avoir pour origine la surexpression de rTSβ nucléaire ainsi que la phosphorylation de la TS sur les résidus Ser¹⁰ et Ser¹⁶.

5-FU : 5-FluoroUracile ; **ARNm** : Acide RiboNucléique messenger ; **Cys** : Cystéine ; **FdUMP** : FluorodésoxyUridine MonoPhosphate ; **G** : Guanine ; **LSF** : Late Simian virus 40 Factor ; **P** : Phosphate ; **R** : Répétition ; **rTS** : protéine régulatrice de la TS ; **Ser** : Sérine ; **SNP** : Single-Nucleotide Polymorphism ; **TS** : Thymidylate Synthase ; **TYMS** : *ThYM*idylate *Syn*thase.

De manière intéressante, rTS β est plus exprimée dans les cellules cancéreuses que dans les cellules normales *in vitro* et *in vivo* (Kuo et al., 2008). Dolnick et Black (1996) ont montré que les cellules cancéreuses coliques H630 résistantes au 5-FU (H630-1) présentent un niveau plus élevé de protéines rTS β que les cellules parentales sensibles H630. Dans ces cellules résistantes, la surexpression rTS β serait liée à une amplification génique associée à un mécanisme de régulation transcriptionnel ou post-transcriptionnel (Dolnick and Black, 1996). En particulier, il a été montré que la Ser¹²¹ de rTS β est plus phosphorylée dans les cellules sensibles H630 que résistantes H630-1 mais l'effet biologique de cette MPT n'a, par la suite, pas été investigué (Dolnick et al., 2005). La surexpression de rTS β serait un mécanisme de résistance adaptatif à la cytotoxicité du 5-FU (Dolnick and Black, 1996) qui ne ferait pas intervenir la défluorination du 5-FU (Wichelecki et al., 2014). Des études cliniques ont démontré une corrélation négative entre expression de rTS β et taux de survie à 5 ans de patients présentant un cancer du sein (environ 58% et 64,5% respectivement pour les patients rTS β + et rTS β -) ou un CCR (35% et 70% respectivement pour les patients rTS β + et rTS β -) traités par chimiothérapie à base de 5-FU (Kuo et al., 2008; Lin and Chow, 2010). De plus, dans le cancer du sein, la localisation nucléaire de rTS β est également associée à un mauvais pronostic avec une diminution du taux de survie à 5 ans (environ 42% contre 65,5% pour les patients présentant une localisation cytoplasmique de rTS β). Une augmentation de la taille de la tumeur (54% de taille T3 ou plus contre 27%), de l'envahissement des ganglions lymphatiques (86% contre 60%) et de la récurrence tumorale (34% contre 15%) (Kuo et al., 2008) est en effet observée chez ces patients.

Plusieurs études révèlent que le 5-FU est lui-même capable d'induire l'expression de *TYMS* et que la sensibilité à la drogue varie en fonction du degré de cette induction. *In vitro*, le 5-FU induit une augmentation du taux d'ARNm *TYMS* (d'un facteur 30 après 12 heures de traitement) dans les cellules cancéreuses coliques COLO201 et HCC-48 (Nishiyama et al., 1999). Ligabue et collaborateurs (2012) suggèrent ainsi un lien direct entre induction de la TS et perturbation du cycle cellulaire. En effet, dans les cellules cancéreuses ovariennes 2008, la transcription de *TYMS* augmente en réponse au 5-FU après arrêt des cellules en phase S, phase durant laquelle l'ARNm *TYMS* est synthétisé (Ligabue et al., 2012). *In vivo*, Tanaka-Nozaki et collaborateurs (2003) révèlent que le traitement de CCR avec le 5-FU augmente le taux intra-tumoral de transcrits *TYMS* dans 47,5% des cas jusqu'à un facteur 2,4. De plus, l'efficacité du traitement est augmentée chez les patients présentant une absence ou une faible induction des ARNm *TYMS*. Aussi, la survie des patients est augmentée chez les patients ne présentant pas cette induction (Tanaka-Nozaki et al., 2003).

2.2.3. Régulation post-traductionnelle

2.2.3.1. Localisation subcellulaire

Physiologiquement au cours de la phase S du cycle cellulaire, la TS est transloquée au noyau dans un complexe multimérique notamment composé de DHFR et SHMT1 afin de participer à la biosynthèse *de novo* du dTMP (cf. 2.3.1 page 56).

In vitro, l'effet du FdUMP sur la localisation subcellulaire de la TS a été initialement étudié par autoradiographie dans les cellules d'hépatome de rat H35 sensibles et résistantes au FUdR après traitement avec le [6-³H]FUdR radiomarqué (Samsonoff et al., 1997). Le complexe TS/5,10-MTHF/FdUMP est alors localisé majoritairement dans le noyau des cellules sensibles et dans le cytoplasme des cellules résistantes qui surexpriment la TS. Des résultats contradictoires ont été reportés par fractionnement cellulaire sur des cellules HeLa-55 qui surexpriment de manière endogène l'enzyme. Après traitement au FUdR, la forme libre de la TS est observée au niveau nucléo-cytoplasmique et la forme complexée au FdUMP au niveau cytoplasmique uniquement (Bissoon-Haqqani et al., 2006). Les hypothèses suggérées par les auteurs sont que les protéines TS nucléaires et cytoplasmiques n'ont pas les mêmes conformations et capacités à lier le FdUMP, que le FdUMP ne peut pas entrer dans le noyau, ou encore que le complexe ternaire TS/5,10-MTHF/FdUMP cytoplasmique ne peut pas être transloqué au niveau nucléaire. Récemment, l'idée que le FdUMP séquestre la TS dans le cytoplasme a été renforcée par les travaux de Antosiewicz et collaborateurs (2017) montrant, par immunocytochimie, une diminution de la localisation nucléaire de la TS et de son complexe avec la DHFR après traitement des cellules cancéreuses coliques HCT116 au 5-FU (Antosiewicz et al., 2017).

2.2.3.2. Conformation tridimensionnelle et dégradation protéasomale

Après liaison à ses substrats, la TS change de conformation tridimensionnelle et serait ainsi moins sensible à la dégradation (**Figure 23**).

In vitro, en présence d'inhibiteurs de la TS, la stabilité de l'enzyme est également augmentée d'environ 2-4 fois. Ainsi, la demi-vie de la TS passe d'environ 7 heures à 25 heures après traitement de cellules cancéreuses coliques HCT15 avec le FUdR (Kitchens, Forsthoefel, Rafique, et al., 1999).

2.2.3.3. MPT de la TS et sensibilité au 5-FU

La TS est la cible de plusieurs MPT dont la phosphorylation et la Glu-méthylation (**Figure 22**). Néanmoins, les effets biologiques de ces modifications ne sont quasiment pas connus.

Frączyk et collaborateurs (2015) démontrent que la TS est phosphorylée dans les cellules leucémiques murines L1210 sensibles et résistantes au FUdR. En revanche, la phosphorylation des résidus Ser¹⁰ et Ser¹⁶ et la méthylation de la Glu⁹⁴ sont uniquement retrouvées dans les cellules résistantes (Frączyk et al., 2015). De manière intéressante, la phosphorylation de la TS affecte sa sensibilité à l'inactivation par le FdUMP (Cieśla et al., 2006; Ludwiczak et al., 2016). Ainsi la phosphorylation de certains résidus, dont la Ser¹⁰ et Ser¹⁶, pourrait augmenter la résistance des cellules au 5-FU en empêchant l'inactivation de la TS par le FdUMP (**Figures 22 et 23**). L'utilisation récente d'inhibiteurs de CK2, la kinase responsable de la phosphorylation inhibitrice de la Ser¹²⁴ de la TS, a augmenté l'efficacité du 5-FU dans les cellules leucémiques CCRF-CEM (Wińska et al., 2018).

2.2.4. O-N-AcetylGlucosaminylation (O-GlcNAcylation) de la TS

Les équipes de Sprung (2005) puis de Hahne (2013) ont mis en évidence une autre MPT, la O-GlcNAcylation (**O-N-AcetylGlucosaminylation**), sur la TS de cellules de drosophile S2 et humaine HEK293 grâce à la stratégie **TAS (TAgging-via-Substrate)** (Sprung et al., 2005; Hahne et al., 2013). Celle-ci utilise la chimie-click couplée à l'analyse par spectrométrie de masse LC-MS/MS. Néanmoins, les sites modifiés ainsi que les rôles de cette MPT sur les propriétés de l'enzyme et leurs impacts sur la voie du 5-FU n'ont, depuis, pas été élucidés.

Chapitre 5 :

La *O*-N-AcétyleGlucosaminylation (*O*-GlcNAcylation)

Chapitre 5 : La O-N-AcetylGlucosaminylation (O-GlcNAcylation)

1. Généralités sur la glycosylation des protéines

La glycosylation correspond à la liaison enzymatique de monosaccharides, assemblés en glycanes, à des protéines, des glucides, des lipides ou tout autre type de molécule. Elle représente l'une des MPT les plus abondantes puisque près de 1 à 2% du génome humain codent 236 **GT** (**Glycosyl**Transférases) différentes dans la base de données **CAZy** (**Carbohydrate-Active enZymes**) et plus de 80% des protéines humaines sont glycosylées. Cette modification peut affecter le repliement, la stabilité, la localisation subcellulaire, l'interaction avec ses partenaires et l'activité biologique d'une glycoprotéine.

Les glycosylations majeures des protéines sont classées selon l'atome qui lie le glycanes à l'aglycone : **N** (**azote**) du groupement amide (R-CONH₂) de l'**Asn** (**Asparagine**) pour la *N*-glycosylation et **O** (**oxygène**) du groupement hydroxyle (OH) des acides aminés Ser ou Thr pour la *O*-glycosylation. Les glycoprotéines complexes liées à la membrane plasmique et sécrétées présentent des *N*-glycanes avec un résidu **β-GlcNAc** (**β-N-Acetyl-D-Glucosamine**) lié à l'Asn sous formes oligomannosidiques, complexes ou hybrides. Les *O*-glycanes sont liés par l'**α-GalNAc** (**α-N-AcetylGalactosamine**) aux acides aminés Ser ou Thr et présentent diverses structures centrales et extensions. Les structures terminales des *O*-glycanes et des *N*-glycanes sont souvent sialylées et fucosylées et peuvent générer les antigènes Lewis. La β-*O*-GlcNAc unique (*O*-GlcNAcylation) se trouve sur de nombreuses protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales (**Figure 26**).

2. Historique et caractéristiques générales de la O-GlcNAcylation

2.1. Découverte

La modification des protéines par *O*-GlcNAcylation a été mise en évidence de manière fortuite pour la première fois dans les années 1980 par Torres et Hart ([Torres and Hart, 1984](#)). En effet, le marquage radioactif par le [³H]-**Gal** (**Galactose**) des résidus GlcNAc terminaux des protéines à la surface des lymphocytes murins a révélé que certaines protéines intracellulaires possédaient un unique résidu GlcNAc.

Cette découverte a alors remis en question le dogme selon lequel la glycosylation est une modification complexe stable uniquement retrouvée sur des protéines membranaires ou de la voie de sécrétion. Depuis ces premiers travaux, plus de 4 000 protéines ont été identifiées comme étant *O*-GlcNAcylées.

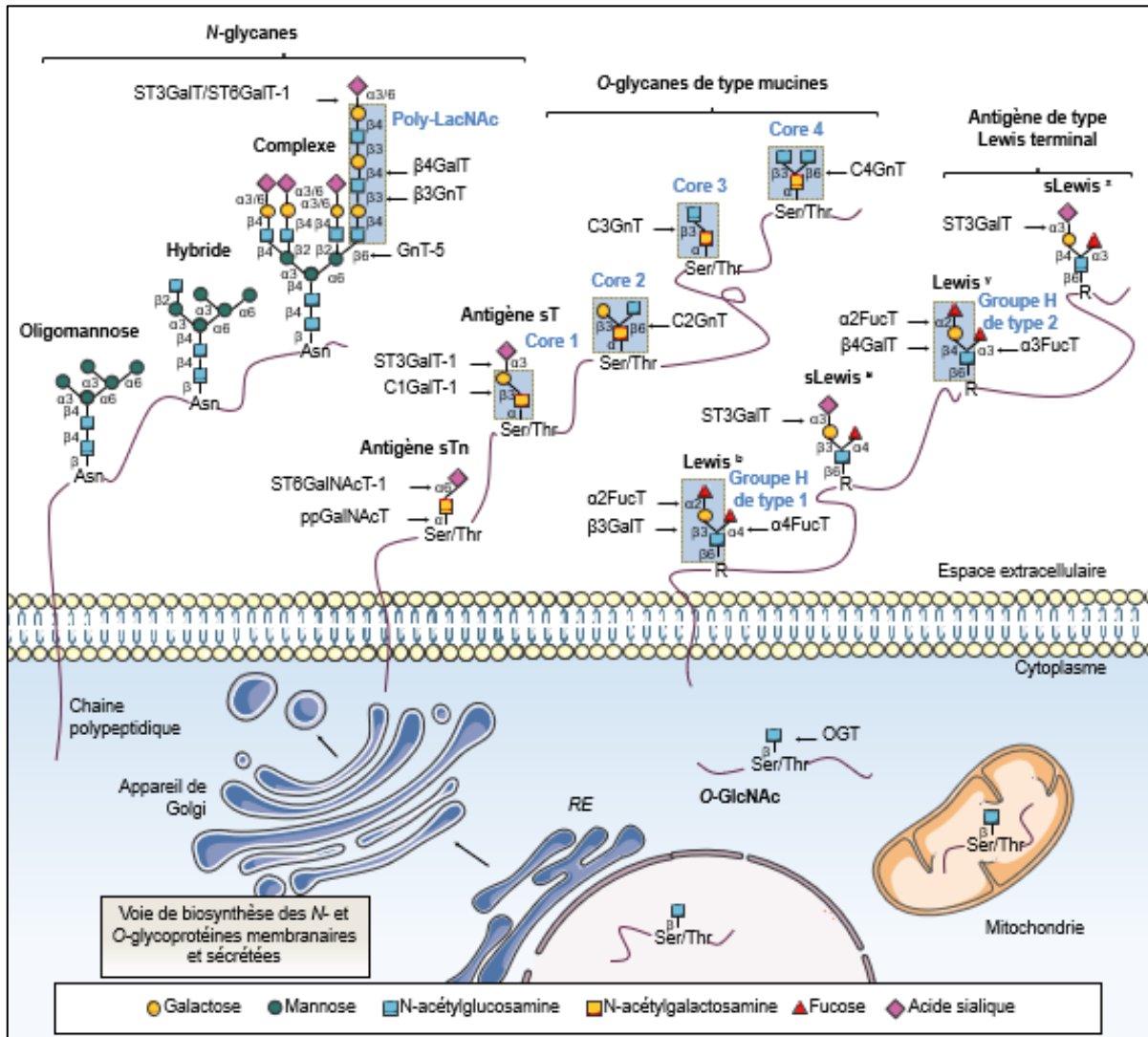


Figure 26 : Types de glycosylation classiques retrouvées sur les protéines de mammifères. Cette figure illustre les structures communes de glycoprotéines liées en *N* et en *O* ainsi que les structures des antigènes Lewis terminaux. Les glycosyltransférases clés responsables de l'addition des glycanes spécifiques sont indiquées. Figure adaptée de [Very et al., 2017](#).

$\alpha 2$ FucT : α 1,2-FucosylTransférase ; **$\alpha 3$ FucT** : α 1,3-FucosylTransférase ; **$\alpha 4$ FucT** : α 1,4-FucosylTransférase ; **$\beta 3$ GalT** : β 1,3-GalactosylTransférase ; **$\beta 3$ GnT** : β 1,3-N-acétylGlucosaminylTransférase ; **$\beta 4$ GalT** : β 1,4-GalactosylTransférase ; **Asn** : Asparagine ; **C1GalT-1** : Core 1 β 1,3-GalactosylTransférase 1 ; **C2GnT** : Core 2 β 1,6-N-acétylGlucosaminylTransférase ; **C3GnT** : Core 3 β 1,3-N-acétylGlucosaminylTransférase ; **C4GnT** : Core 4 N-acétylGlucosaminylTransférase ; **GnT-5** : β 1,6-N-acétylGlucosaminylTransférase 5 ; **O-GlcNAc** : β -O-N-Acétyl-D-Glucosamine ; **OGT** : O-GlcNAc Transférase ; **poly-LacNAc** : poly-N-AcétylLactosamine ; **ppGalNAcT** : polypeptide N-AcétylGalactosaminylTransférase ; **R** : Radical ; **RE** : Réticulum Endoplasmique ; **s** : sialyl ; **Ser** : Sérine ; **ST3GalT** : α 2,3-SialylTransférase ; **ST6GalNAcT-1** : α -GalNAc α 2,6-SialylTransférase 1 ; **ST6GalT-1** : β -galactoside α 2,6-SialylTransférase 1 ; **T** : Thomsen-Friedenreich ; **Thr** : Thréonine ; **Tn** : Thomsen-nouvelle.

2.2. Caractéristiques générales

2.2.1. O-GlcNAcylation : O-glycosylation intracellulaire, simple et dynamique

La O-GlcNAcylation est une MPT qui consiste en l'addition d'un unique monosaccharide GlcNAc sur le groupement hydroxyle des acides aminés Ser et Thr des protéines par l'intermédiaire d'une liaison covalente β -O-glycosidique. Ce résidu GlcNAc ne subit ni épimérisation ni substitution par d'autres sucres.

Comme la phosphorylation, la O-GlcNAcylation est une modification dynamique et réversible. Des expériences de « *pulse-chase* » sur **K8 (Kératine 8)** et K18 puis l' α -crystalline ont révélé que la demi-vie de la O-GlcNAcylation est inférieure à celle des protéines qui la portent (Chou et al., 1992; Roquemore et al., 1996). Ces résultats suggèrent alors qu'une protéine peut être O-GlcNAcylée et dé-O-GlcNAcylée plusieurs fois au cours de sa vie. De cette manière, et au même titre que la phosphorylation, la O-GlcNAcylation pourrait réguler de façon transitoire des processus biologiques en réponse à un stimulus externe.

La O-GlcNAcylation est majoritairement retrouvée dans le cytoplasme et le noyau des cellules, et plus particulièrement au niveau du pore nucléaire (Holt and Hart, 1986; Holt, Snow, et al., 1987; Hanover et al., 1987). La O-GlcNAcylation a également été identifiée sur des protéines mitochondriales de la chaîne respiratoire, à savoir **COX-1 (Cyclo-OXYgénase 1)** et **NDUFA9 (NAD Dehydrogenase Ubiquinone Fe-S protein 1 Alpha subcomplex subunit 9)** (Holt and Hart, 1986; Holt, Haltiwanger, et al., 1987; Hu et al., 2009).

2.2.2. Site consensus de O-GlcNAcylation

La O-GlcNAcylation ne possède pas de séquence peptidique consensus stricte. Cependant, certaines exigences seraient nécessaires à la spécificité de liaison du substrat à l'enzyme de transfert du résidu GlcNAc, l'**OGT (O-GlcNAc Transférase)**. La cristallographie de l'OGT humaine a mis en évidence que cette GT préfère cibler les séquences riches en acides aminés hydroxylés (Ser et/ou Thr) et avec une conformation tridimensionnelle non structurée attribuée aux acides aminés Pro (notamment localisée en position -2 et -3), β -branchés incluant la Val (en position -1) ou encore la présence d'une Ala (en position +2) (Lazarus et al., 2011). Ainsi, les sites O-GlcNAcylés cartographiés à ce jour sont majoritairement localisés dans des régions de type Pro/Val-Pro/Val-Val-gSer/Thr-Ser/Thr (plus de 50% des sites) (Wang, Udeshi, Slawson, et al., 2010) ou encore Pro-X-gThr-X-Ala et Pro-Val-gS (Alfaro et al., 2012) où g est le site O-GlcNAcylé.

2.2.3. Phylogénie

La O-GlcNAcylation est une modification quasi-universelle puisqu'elle est retrouvée chez les mammifères (souris (Torres and Hart, 1984), lapin (*Oryctolagus cuniculus*) (Haltiwanger et al., 1990), rat (Haltiwanger et al., 1992) et Homme (Holt, Haltiwanger, et al., 1987)), les amphibiens (xénope, *Xenopus laevis*) (Slawson et al., 2002), les insectes (drosophile) (Kelly and Hart, 1989), les invertébrés (*Caenorhabditis elegans*) (Hanover et al., 2005) et les végétaux (*Arabidopsis thaliana*) (Swain et al., 2001). Elle est également retrouvée chez certains parasites (*Plasmodium falciparum*) (Dieckmann-Schuppert et al., 1993), champignons (*Aspergillus niger*) (Woosley et al., 2006), bactéries (*Listeria monocytogenes*) (Schirm et al., 2004) et virus (Cytomégalovirus) (Greis et al., 1994).

La O-GlcNAcylation n'a pas été identifiée chez la levure. En revanche, la O-mannosylation nucléocytoplasmique et mitochondriale a récemment été mise en évidence dans cet organisme (*Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*) (Halim et al., 2015). Cette MPT est localisée sur des Ser et Thr à des sites proches de ceux de la phosphorylation et de la O-GlcNAcylation retrouvés sur les protéines orthologues d'eucaryotes supérieurs. Les auteurs suggèrent alors que la O-mannosylation serait l'équivalent de la O-GlcNAcylation chez la levure. La conservation phylogénique de la O-GlcNAcylation dans l'ensemble de ces organismes témoigne que cette modification est apparue très tôt au cours de l'évolution et a un rôle majeur dans les mécanismes biologiques fondamentaux.

2.2.4. MPT ubiquitaire et essentielle

La O-GlcNAcylation est une modification ubiquitaire. Néanmoins, elle est retrouvée en proportion variable selon les tissus avec la plus forte concentration en protéines O-GlcNAcylées dans le cerveau, un organe gluco-dépendant (Gao et al., 2001; Okuyama and Marshall, 2003).

Il s'agit également d'une modification essentielle au développement embryonnaire des mammifères. En effet, le « **KO** » (**Knock-Out**) de la GT *OGT* entraîne la mort des **CSE** (**C**ellules **S**ouches **E**mbyonnaires) et des embryons murins (Shafi et al., 2000). De même, le **KO** inductible de l'*OGT* provoque la mort de l'embryon murin 4 à 5 jours après son implantation (O'Donnell et al., 2004). Il a également été reporté que le **KO** du gène *MGEA5* (**M**enin**G**lioma **E**xpressed **A**ntigen **5**) codant sa **GH** (**G**lycoside **H**ydrolase), l'**OGA** (**O**-GlcNAcAse), provoque un retard de développement embryonnaire et la mort néonatale chez la souris (Yang et al., 2012). En revanche, les **KO** de l'*OGT* et de *MGEA5* ne sont pas létaux chez *Caenorhabditis elegans* mais entraînent des défauts dans la formation de la larve dauer et le stockage des carbohydrates et des lipides (Hanover et al., 2005; Forsythe et al., 2006; Lee et al., 2010).

2.2.5. O-GlcNAcylation extracellulaire

Une O-GlcNAcylation extracellulaire a été mise en évidence chez la drosophile (Sakaidani et al., 2011) puis chez les mammifères (Homme, souris, sanglier *Sus scrofa*) (Shaheen et al., 2013; Nagnan-Le Meillour et al., 2014; Sawaguchi et al., 2017). Néanmoins, cette glycosylation n'est pas réalisée par l'enzyme responsable de la O-GlcNAcylation intracellulaire, l'OGT, mais par l'**EOGT** (EGF-domain specific OGT). Le gène *EOGT* a été conservé au cours de l'évolution et est localisé sur le chromosome 3 (en position 3p14.1). L'EOGT humaine présente 19,6% d'homologie avec la β -1,2-xylosyltransférase de la famille GT61 d'*Arabidopsis thaliana*. Ainsi, dans la lumière du RE, l'EOGT glycosyle les protéines membranaires et sécrétées contenant un domaine « EGF-like ». Chez les mammifères, l'EOGT utiliserait l'UDP-GlcNAc transporté du cytoplasme dans le RE (*Réticulum Endoplasmique*) potentiellement par SLC35B4 (Maszczak-Seneczko et al., 2011). La O-GlcNAcylation extracellulaire est impliquée dans divers processus biologiques tels que l'embryogenèse (Sakaidani et al., 2011), l'angiogenèse (Sawaguchi et al., 2017) ou encore l'olfaction (Nagnan-Le Meillour et al., 2014).

3. Les enzymes de la O-GlcNAcylation

A la différence de la phosphorylation, la O-GlcNAcylation est régulée par un unique couple d'enzymes antagonistes : l'OGT qui transfère le résidu GlcNAc sur la protéine cible et l'OGA qui l'hydrolyse.

3.1. OGT

L'OGT (EC. 2.4.1.255) a été mise en évidence pour la première fois en 1990 par Haltiwanger dans des extraits cytosoliques de réticulocytes de lapin (Haltiwanger et al., 1990) puis caractérisée à partir d'extraits de foie de rat (Haltiwanger et al., 1992). Il s'agit d'une enzyme hautement conservée (67,8% d'identité de séquence entre l'OGT humaine et celle de *Caenorhabditis elegans*) nucléocytoplasmique et mitochondriale (Okuyama and Marshall, 2003; Hanover et al., 2003). Elle est ubiquitaire mais présente des niveaux d'expression plus élevés dans le cerveau, le cœur, le pancréas, les muscles squelettiques et le placenta (Lubas et al., 1997; Okuyama and Marshall, 2003).

3.1.1. Séquence du gène OGT

Chez les mammifères, l'OGT est codée par un seul gène localisé sur le chromosome X et à proximité du centromère (en position Xq13.1). Ce gène est composé de 23 exons et 21 introns (Shafi et al., 2000) (**Figure 27**). En revanche, l'OGT est codée par deux gènes (*OGTA* et *OGTB*) chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) après duplication génique (Webster et al., 2009).

La région 5'-UTR du gène *OGT* contient notamment une boîte TATA (TATAAC localisée en -13 à -18 nt en amont de l'ATG) dans la région promotrice proximale. La région de -66 à +233 nt est définie comme la région promotrice principale. Les éléments promoteurs proximaux et distaux présentent plusieurs

motifs potentiels de liaison aux facteurs de transcription E2F (Muthusamy et al., 2015). Enfin, la région promotrice contient également un motif de liaison conservé au facteur de transcription **TEAD** (Transcriptional EnhAncer Domain) (Peng et al., 2017).

Trois isoformes de l'**OGT** sont générées par épissage alternatif : l'isoforme **ncOGT** nucléocytoplasmique, plus communément appelée OGT, de 116 kDa, **mOGT** mitochondriale de 103 kDa et **sOGT** (short **OGT**) courte nucléocytoplasmique de 75 kDa à partir des 23 exons, des exons 5-23 et des exons 10-23 respectivement (**Figure 27**).

3.1.2. Structure protéique de l'OGT

L'OGT est une GT membre de la famille GT41 dans la base de CAZy. Elle est composée de deux domaines fonctionnels distincts : un domaine d'interaction protéine-protéine N-ter et un domaine catalytique C-ter reliés par une région intermédiaire de liaison flexible dit « *linker* » (Kreppel et al., 1997; Lubas et al., 1997). Les différentes isoformes de l'OGT possèdent un domaine C-ter identique mais différent dans le domaine N-ter (**Figure 27**). Ce domaine leur confère alors une localisation subcellulaire et une activité différentes.

Le domaine N-ter de l'OGT est caractérisé par la présence de plusieurs motifs dégénérés de répétition de 34 acides aminés appelés tétratricopeptides (**TPR, Tetratricopeptide Repeat**) (D'Andrea and Regan, 2003). L'analyse cristallographique de l'OGT humaine a révélé que chaque motif TPR se replie en une paire d'hélices α antiparallèles formant une structure de super-hélice allongée (Jínek et al., 2004). Les motifs TPR interviennent, d'une part, dans la régulation des interactions protéine-protéine, de la fixation et de la sélectivité des substrats et, d'autre part, dans la multimérisation des isoformes de l'OGT (Kreppel and Hart, 1999; Clarke et al., 2008). Récemment, plusieurs résidus Asn (Asn³²², Asn³²⁵, Asn³⁵⁶, Asn³⁸⁶, Asn³⁹⁰, Asn⁴²⁰, Asn⁴²⁴ et Asn⁴⁵⁴) conservés au niveau des 9-14^{ème} motifs TPR ont été identifiés comme essentiels à l'interaction protéine-protéine. Ils ancrent la protéine cible de l'OGT dans la lumière du TPR par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes avec leur chaîne latérale (Rafie et al., 2017; Levine et al., 2018; Joiner et al., 2019). L'état de multimérisation affecterait l'affinité de liaison de l'OGT pour l'UDP-GlcNAc et son activité enzymatique (Kreppel and Hart, 1999). Ce domaine N-ter régulerait l'accessibilité du site actif de l'OGT en pivotant autour de la région « *linker* ». En effet, la liaison des 10^{ème} et 11^{ème} motifs TPR avec le site actif favorise une conformation fermée de l'OGT. La liaison du substrat aux motifs TPR entraîne l'ouverture de cette conformation avec un mouvement charnière des domaines N- et C-ter autour des 12^{ème} et 13^{ème} motifs TPR et l'accessibilité du substrat au site actif (Lazarus et al., 2011).

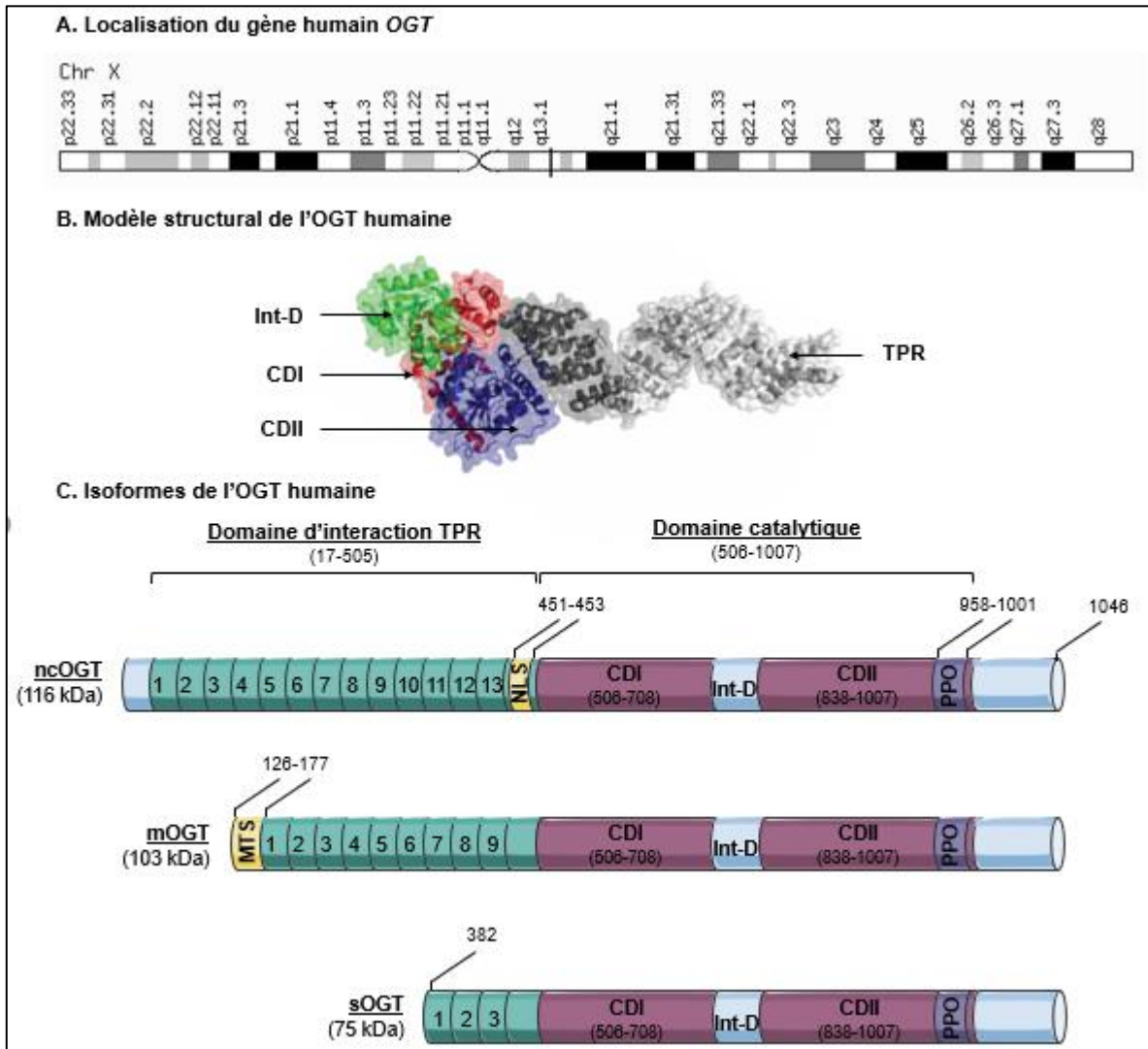


Figure 27 : Gène, structure et isoformes de la *O*-N-acétylGlucosamineTransférase (*OGT*) humaine. A. Le gène *OGT* est localisé sur le chromosome X en position q13.1. Schéma issu de [GeneCards](https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=OGT&keywords=ogt) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=OGT&keywords=ogt>). **B.** L'*OGT* est constituée d'un domaine TPR C-terminal d'interaction protéine-protéine et de 2 domaines N-terminaux catalytiques séparés par un domaine Int-D. Figure tirée de [Janetzko and Walker, 2014](#). **C.** L'*OGT* possède 3 isoformes : la ncOGT, la mOGT et la sOGT.

C-terminal : Carboxy-terminal ; **CD :** Catalytic Domain ; **Chr :** Chromosome ; **kDa :** kiloDalton ; **mOGT :** mitochondrial *OGT* ; **MTS :** Mitochondrial Targeting Sequence ; **N-terminal :** amino-terminal ; **ncOGT :** nucleocytoplasmic *OGT* ; **NLS :** Nuclear Localization Signal ; **OGT :** β -*O*-N-acétylGlucosaminTransférase ; **PPO :** PhosphatidylinositolPhosphate-binding domain activity of *OGT* ; **sOGT :** short *OGT* ; **TPR :** Tetratricopeptide Repeat.

La ncOGT, la mOGT et la sOGT possèdent un nombre différent de répétitions avec respectivement 13,5, 9,5 et 3,5 motifs TPR. Cette hétérogénéité est responsable de la spécificité de substrats des différentes isoformes. La ncOGT présente la séquence NLS $^{451}\text{Asp-Phe-Pro}^{453}$ dans son 14^{ème} motif TPR. Grâce à cette séquence, la ncOGT interagit avec l'importine $\alpha 5$, une protéine adaptatrice qui se lie au pore nucléaire et permet l'import nucléaire de ses substrats (Seo et al., 2016). Comme la ncOGT, la sOGT est également nucléocytoplasmique mais les déterminants de la localisation nucléaire ne sont actuellement pas connus. La mOGT possède, quant à elle, une séquence d'adressage à la mitochondrie MTS de 20 acides aminés en amont des motifs TPR. Cette séquence lui permet d'être localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale (Love et al., 2003) et de glycosyler des protéines de la chaîne respiratoire (Holt and Hart, 1986; Holt, Haltiwanger, et al., 1987; Hu et al., 2009) à partir de l'UDP-GlcNAc importé notamment par le transporteur SLC25A33 (Banerjee et al., 2015). Une étude récente a par ailleurs montré que la mOGT n'est exprimée que chez certains primates et, qu'en son absence, la ncOGT est nécessaire et suffisante pour O-GlcNAcyler des protéines mitochondriales (Trapannone et al., 2016) (Figure 27).

Le domaine C-ter de l'OGT porte l'activité GT de l'enzyme (Kreppel et al., 1997; Lubas and Hanover, 2000). Il présente une conformation GT-B qui consiste en deux domaines Rossmann (avec une topologie feuillet β /hélice α /feuillet β) : les domaines catalytiques I et II (**CDI** et **CDII**, Catalytic Domain I et II), séparés par un **Inter-Domaine (Int-D)** flexible dont la fonction n'est pas encore connue. La présence de nombreux acides aminés basiques en surface du domaine Int-D suggère son implication dans l'interaction avec les membranes ou les acides nucléiques (Roos and Hanover, 2000; Lazarus et al., 2011). Le CDI porte l'activité catalytique à proprement parlé alors que le CDII possède une activité de type lectinique liant l'UDP-GlcNAc (Wrabl and Grishin, 2001). Le domaine C-ter de la ncOGT contient également un sous-domaine de liaison au PIP3, **PPO** (PIP-binding domain activity of OGT), entre les acides aminés $^{958}\text{Arg-Ser}^{1001}$ du CDII et contenant les résidus clés Lys 986 et Lys 989 . Il est impliqué dans le recrutement de la ncOGT à la membrane plasmique en réponse à l'insuline mais également à l'enveloppe nucléaire (X. Yang et al., 2008; Kebede et al., 2012). Par homologie de séquence, ce domaine est également présent dans les autres isoformes de l'OGT (Figure 27).

3.1.3. Activités enzymatiques de l'OGT

L'OGT est une GT de type Leloir qui utilise comme substrat le nucléotide-sucre donneur l'UDP-GlcNAc, produit final de la voie de biosynthèse des hexosamines **HBP** (Hexosamine Biosynthetic Pathway). Elle agit selon un mécanisme séquentiel bi-bi ordonné indépendant des ions métalliques (Lazarus et al., 2011) (Figure 28).

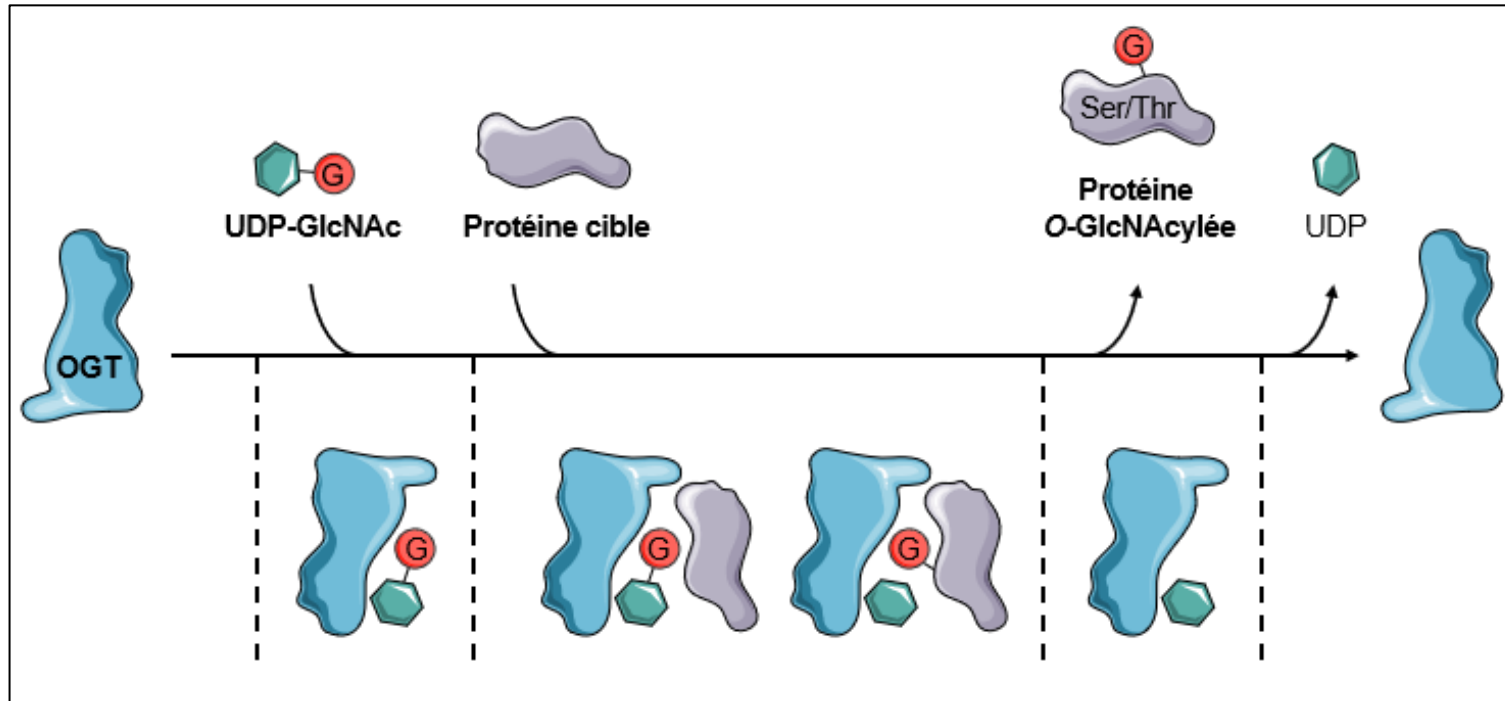


Figure 28 : Réaction enzymatique de l'OGT. L'OGT fixe d'abord l'UDP-GlcNAc dans son site catalytique puis le substrat au niveau des motifs TPR. Dès lors, le résidu accepteur Ser ou Thr du substrat réalise une attaque nucléophile sur le carbone anomérique du donneur GlcNAc de l'UDP-GlcNAc pour former une liaison β -glycosidique. Le polypeptide O-GlcNAcylé et l'UDP sont ensuite séquentiellement libérés.

G : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **OGT** : β -O-GlcNAcTransférase ; **Ser** : Sérine ; **Thr** : Thréonine ; **UDP** : Uridine DiPhosphate.

Une étude récente a montré que l'OGT pouvait également utiliser l'UDP-Glc pour transférer le Glc sur un groupement hydroxyle de protéines nucléocytoplasmiques mais ce, de manière 25 fois moins efficace que le GlcNAc. De plus, ce monosaccharide ne serait pas hydrolysé par l'OGA mais par une autre β -glucosidase. Les auteurs suggèrent que cette modification serait la résultante d'une mauvaise incorporation métabolique par l'OGT suite à un influx important de Glc dans la cellule. Mais ils suggèrent, à l'inverse, qu'elle pourrait avoir un réel rôle physiologique dans les tissus ayant un ratio UDP-Glc/UDP-GlcNAc élevé (Shen et al., 2017).

Outre ses activités de GT, l'OGT catalyse le clivage protéolytique et la maturation du régulateur du cycle cellulaire **HCF-1 (Host Cell Factor-1)** (Capotosti et al., 2011). Des expériences de « *pulse-chase* » suggèrent que ce clivage a principalement lieu dans le noyau mais également, et dans une moindre mesure, dans le cytoplasme (Wilson et al., 1995). Les fragments **HCF-1_N (HCF-1 N-ter)** et **HCF-1_C (HCF-1 C-ter)** issus de son clivage sont respectivement impliqués dans la progression en phase G₁ et la sortie de la phase M (Julien and Herr, 2003). Chez les vertébrés, les fragments HCF-1_N et HCF-1_C sont séparés par une région centrale de **PRO**téolyse (**HCF-1_{PRO}**) constituée de 6 répétitions de 26 acides aminés, chacune présentant une région riche en Thr et une séquence de clivage **CET (Cys-Glu-Thr)**. Lazarus et collaborateurs (2013) ont démontré, par la substitution du Glu en Ser de la séquence CET, que la O-GlcNAcylation et le clivage protéolytique de HCF-1 sont deux activités distinctes de l'OGT mais localisés dans le même site actif (Lazarus et al., 2013) (Figure 29).

3.1.4. Régulation de l'OGT

L'expression, l'activité enzymatique, la localisation subcellulaire et la spécificité de substrats de l'OGT peuvent être régulées aux niveaux génique, transcriptionnel et post-traductionnel par la disponibilité en substrat, les interactions protéiques ou encore la présence de MPT.

3.1.4.1. Génique

Chez les mammifères, le gène *OGT* est localisé à proximité du centre d'inactivation du chromosome X (**XIC, X-Inactivation Center**). Afin de maintenir le niveau transcriptionnel de l'*OGT* entre les individus mâles et femelles, une compensation du dosage est obtenue par inactivation aléatoire d'un des deux chromosomes X chez les femelles. Le long ARN non codant (**lncRNA, long non-coding RNA**) **XIST (X Inactive Specific Transcript)** recrute alors les protéines du groupe Polycomb (**PcG, Polycomb-Group proteins**). **PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1)** et PRC2 déposent des modifications répressives sur les histones de type **H3K27me3 (triméthylation de la Lys²⁷ de l'Histone 3)** et H2AK119Ub et répriment ainsi l'expression génique (Olivier-Van Stichelen and Hanover, 2014) (Figure 30).

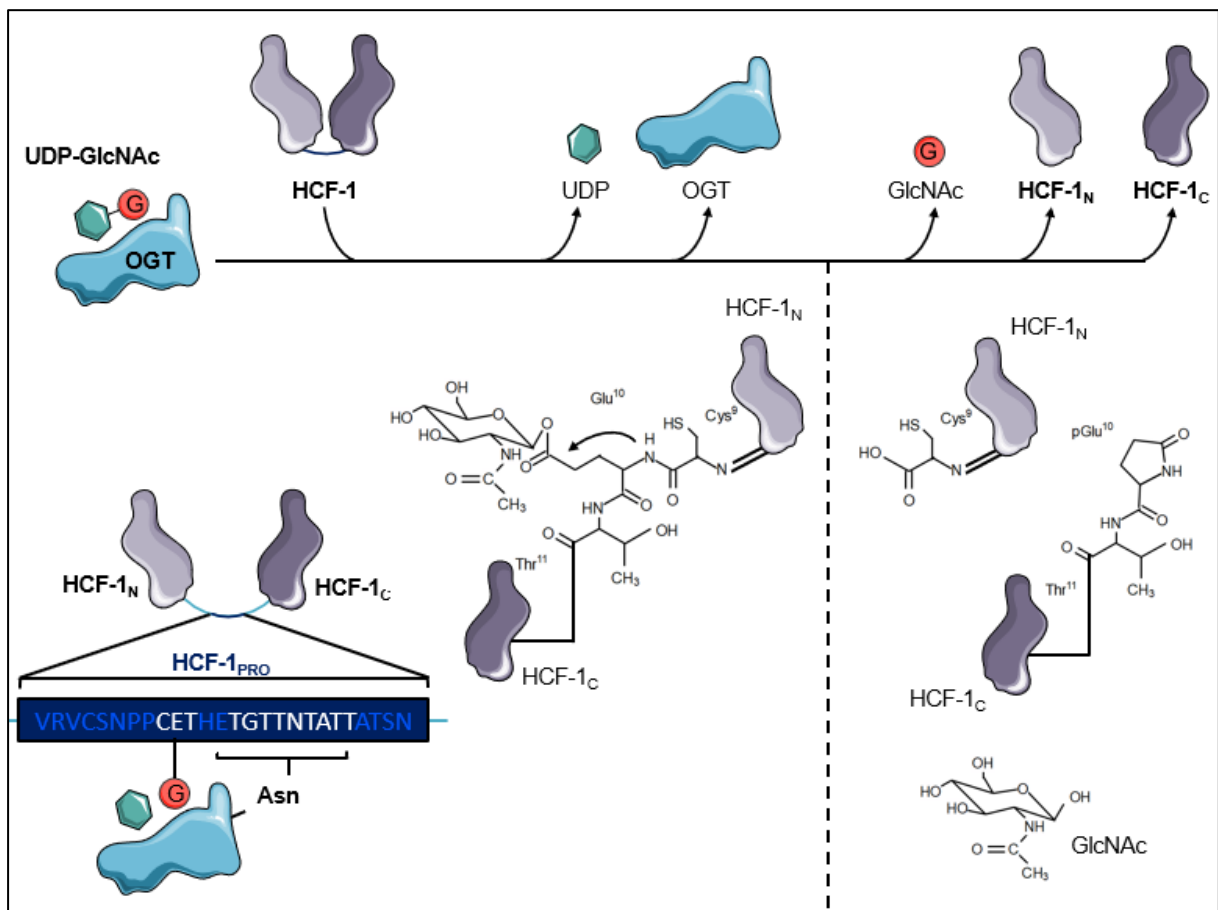


Figure 29 : Réaction protéolytique de l'OGT. Dans un premier temps, l'OGT qui lie l'UDP-GlcNAc dans son site actif interagit stablement avec une région riche en Thr de HCF-1_{PRO} *via* les résidus Asn conservés de ses motifs TPR (Kapuria et al., 2016; Rafie et al., 2017). Ensuite, l'OGT transfère le résidu GlcNAc à partir de l'UDP-GlcNAc sur l'acide aminé Glu de la séquence CET *via* une liaison glycosyl-ester. Cette glycosylation est alors suffisante pour induire l'autolyse de la liaison peptidique entre les acides aminés Cys et Glu et générer un pyroglutamate N-ter sur la sous-unité HCF-1_C (Janetzko et al., 2016).

Asn : Asparagine ; **CET** : Cys-Glu-Thr ; **Cys** : Cystéine ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **Glu** : Glutamate ; **H** : Histidine ; **HCF-1** : Host Cell Factor 1 ; **HCF-1_C** : domaine Carboxy-terminal de HCF-1 ; **HCF-1_N** : domaine amino-terminal de HCF-1 ; **HCF-1_{PRO}** : région de PROTéolyse de HCF-1 ; **OGT** : β-O-GlcNAcTransférase ; **P** : Proline ; **R** : aRginine ; **S** : Sérine ; **TGTTNTATT** : T-Glycine-T-T-Asn-T-Alanine-T-T ; **Thr** : Thréonine ; **TPR** : TetratricoPeptide Repeat ; **UDP** : Uridine DiPhosphate ; **V** : Valine.

Le locus Xq13.1 sur lequel est localisé le gène *OGT* est une région associée aux maladies neurologiques et notamment la **DYT3 (DYsTonie-Parkinsonisme lié au chromosome X 3)** (Shafi et al., 2000; Nolte et al., 2003). Alors que le mécanisme moléculaire sous-jacent n'est pas connu, Mazars et collaborateurs (2010) révèlent que l'*OGT* établit un lien entre les dystonies DYT3 et DYT6. En effet, la protéine **THAP1 (THanatos Associated Protein 1)**, dont les mutations du gène sont responsables de la dystonie DYT6 (Fuchs et al., 2009), interagit avec HCF-1 et l'*OGT* dans les cellules HeLa (Mazars et al., 2010) (Figure 30).

Le séquençage de l'exome de plusieurs membres d'une même famille atteints de la déficience intellectuelle liée à l'*X* (**XLID, X-Linked Intellectual Disability**,) a récemment permis d'identifier une mutation faux-sens (759G>T) de l'*OGT*. Cette mutation provoque la substitution Leu²⁵⁴Phe au niveau du 7^{ème} motif TPR et entraîne la déstabilisation de l'enzyme sans affecter son activité. Au vu de la localisation de la mutation dans le domaine d'interaction protéine-protéine de l'*OGT* et de l'interaction de l'enzyme avec plusieurs protéines associées au XLID telles que **HUWE1 (HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus domain), UBA (UBiquitin-Associated domain), and WWE (Trp-Trp-Glu domain) containing E3 ubiquitin protein ligase 1)** (Giles et al., 2019), HCF-1 (Capotosti et al., 2011) et les **HDAC (Histone DésACétylases)** (Vaidyanathan et al., 2017), les auteurs suggèrent d'explorer l'interactome de l'*OGT* afin d'expliquer la ségrégation observée entre la mutation et le XLID (Vaidyanathan et al., 2017). Une autre mutation faux-sens (1942A>T) *de novo* de l'*OGT* provoquant la substitution Asn⁶⁴⁸Tyr a été très récemment identifiée chez un patient atteint de XLID. Cette mutation est localisée au niveau du domaine catalytique CDI de l'*OGT* et engendrerait des modifications conformationnelles au niveau de la poche de liaison au substrat accepteur et une altération de l'activité enzymatique. En effet, l'enzyme mutée est incapable de glycosyler **TAB1 (TGF-Beta Activated kinase 1)** *in vitro* et réduit la *O*-GlcNAcylation globale des protéines dans les CSE murines (Pravata et al., 2019) (Figure 30).

Kamburov et collaborateurs (2015) mettent en évidence, grâce au projet PanCancer Atlas, un cluster de mutations faux-sens à l'interface du complexe *OGT*-HCF-1 dans plusieurs types de cancer. Ces mutations concernent les acides aminés Asn³³⁵, Gln³⁷², Asp³⁹⁶, Tyr⁴¹⁸, Phe⁴²⁸, Asp⁴³⁰ du domaine TPR, Pro⁵⁶⁹ et Tyr⁶⁴² du domaine CDII de l'*OGT* et, Pro¹⁰⁷⁸, Thr¹⁰⁸⁷ et Thr¹⁰⁹³ de HCF-1. Les auteurs suggèrent que ces mutations perturbent la régulation, par MPT ou clivage protéolytique, de HCF-1. Ce mécanisme participerait au processus de cancérisation en dérégulant l'organisation chromatinienne, l'acétylation des histones, la transcription, le cycle cellulaire et la prolifération (Kamburov et al., 2015). De manière intéressante, la mutation faux-sens du résidu Asn⁴²⁰ est également identifiée dans plusieurs cancers (Kamburov et al., 2015). Or, ce résidu conservé apparaît être essentiel dans la sélectivité de substrat de l'*OGT* et sa mutation augmente l'activité GT dans les cellules cancéreuses du col de l'utérus HeLa (Joiner et al., 2019) (Figure 30).

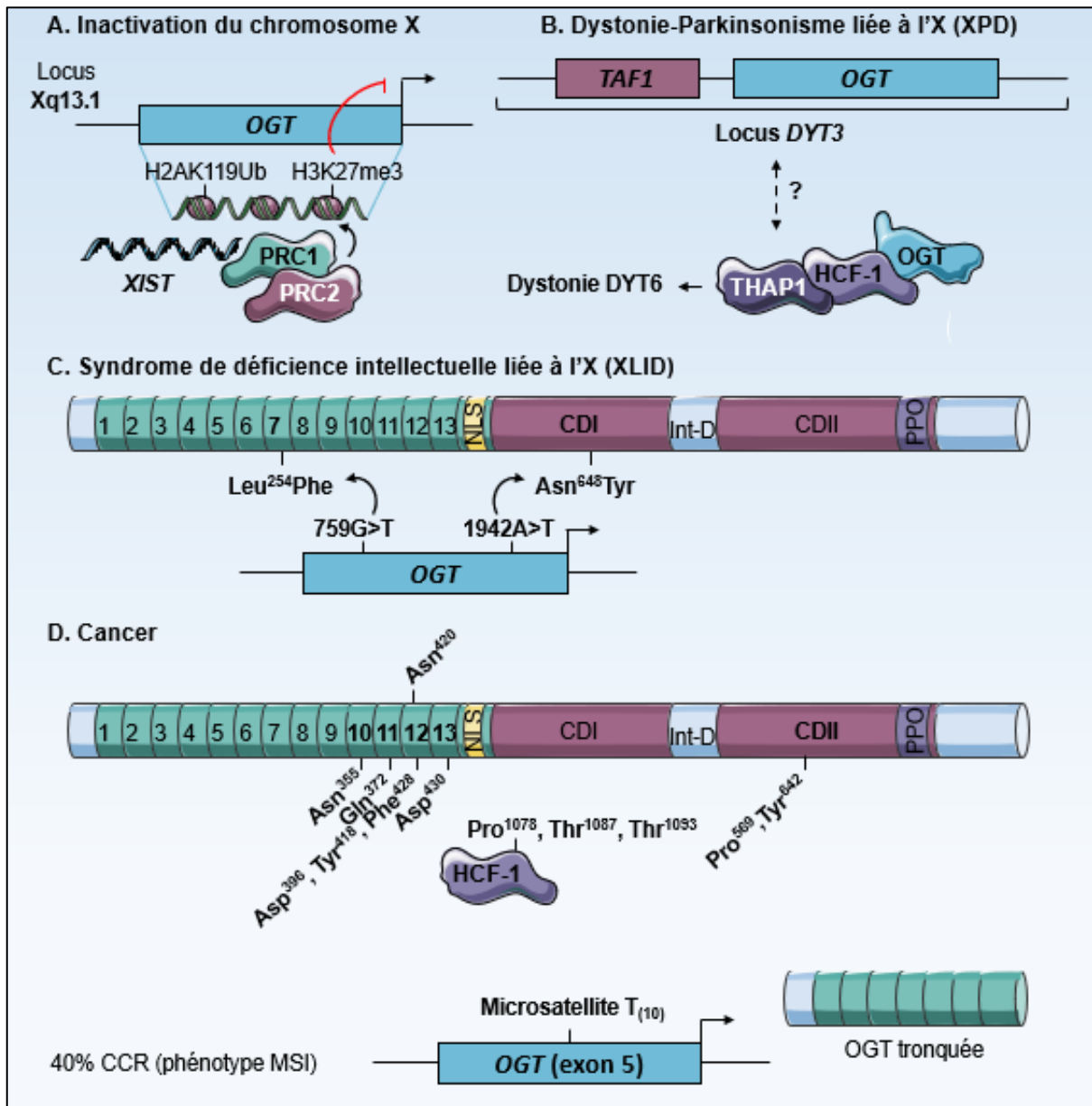


Figure 30 : Régulation génique de l'OGT. **A.** Le gène *OGT* est réprimé de manière épigénétique par les protéines PRC1/2 après liaison du lncRNA *XIST* au cours de l'inactivation du chromosome X. **B.** Le locus de l'*OGT* est une région associée à la dystonie XPD. **C.** Les mutations 759G>T et 1942A>T de l'*OGT* sont responsables du XLID. **D.** Dans le cancer, il existe un cluster de mutations faux-sens à l'interface du complexe OGT-HCF-1. Dans 40% des CCR de phénotype MSI, la délétion d'une T du microsatellite T₍₁₀₎ engendrerait une protéine tronquée.

A : Adénine ; **Asn :** Asparagine ; **Asp :** Aspartate ; **CCR :** Cancer ColoRectal ; **CD :** Catalytic Domain ; **DYT :** DYsTonie ; **G :** Guanine ; **Gln :** Glutamine ; **H :** Histidine ; **HCF-1 :** Host Cell Factor 1 ; **Int-D :** Inter-Domaine ; **K :** lysine ; **lncRNA :** long non-coding RiboNucleic Acid ; **Leu :** Leucine ; **me3 :** triméthylation ; **MSI :** MicroSatellite Instable ; **NLS :** Nuclear Localization Signal ; **OGT :** β-O-N-acétyl-D-GlucosamineTransférase ; **Phe :** Phénylalanine ; **PPO :** PhosphatidylinositolPhosphate-binding domain activity of OGT ; **PRC :** Polycomb Repressive Complex ; **Pro :** Proline ; **T :** Thymine ; **TAF1 :** TATA-box-Associated Factor 1 ; **THAP1 :** THAnatos Associated Protein 1 ; **Thr :** Thréonine ; **Tyr :** Tyrosine ; **Ub :** Ubiquitine ; **XIST :** X Inactive Specific Transcript ; **XLID :** X-Linked Intellectual Disability ; **XPD :** X-linked Dystonia-Parkinsonism.

De manière intéressante, des délétions d'une **T** (Thymidine) affectant le microsatellite T₍₁₀₎ dans l'exon 5 du gène OGT sont responsables d'un décalage du cadre de lecture et ont été observées dans environ 40% des CCR avec le phénotype MSI mais dans aucun avec le phénotype MSS (Woerner et al., 2001; Kim et al., 2002). En revanche, les déséquilibres chromosomiques (**CI**, Chromosomal Imbalances) dans les tumeurs MSI-H n'affecteraient pas l'incidence de ces mutations décalantes de l'OGT (Li et al., 2003). Ces mutations entraînent l'expression d'une protéine OGT mutante de 35 kDa contenant 28 acides aminés de type sauvage suivi de 19 acides aminés codés par la traduction altérée du cadre de lecture en aval du site de mutation et la présence prématurée d'un codon stop intrinsèque (Ripberger et al., 2003). Ces mutations tronqueraient donc l'OGT au milieu du domaine régulateur N-ter et élimineraient ses domaines catalytiques C-ter (Woerner et al., 2001) (Figure 30).

3.1.4.2. Transcriptionnelle

L'expression de l'OGT est régulée par le facteur de transcription E2F-1. En effet, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (**ChIP**, Chromatin ImmunoPrecipitation) ont démontré que E2F-1 se lie directement sur le promoteur de l'OGT. La surexpression ou le KO de *E2F1* réprime et augmente respectivement l'expression de l'OGT de manière dépendante de pRB (Muthusamy et al., 2015). Tout au long de la phase G₁ du cycle cellulaire, pRB associée à E2F-1 est hypo-phosphorylée et O-GlcNAcylée (Wells et al., 2011). Puis, au cours de la transition G₁/S, la phosphorylation de pRB relargue E2F-1 et active l'expression des gènes nécessaires à la réplication. Le niveau de O-GlcNAcylation diminue également au cours de la transition G₁/S puis augmente en fin de phase S pour atteindre un pic en phase M (Dehennaut et al., 2007; Yang et al., 2012; Drougat et al., 2012). Ainsi, la diminution des niveaux d'OGT et de O-GlcNAcylation induite par E2F-1 au cours de la transition G₁/S pourrait favoriser les états d'hypo-O-GlcNAcylation et d'hyper-phosphorylation de pRB ainsi que la progression en phase S (Figure 31).

Après activation de la voie Hippo, l'effecteur **YAP** (Yes-Associated Protein) agit comme co-activateur transcriptionnel du facteur de transcription TEAD. Ce dernier régule alors l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme du glucose tels que *GLUT3* et *OGT*. Ainsi, le *knock-out* de *YAP* et le « **KD** » (*Knock-Down*) de *TEAD* diminuent la quantité de transcrits *OGT* dans les cellules cancéreuses pancréatiques L3.6 et HEK293T respectivement. De manière intéressante, il existe une boucle de rétroaction positive puisque la O-GlcNAcylation de YAP sur la Ser¹⁰⁹ augmente son activité transcriptionnelle (Peng et al., 2017) (Figure 31).

Zhang et collaborateurs (2015) montrent que l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK augmente l'expression de l'*OGT* via le facteur de transcription **Elk-1** (Ets like-1) dans différentes lignées cellulaires. Dans cette même étude, les auteurs ont identifié p300, une **HAT** (Histone AcétylTransférase) activée en aval de la signalisation MAPK/ERK, comme répresseur transcriptionnel de l'*OGT* (X. Zhang et al., 2015) (Figure 31).

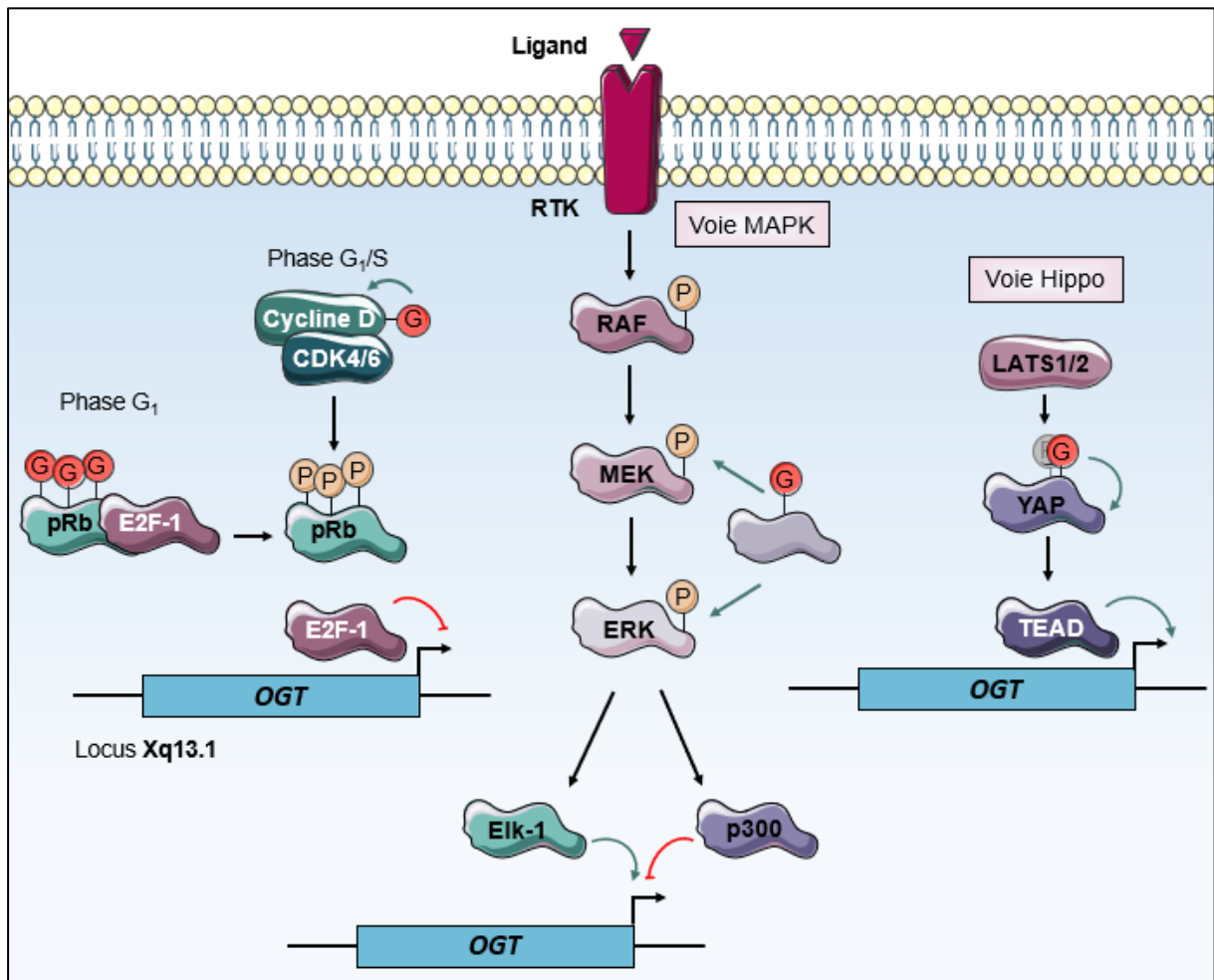


Figure 31 : Régulation transcriptionnelle de l'*OGT*. L'expression de l'*OGT* est augmentée par les facteurs de transcription E2F-1, Elk-1 et TEAD et diminuée par p300.

Elk-1 : E26 transformation-specific like 1 ; **ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinase ; **G** : GlcNAc ; **G₁** : Gap 1 phase ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **LATS** : LArge Tumor Suppressor kinase ; **MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase ; **MEK** : MAPK/ERK Kinase ; **OGT** : β-O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **p300** : protéine de 300 kilodaltons ; **pRB** : protéine du RétinoBlastome ; **RAF** : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma ; **RTK** : Récepteur Tyrosine Kinase ; **S** : Synthesis phase ; **TEAD** : Transcriptional EnhAncer Domain ; **YAP** : Yes-Associated Protein.

3.1.4.3. Post-traductionnelle

3.1.4.3.1. Régulation par la biodisponibilité en substrat

L'OGT possède une très faible constante de Michaelis (K_m) pour l'UDP-GlcNAc de l'ordre de 545 nM (Haltiwanger et al., 1992), l'OGT montre donc une très bonne affinité pour son substrat. Ainsi, l'activité enzymatique de l'OGT est maximale pour de faibles concentrations intracellulaires en UDP-GlcNAc. Cette caractéristique lui confère un avantage compétitif par rapport aux transporteurs d'UDP-GlcNAc (K_m de l'ordre de 3-4 μ M) (Perez and Hirschberg, 1987) et aux GT (K_m respectivement de 40 μ M ; 0,9 mM ; 5 mM et 11 mM pour **MGAT1** (α -1,3-Mannosyl-Glycoprotein 2- β -N-AcétyleglucosaminylTransférase 1), MGAT2, MGAT4 et MGAT5) (Grigorian et al., 2007) résidant dans l'appareil de Golgi et présentant un K_m plus élevé. Cependant, l'affinité de l'OGT pour ses substrats et son activité varient en fonction des concentrations intracellulaires en UDP-GlcNAc (de l'ordre de 0,1 à 1 mM) (Hart and Akimoto, 2009). Ainsi, l'OGT adapte son K_m de 6 à 217 μ M pour des concentrations en UDP-GlcNAc allant de 0,05 μ M à 4,8 mM respectivement (Kreppel and Hart, 1999).

3.1.4.3.2. Régulation par les interactions protéiques

La stabilité de l'OGT peut être régulée par son interaction avec des protéines chaperons telles que **Hsp90A** (Heat shock protein 90-Alpha). D'autre part, la liaison de l'OGT avec certains partenaires permettrait son recrutement auprès des protéines cibles à O-GlcNAcyler. Parmi ces partenaires, **CARM1** (Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1), HCF-1, **mSIN3A** (mammalian Stress-activated protein kinase Interacting protein 3A), **MYPT1** (Myosin Phosphatase Target subunit 1), p38, **PGC1 α** (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1- α), **TET** (Ten-Eleven Translocation) et **TRAK1** (TRAfficking Kinesin protein 1) ont été identifiés (Figure 32).

Dans plusieurs lignées cancéreuses mammaires, l'expression de l'OGT est positivement régulée par la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. En aval de mTOR, le facteur de transcription c-Myc augmente l'expression de la protéine de choc thermique Hsp90A qui se lie à l'OGT afin de prévenir sa dégradation protéasomale (Sodi et al., 2015) (Figure 32). **La régulation *in vitro* et *in vivo* de l'expression de l'OGT par mTOR dans le côlon a fait l'objet de la publication d'un article original intégré en page 321 :**

[Very N, Steenackers A, Dubuquoy C, Vermuse J, Dubuquoy L, Lefebvre Tand El Yazidi-Belkoura I. \(2018\). Cross regulation between mTOR signaling and O-GlcNAcylation. Journal of Bioenergetics and Biomembranes. 50 \(3\) : 213-222.](#)

Dans cette étude, nous avons montré une corrélation positive des niveaux de mTOR phosphorylé activé et d'OGT *in vitro* dans les lignées coliques non cancéreuses CCD 841 CoN et cancéreuses HCT116, et *in vivo* dans les tissus colorectaux de souris **C57BL/6** (**C57 BLack 6**) et ob/ob. L'utilisation de régulateurs pharmacologiques de mTOR (activateur MHY1485 et inhibiteur rapamycine) a permis de montrer que l'expression de l'OGT est dépendante du statut d'activation de mTOR.

Cheung et collaborateurs (2008) ont montré que l'OGT interagit avec MYPT1 et CARM1 dans les cellules de neuroblastome Neuro-2A (Cheung et al., 2008). MYPT1 est une protéine d'échafaudage qui régule la **MP (Myosine Phosphatase)** et qui a un rôle dans la contraction du muscle lisse, la migration, l'adhésion et le cycle cellulaires (Matsumura and Hartshorne, 2008). CARM1 est, quant à elle, une **HMT (Histone MéthylTransférase)** impliquée dans la régulation épigénétique de l'expression génique (Wysocka et al., 2006). Des expériences de « **GST (Glutathione S-Transferase) pull-down** » ont montré que l'interaction de l'OGT avec MYPT1 ou CARM1 ne modifiait pas son activité enzymatique mais altérait sa spécificité de substrat. En revanche, les protéines *O*-GlcNAcylées en réponse au recrutement de l'OGT par MYPT1 et CARM1 n'ont pas été identifiées (**Figure 32**).

La voie de signalisation p38MAPK est impliquée dans la régulation de la réponse inflammatoire, de la différenciation cellulaire, du cycle cellulaire, de l'apoptose ou encore de la sénescence. Elle est notamment activée en réponse aux stress (Coulthard et al., 2009). Par exemple, la privation en glucose de cellules Neuro-2A promeut l'activation de la kinase p38 et sa liaison à l'OGT *via* la région ⁹⁷⁹Ile-Met¹⁰³⁶ de la GT. L'OGT peut alors *O*-GlcNAcyler **NF-H (NeuroFilament H)**, une des cibles de p38, et augmenter sa solubilité. La dépolymérisation de NF-H au niveau des neurofilaments pourrait ainsi affecter la structure axonale (Cheung and Hart, 2008) (**Figure 32**).

Le co-activateur de transcription PGC1 α joue un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes du métabolisme énergétique en réponse au stress (Finck and Kelly, 2006). Dans les cellules d'hépatome Fao, PGC1 α cible l'OGT aux protéines **FoxO (Forkhead box de classe O)**, des facteurs de transcription régulant l'expression des gènes impliqués dans la gluconéogenèse et la réponse au stress. La *O*-GlcNAcylation des protéines FoxO augmente alors leur activité transcriptionnelle (Housley et al., 2009) (**Figure 32**).

Les membres de la famille TET sont des méthylcytosine dioxygénases qui catalysent la conversion de la **5mC (5-méthylCytosine)** en **5hmC (5-hydroxyméthylCytosine)**. Ils participent à la déméthylation de l'ADN et à la régulation épigénétique (Melamed et al., 2018). Les protéines TET2 et TET3 interagissent avec l'OGT et permettent son recrutement au niveau des îlots CpG et des régions promotrices de gènes cibles. En *O*-GlcNAcylant HCF-1 du complexe **SET1/COMPASS (Su(var)3-9 ; Enhancer-of-zeste and Trithorax 1/COMplex Proteins ASSociated with SET1)**, l'OGT stabilise ce complexe qui catalyse la modification H3K4me3 et induit l'activation transcriptionnelle (Deplus et al., 2013). En interagissant avec TET2 au niveau des sites d'initiation de la transcription, l'OGT active également l'expression génique en glycosylant l'histone H2B sur la Ser¹¹² (Chen et al., 2013). Enfin, Kang et collaborateurs (2016) montrent que l'interaction de l'OGT avec TET1 et HCF-1 permet son recrutement au niveau du promoteur du gène **NRF2 (Nuclear Respiratory Factor 2)** et l'activation de la transcription (Kang et al., 2016) (**Figure 32**).

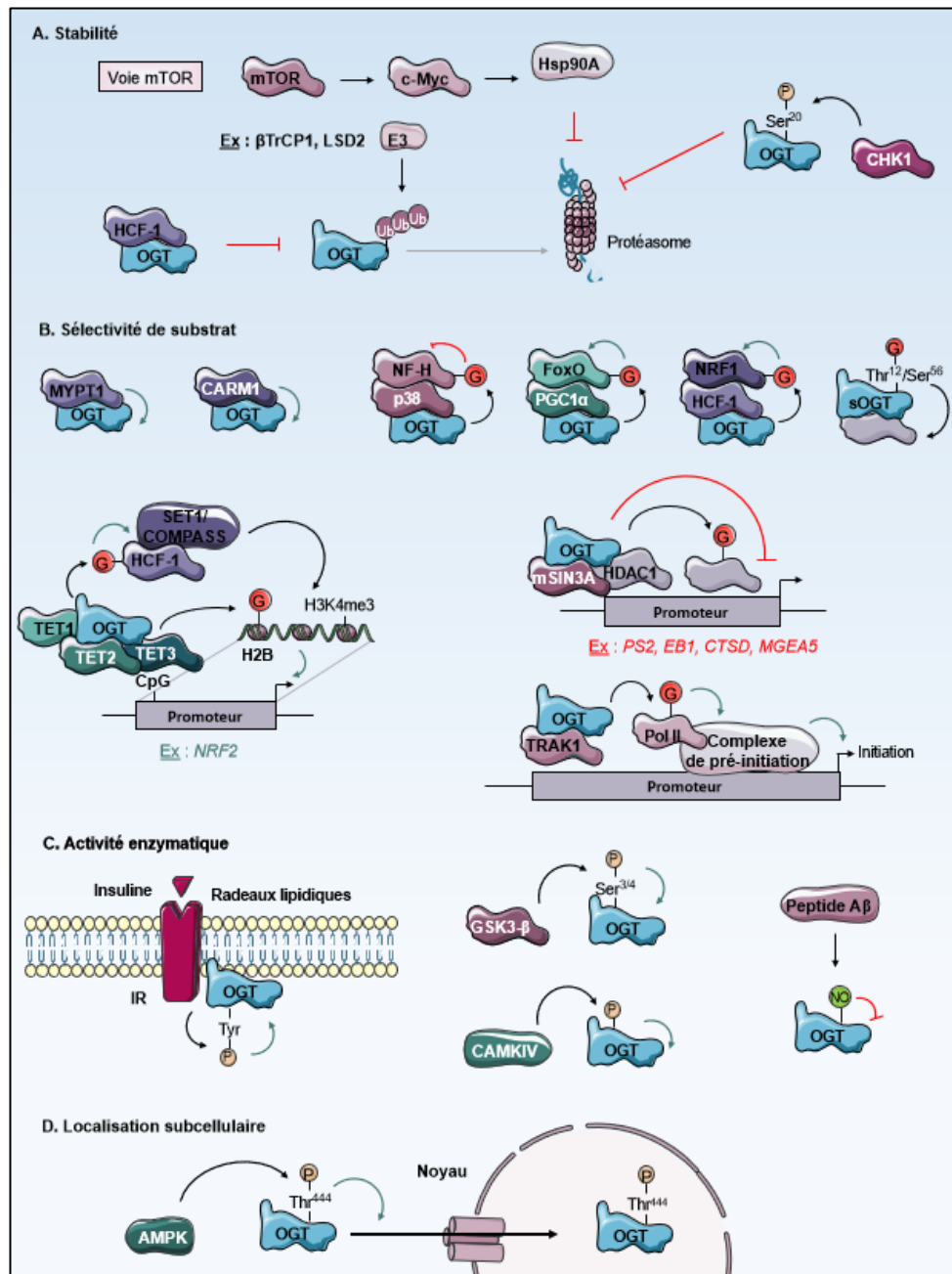


Figure 32 : Régulation post-traductionnelle de l'OGT. L'interaction et les MPT de l'OGT par certaines protéines régulent sa stabilité, sa sélectivité de substrat, son activité enzymatique ou encore sa localisation subcellulaire.

β TrCP1 : β -Transducin repeats-Containing Protein 1 ; **A β** : Amyloïde β ; **AMPK** : Adenosine MonoPhosphate-activated protein Kinase ; **CaMKIV** : Calcium/CalModulin-dependent protein Kinase IV ; **CARM1** : Coactivator-associated ARGinine Methyltransferase 1 ; **CHK1** : CHECKpoint Kinase 1 ; **COMPASS** : COMplex Proteins ASSociated with SET1 ; **CTSD** : *CaThepSine D* ; **EB1** : *End-Binding protein 1* ; **FoxO** : Forkhead box de classe O ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **GSK3- β** : Glycogene Synthase Kinase 3 β ; **H** : Histone ; **H3K4me3** : triméthylation de la lysine⁴ de H3 ; **HCF-1** : Host Cell Factor 1 ; **Hsp90A** : Heat shock protein 90A ; **IR** : Insulin Receptor ; **LSD2** : Lysine-Specific histone Demethylase 2 ; **MGEA5** : *MeninGioma Expressed Antigen 5* ; **mSIN3A** : mammalian Stress-activated protein kinase INTERacting protein 3A ; **mTOR** : mammalian Target Of Rapamycin ; **MPT** : Modification Post-Traductionnelle ; **MYPT1** : MYosin Phosphatase Target 1 ; **NF-H** : NeuroFilament H ; **NO** : Nitric Oxide ; **NRF** : Nuclear Respiratory Factor ; **OGT** : β -O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **p38** : protéine de 38 kDa ; **PGC1 α** : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1 α ; **Pol II** : acide ribonucléique Polymérase II ; **PS2** : *ParaSporine 2* ; **Ser** : Sérine ; **SET1** : Su(var)3-9 ; Enhancer-of-zeste and Trithorax 1 ; **sOGT** : short OGT ; **TET** : Ten-Eleven Translocation ; **Thr** : Thréonine ; **TRAK1** : TRAfficking Kinesin protein 1 ; **Tyr** : Tyrosine ; **Ub** : Ubiquitine.

En interagissant avec de nombreux facteurs de transcription et modificateurs de la chromatine, le co-régulateur transcriptionnel HCF-1 régule leur liaison à l'ADN (Capotosti et al., 2011). HCF-1 interagit à la fois avec l'OGT et le facteur de transcription NRF1 dans les cellules HEK293F. Ce complexe permet à l'OGT de O-GlcNAcyler NRF1 sur les résidus Ser⁴⁴⁸ et Ser⁴⁵¹ et de le stabiliser en réponse à l'inhibition du protéasome dans les cellules cancéreuses HeLa ou MDA-MB-231 (Sekine et al., 2018) (Figure 32).

Le co-répresseur mSIN3A forme un complexe multiprotéique avec les HDAC et joue un rôle crucial dans l'inactivation de la transcription (Adams et al., 2018). TRAK1, quant à lui, est impliqué dans la régulation du trafic cellulaire (Ogawa et al., 2014). Yang et collaborateurs (2002) ont montré dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2 que mSIN3A recrute l'OGT au niveau des promoteurs des gènes cibles (tels que *PS2* (*ParaSporine 2*), *EB1* (*End-Binding protein 1*) et *CTSD* (*CaThespSine D*)) et réprime leur expression. Les protéines liant ces gènes cibles sont O-GlcNAcylées. Les auteurs suggèrent que ces protéines pourraient être des facteurs de transcription ou encore **Pol II** (ARN Polymérase II) (cf. 7.1 page 166) qui sont inactivés par la glycosylation (Yang et al., 2002) (Figure 32).

3.1.4.3.3. Régulation par les MPT

Plusieurs MPT telles que la O-GlcNAcylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la S-nitrosylation ont été identifiées sur l'OGT (Figure 33).

O-GlcNAcylation

L'OGT est elle-même la cible de la O-GlcNAcylation. A l'heure actuelle, de multiples sites de O-GlcNAcylation ont été identifiés sur la ncOGT en amont des motifs TPR sur les Ser³ et Ser⁴; au niveau des motifs TPR sur la Ser³⁸⁹ (11^{ème} TPR), la Ser⁴³⁷ (13^{ème} TPR) et la région ³⁹⁰Ile-Lys⁴⁰⁶ (11-12^{ème} TPR); au niveau du domaine Int-D dans la région ⁸²⁶Thr-Arg⁸³²; et en aval du domaine CDII sur la Thr¹⁰⁴³ et la région ¹⁰³⁷Ile-Ala¹⁰⁴⁶ (H. Tai et al., 2004; X. Liu et al., 2014; Seo et al., 2016; Fan et al., 2018). Cette glycosylation a également été retrouvée sur la sOGT au niveau des acides aminés Ser¹⁰, Thr¹², Ser¹⁸, Ser⁵², Ser⁵⁶, ⁴⁴⁵Thr-Arg⁴⁵¹ et Thr⁴⁴⁹ (correspondant respectivement aux résidus Ser³⁹¹, Thr³⁹³ (11^{ème} TPR), Ser³⁹⁹ (12^{ème} TPR), Ser⁴³³ (13^{ème} TPR), Ser⁴³⁷, ⁸²⁶Thr-Arg⁸³² et Thr⁸³⁰ de la ncOGT) (X. Liu et al., 2014; Fan et al., 2018). Enfin, Rexach et collaborateurs (2010) montrent que la ncOGT et la sOGT sont majoritairement non glycosylées ou mono-O-GlcNAcylées (3,3% de ncOGT et 36,5% de sOGT) dans les neurones (Rexach et al., 2010) (Figure 33).

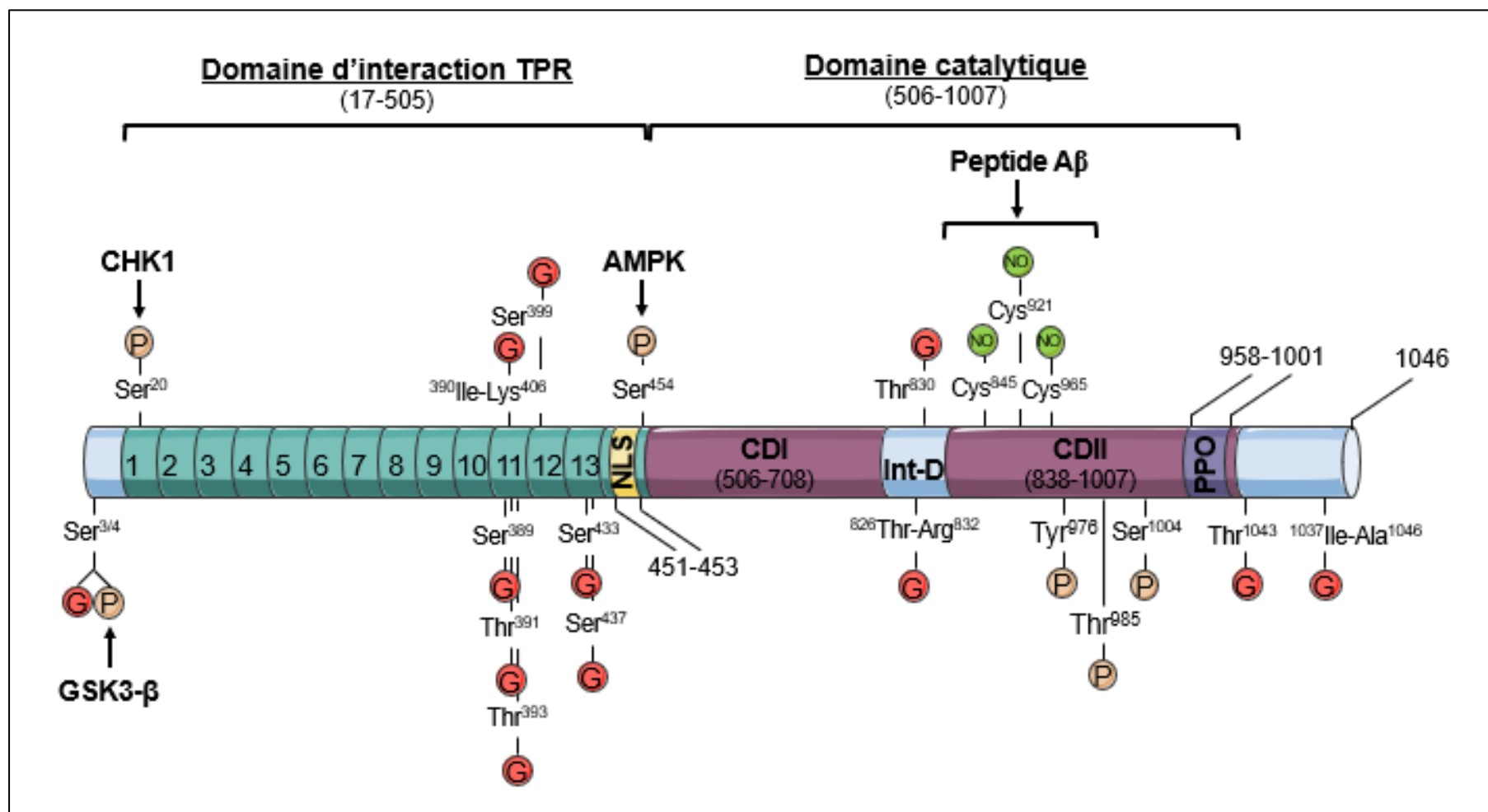


Figure 33 : Modifications post-traductionnelles de l'OGT. L'OGT est notamment la cible de la O-GlcNAcylation, la phosphorylation et la S-nitrosylation.

Aβ : Amyloïde β ; **Ala** : Alanine ; **AMPK** : Adenosine MonoPhosphate-activated protein Kinase ; **Arg** : Arginine ; **CD** : Catalytic Domain ; **CHK1** : CHeckpoint Kinase 1 ; **Cys** : Cystéine ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **GSK3-β** : Glycogene Synthase Kinase 3β ; **Ile** : Isoleucine ; **Int-D** : Inter-Domaine ; **Lys** : Lysine ; **NLS** : Nuclear Localization Signal ; **NO** : Nitric Oxide ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétyleGlucosaminylation ; **OGT** : β-O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **PPO** : PhosphatidylinositolPhosphate-binding domain activity of OGT ; **Ser** : Sérine ; **Thr** : Thréonine ; **TPR** : Tetratricopeptide Repeat ; **Tyr** : Tyrosine.

La *O*-GlcNAcylation de la ncOGT sur les résidus Ser³⁸⁹, Ser⁴³⁷ et ³⁹⁰Ile-Lys⁴⁰⁶ est située à proximité de la séquence NLS (⁴⁵¹Asp-Phe-Pro⁴⁵³). Ainsi, la mutation de la Ser³⁸⁹ ne modifie pas l'activité enzymatique ou les interactions protéine-protéine de la ncOGT mais abolit presque totalement sa localisation nucléaire. La *O*-GlcNAcylation de certains résidus de la ncOGT pourrait favoriser l'exposition de la séquence NLS, l'interaction de l'enzyme avec l'importine α 5 et sa translocation nucléaire (Seo et al., 2016) (Figures 32 et 33).

D'autre part, la présence de nombreux sites *O*-GlcNAcylés au niveau des 11-13^{ème} motifs TPR et du domaine Int-D de la ncOGT et de la sOGT pourrait réguler l'accessibilité du substrat au site actif de l'OGT ou son interaction avec les membranes ou les acides nucléiques (Lazarus et al., 2011). Dans ce sens, Liu et collaborateurs (2019) ont récemment montré que la *O*-GlcNAcylation de la sOGT sur la Thr¹² et la Ser⁵⁶ (respectivement Thr³⁹³ et Ser⁴³⁷ de la ncOGT) ne module pas son activité enzymatique mais sa sélectivité de substrats dans les cellules HEK293T. Notamment, la mutation de ces sites diminue et augmente respectivement la *O*-GlcNAcylation de **hnRNP-U** (heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein U) et **PDCD6IP** (ProgrammeD Cell Death 6-Interacting Protein) ainsi que la prolifération cellulaire (Liu et al., 2019, p.12) (Figures 32 et 33).

La *O*-GlcNAcylation située en aval du domaine CDII pourrait, quant à elle, être impliquée dans la régulation de la liaison de l'UDP-GlcNAc et de l'activité enzymatique (Wrabl and Grishin, 2001) (Figure 33).

Phosphorylation

L'OGT est phosphorylée sur plusieurs sites notamment en amont des motifs TPR sur les Ser^{3/4} par GSK3- β (Bullen et al., 2014); au niveau des motifs TPR sur la Ser²⁰ (1^{er} TPR) par CHK1 (Z. Li et al., 2017), la Thr³²⁵ (9^{ème} TPR) (Olsen et al., 2010) et la Thr⁴⁵⁴ (14^{ème} TPR) par l'**AMPK** (**AMP** (Adenosine MonoPhosphate)-activated protein Kinase) (Kaasik et al., 2013); au niveau du domaine CDII sur la Tyr⁹⁷⁶ (Rigbolt et al., 2011), la Thr⁹⁸⁵ et la Ser¹⁰⁰⁴ (Tsai et al., 2015); et en aval du domaine CDII sur la Ser¹⁰⁴⁵ (Sharma et al., 2014). Le récepteur à l'insuline (**IR**, Insulin Receptor) et **CaMKIV** (**CaIM** (Calcium/CalModulin)-dependent protein Kinase type IV) sont également des kinases de l'OGT mais les sites phosphorylés n'ont pas été identifiés (Figures 32 et 33).

La liaison de l'insuline à son récepteur IR déclenche le recrutement et la phosphorylation de PI3K indirectement *via* la phosphorylation de protéines adaptatrices telles que **IRS-1** (**IR Substrate-1**) ou IRS-2. Ainsi phosphorylée, PI3K catalyse la formation de PIP3 et active la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR impliquée dans la régulation du métabolisme, de la synthèse protéique, de la croissance, de l'angiogenèse ou encore de l'autophagie (Tian et al., 2019). En réponse à l'insuline, le domaine PPO de l'OGT permet sa translocation vers la membrane plasmique dans les adipocytes murins 3T3-L1 (Whelan et al., 2008) et les fibroblastes de singe COS-7 (X. Yang et al., 2008) et au niveau

des radeaux lipidiques comme observé dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2 (Perez-Cervera et al., 2013). Dans les fibroblastes 3T3-L1, cette translocation faciliterait la Tyr-phosphorylation et augmenterait l'activité de l'OGT par le récepteur IR (Whelan et al., 2008) (Figures 32 et 33).

En parallèle, mTOR peut être inhibé par le senseur d'énergie cellulaire AMPK quand le ratio AMP/ATP est élevé. Dans les myotubes de muscles squelettiques différenciés murins C2C12, l'AMPK phosphoryle l'OGT sur le résidu Thr⁴⁴⁴ (Thr⁴⁵⁴ chez l'Homme) au niveau du 14^{ème} motif TPR, à proximité de la séquence NLS et des résidus Asn⁴²⁴ et Asn⁴⁵⁴ essentiels à l'interaction protéine-protéine. La phosphorylation de la Thr⁴⁴⁴ induit la translocation nucléaire de l'OGT dans les myotubes C2C12 (Bullen et al., 2014), et altère sa sélectivité de substrat et son association à la chromatine dans les cellules rénales embryonnaires HEK293T (Bullen et al., 2014; Xu et al., 2014) (Figures 32 et 33).

La kinase GSK3-β est notamment impliquée dans la régulation de la transcription, du métabolisme, du cycle cellulaire ou encore du cycle circadien. Elle phosphoryle *in vitro* l'OGT sur la Ser³ ou la Ser⁴ en amont des motifs TPR et augmente son activité enzymatique. L'activité de l'OGT pourrait être régulée par un dialogue « Yin-Yang » entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation puisque ces deux modifications ciblent les mêmes résidus (Kaasik et al., 2013) (Figures 32 et 33).

L'OGT est également la cible de CHK1, une kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire (cf. 3.1.1 page 57). CHK1 phosphoryle et stabilise l'OGT sur la Ser²⁰ dans les cellules HeLa. Cette phosphorylation induit également la relocalisation de l'OGT au niveau du pont intercellulaire (« *midbody* ») lors de la cytokinèse où elle contrôle le désassemblage des filaments intermédiaires de vimentine (Z. Li et al., 2017) (Figures 32 et 33).

Enfin, après dépolarisation des cellules de neuroblastomes NG-108-15, la kinase CaMKIV phosphoryle l'OGT sur un ou plusieurs sites non encore identifiés. La phosphorylation augmente l'activité enzymatique de l'OGT qui peut alors activer le facteur de transcription AP-1 et induire l'expression de *Tim-1* (*Tissue inhibitor of metalloproteinase-1*) (Song et al., 2008) (Figure 32).

Ubiquitination

Les analyses par spectrométrie de masse de l'ubiquitome ont permis d'identifier plus d'une trentaine de sites ubiquitylés localisés sur l'ensemble des domaines de l'OGT (Wagner et al., 2011; Kim et al., 2011; Udeshi et al., 2013; Mertins et al., 2013; Akimov et al., 2018). En revanche, aucune de ces études n'a attribué à ces modifications des ubiquitine ligases E3 spécifiques. De manière intéressante, l'inhibition pharmacologique de CHK1 et l'utilisation de siRNA contre *HCF-1* augmentent l'ubiquitination de l'OGT et déstabilisent l'enzyme (Daou et al., 2011; Z. Li et al., 2017).

La poly-ubiquitination aurait donc un rôle dans la dégradation protéasomale de l'OGT. Ainsi, en réponse à l'hypoxie, l'ubiquitine ligase E3 **βTrCP1** (**β-Transducin repeats-Containing Protein 1**) est responsable de la dégradation de l'OGT par le protéasome 26S et de l'augmentation de la réponse inflammatoire de l'endothélium vasculaire *in vitro* et *in vivo* (H. Liu et al., 2014). **LSD2** (**Lysine-Specific histone Demethylase 2**) qui possède une activité ubiquitine ligase E3 induit également la dégradation de l'OGT et l'inhibition de la croissance des cellules cancéreuses pulmonaires A549 (Y. Yang et al., 2015, p.2) (**Figure 33**).

S-nitrosylation

La *S-nitrosylation* est une MPT qui correspond à l'ajout covalent d'un NO sur le groupement thiol d'un résidu Cys de la protéine cible pour former une nitrocystéine. Dans la plupart des cas, la spécificité de la *S-nitrosylation* est gouvernée par des motifs consensus Lys-Arg-His-Asp-Glu-Cys-Asp-Glu riches en acides aminés acides et basiques. Cette MPT régule l'activité enzymatique, la localisation subcellulaire ou encore les interactions protéine-protéine (Kovacs and Lindermayr, 2013).

Dans les macrophages murins à l'état de repos, la *S-nitrosylation* de l'OGT inhibe son activité enzymatique de plus de 80%. La stimulation par le **LPS** (**LipoPolySaccharide**) activateur de la réponse immunitaire innée provoque la dénitrosylation et l'activation de l'OGT *in vitro* et *in vivo* (Ryu and Do, 2011). Récemment, le traitement des cellules de neuroblastome avec le peptide **Aβ** (**Amyloïde β**) induit la *S-nitrosylation* de l'OGT sur les résidus Cys⁸⁴⁵, Cys⁹²¹ et Cys⁹⁶⁵ du domaine CDII. Cette MPT diminue l'activité enzymatique de l'OGT et accélère la neurotoxicité notamment par l'hypo-*O*-GlcNAcylation et l'hyper-phosphorylation de **Tau** (**Tubulin associated unit**) (Ryu et al., 2016) (**Figures 32 et 33**).

3.2. β-O-linked N-AcetylGlucosaminidase (OGA)

L'OGA (EC. 3.2.1.169) a été initialement décrite comme l'**HexC** (**Hexosaminidase C**) qui, contrairement aux HexA et HexB, n'est pas lysosomale, est active à pH neutre et a pour seul substrat le résidu GlcNAc (Braidman et al., 1974). Elle a été isolée et caractérisée en 1994 par Dong et Hart dans des extraits cytosoliques de rate de rat (Dong and Hart, 1994). Son ADN complémentaire fut cloné et séquencé en 2001 à partir d'extraits de cerveau humain (Gao et al., 2001). Ce séquençage a permis de mettre en évidence qu'il était identique à celui de *MGEA5* codant une hyaluronidase putative impliquée dans la réponse immunitaire chez les patients atteints de méningiome (Heckel et al., 1998). L'OGA est une enzyme relativement conservée (30,5% d'identité de séquence entre l'OGA humaine et celle de *Caenorhabditis elegans*) nucléocytoplasmique et mitochondriale (Gao et al., 2001; Banerjee et al., 2015). Elle est ubiquitaire mais présente des niveaux plus élevés dans le cerveau, le placenta, le pancréas et le cœur (Gao et al., 2001).

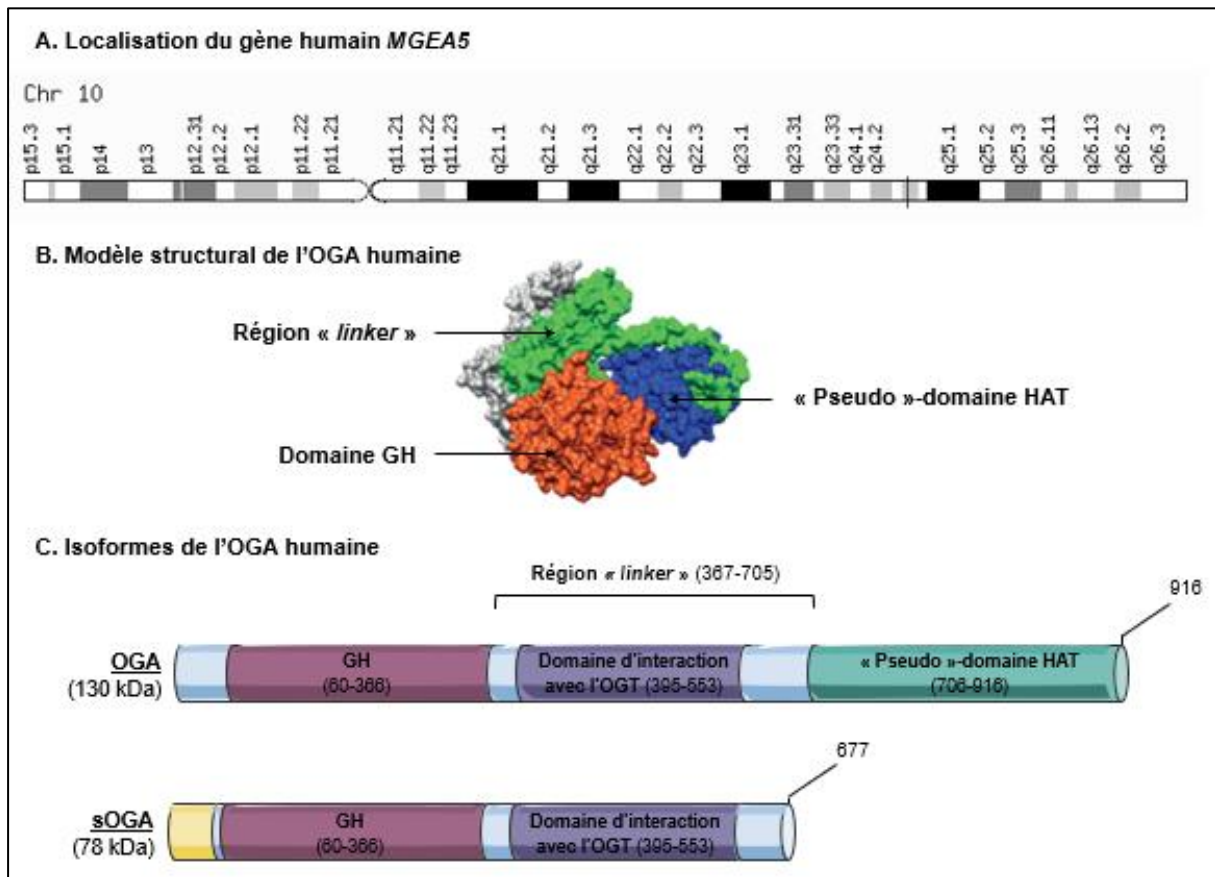


Figure 34 : Gène, structure et isoformes de la *O*-N-acétylGlucosaminidAse (OGA) humaine. A. Le gène *MGEA5* est localisé sur le Chr10 en position q24.1-q24.3. Schéma issu de [GeneCards](https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MGEA5&keywords=mgea5) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MGEA5&keywords=mgea5>). B. L'OGA est constituée d'un domaine GH N-ter et d'un « pseudo »-domaine HAT C-ter séparés par une région « linker ». Figure tirée de [Vocadlo, 2012](#). C. L'OGA possède 2 isoformes : l'OGA et la sOGA.

C-ter : Carboxy-terminal ; **Chr** : Chromosome ; **GH** : Glycoside Hydrolase ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **HAT** : Histone AcétylTransférase ; **kDa** : kiloDalton ; **MGEA5** : *MeninGiona Expressed Antigen* ; **N-ter** : amino-terminal ; **OGA** : β -*O*-GlcNAcAse ; **OGT** : β -*O*-GlcNAcTransférase ; **sOGA** : short OGA.

3.2.1. Séquence du gène *MeninGioma Expressed Antigen 5 (MGEA5)*

Chez les mammifères, l'OGA est codée par un seul gène localisé sur le chromosome 10 (en position 10q24.1-q24.3) et composé de 16 exons et 15 introns (Comtesse et al., 2001). La région promotrice principale de *MGEA5* est riche en GC et est localisée en -48 à +181 nt. Comme pour l'OGT, cette région contient plusieurs motifs potentiels de liaison aux facteurs de transcription E2F (Muthusamy et al., 2015). Chez l'Homme deux isoformes de l'OGA sont générées par épissage alternatif. L'isoforme longue OGA nucléocytoplasmique et mitochondriale de 130 kDa à partir des 16 exons, et l'isoforme **sOGA** (short **OGA**) courte cytoplasmique de 78 kDa à partir des exons 1-10 (Comtesse et al., 2001) (Figure 33). Chez le rat, l'épissage alternatif engendre deux isoformes inactives supplémentaires de 84 et 90 kDa par perte des exons 8 et 9, et de l'exon 8 respectivement (Toleman et al., 2004).

3.2.2. Structure et activités enzymatiques

L'OGA est une GH membre de la famille GH84 selon la classification CAZy. Elle possède deux domaines fonctionnels distincts : un domaine GH N-ter et un « pseudo »-domaine HAT C-ter séparés par une région « linker ». La sOGA est dépourvue du domaine HAT (Comtesse et al., 2001) mais possède 14 acides aminés en position C-ter qui lui sont propres (Figure 34).

La région « linker » de l'OGA comprend notamment les résidus ⁴⁰⁴His-Tyr⁵⁴⁸ qui constituent un domaine d'interaction avec les 6 premiers motifs TPR de l'OGT (Figure 34). En effet, les deux enzymes antagonistes sont partenaires d'interaction dans un complexe appelé *O*-GlcNAcylase (Whisenhunt et al., 2006).

Le domaine N-ter de l'OGA est apparenté structurellement et mécaniquement à celui des hyaluronidases de la famille GH18 selon la classification CAZy. Ces enzymes effectuent une hydrolyse des glycosides avec une rétention nette de la configuration anomérique. Elles utilisent un mécanisme catalytique assisté par le substrat et impliquant l'attaque nucléophile de l'oxygène carbonyle du groupement N-acétyl sur le centre anomérique (Alonso et al., 2014) (Figure 35).

Le domaine C-ter de l'OGA est homologue à celui des HAT de la famille **GNAT** (**GCN5** (**General Control Nonderepressible 5**) related family of **AcetylTransferase**) qui transfèrent le groupement acétyl à partir de l'acétyl-CoA sur le groupement ε-amine de résidus de lysine des histones cibles (Schultz and Pils, 2002). *In vitro*, l'OGA est capable de lier la queue de l'histone H4 au sein des nucléosomes grâce à un motif type doigt de zinc et d'acétyler la Lys⁸ (Toleman et al., 2004; C.A. Toleman et al., 2006). De plus, les acides aminés Asp⁸⁵³, Asp⁸⁸⁴ et Tyr⁸⁹¹ sont nécessaires à son activité HAT *in vitro* (Toleman et al., 2004). Néanmoins, cette activité n'a pas été validée *in vivo* (Butkinaree et al., 2008; Rao et al., 2013). En effet, l'OGA ne possède pas le motif consensus Arg/Gln-X-X-Gly-X-Gly/Ala de liaison des GNAT à l'acétyl-CoA (Schultz and Pils, 2002) et n'est pas capable de fixer ce cofacteur *in vivo* (Rao et al., 2013). Le domaine C-ter est ainsi catalytiquement incompetent et est considéré comme un « pseudo »-domaine HAT (Rao et al., 2013) (Figure 34).

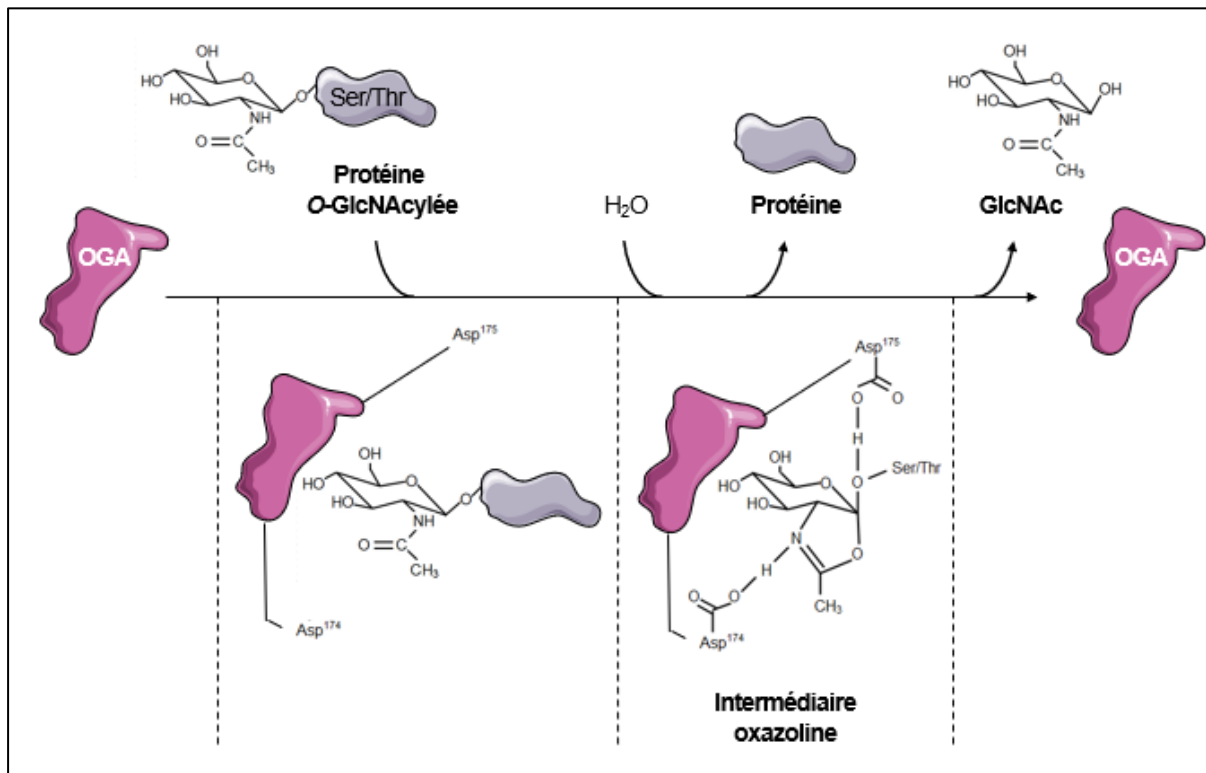


Figure 35 : Réaction enzymatique de l’OGA. De manière spécifique et sans séquence consensus, l’OGA reconnaît et fixe dans sa poche catalytique le résidu GlcNAc dont le carbone C₁ est engagé dans la liaison en anomérie β avec la protéine cible (Shen et al., 2012). L’OGA catalyse alors la formation d’un intermédiaire bi-cyclique oxazoline qui est ensuite hydrolysé afin de libérer l’OGA et le résidu GlcNAc. Chez l’Homme, le site catalytique de l’OGA est caractérisé par les résidus conservés Asp¹⁷⁴ et Asp¹⁷⁵. Le résidu Asp¹⁷⁴ polarise le groupement 2-acétamido de l’oxygène carbonyle du substrat afin d’augmenter son pouvoir nucléophile, et le résidu Asp¹⁷⁵ fonctionne comme un catalyseur général acide/base (Çetinbaş et al., 2006).

Asp : Aspartate ; **C** : Carbone ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **OGA** : β-O-GlcNAcAse ; **Ser** : Sérine ; **Thr** : Thréonine.

Singh et collaborateurs (2020) ont très récemment démontré que l'OGA ne possède pas d'activité **KAT** (**Lysine Acétyl**Transférase) intrinsèque mais que son « pseudo »-domaine HAT lui permet d'interagir avec des protéines la possédant. Ainsi, le « pseudo »-domaine HAT de l'OGA est indispensable à l'acétylation de PKM2 dans les cellules cancéreuses (Singh et al., 2020). D'autre part, la sOGA dépourvue du « pseudo »-domaine HAT possède une activité glycosidase 400 fois moins importante que l'OGA *in vitro* (Macauley and Voadlo, 2009). De manière intéressante et par rapport à l'enzyme de pleine longueur, la sOGA présente une certaine résistance *in vitro* aux inhibiteurs pharmacologiques de l'OGA (Kim et al., 2007). Ce résultat renforce l'idée d'un du « pseudo »-domaine HAT dans la régulation du mécanisme catalytique de l'OGA notamment en recrutant certains cofacteurs ou protéines.

La sOGA possède 14 acides aminés en C-ter lui permettant d'interagir avec les gouttelettes lipidiques naissantes impliquées dans le stockage des lipides neutres. Elle est responsable du remodelage des protéines de la surface des gouttelettes lipidique par activation du protéasome 26S (Keembiyehetty et al., 2011) (cf. 7.3 page 172).

3.2.3. Régulation de l'OGA

Plusieurs mécanismes de régulations géniques, transcriptionnelles et post-traductionnelles de l'OGA ont été mis en évidence (**Figure 36**).

3.2.3.1. Régulation génique

Le gène *MGEA5* est localisé au niveau du locus 10q. Le polymorphisme de ce locus peut jouer un rôle dans la prédisposition génétique liée à la maladie d'Alzheimer (Bertram et al., 2000; Myers et al., 2000) et au DT2 chez certaines populations telles que les Américains d'origine mexicaine (Duggirala et al., 1999) et les Indiens de la tribu Pima (Farook et al., 2002). Le séquençage de *MGEA5* de 44 individus Mexicano-Américains diabétiques et non diabétiques a permis d'identifier un polymorphisme SNP *LLY-MGEA5-14* au niveau de l'intron 10. Le codon stop alternatif généré est lié à l'âge et au phénotype diabétique du début de la maladie. Ce SNP diminuerait l'expression et l'activité de l'OGA (Lehman et al., 2005).

3.2.3.2. Régulation transcriptionnelle

Comme l'*OGT*, le gène *MGEA5* est lié et négativement régulé par le facteur de transcription E2F-1 et ce, dépendamment de pRB (Muthusamy et al., 2015). Ainsi, au cours du cycle cellulaire l'homéostasie de la *O*-GlcNAcylation serait maintenue par la régulation simultanée des deux enzymes (**Figure 36**). Récemment, Vaidyanathan et collaborateurs (2017) ont montré que l'*OGT* peut interagir avec le complexe répresseur transcriptionnel mSIN3A/HDAC1 dans des cellules lymphoblastoïdes de patients porteurs de la mutation 759G>T de l'*OGT*. Ce complexe est alors enrichi au niveau du promoteur proximal de *MGEA5*, diminuant son activité transcriptionnelle et permettant ainsi de maintenir l'homéostasie de la *O*-GlcNAcylation (Vaidyanathan et al., 2017) (**Figure 36**).

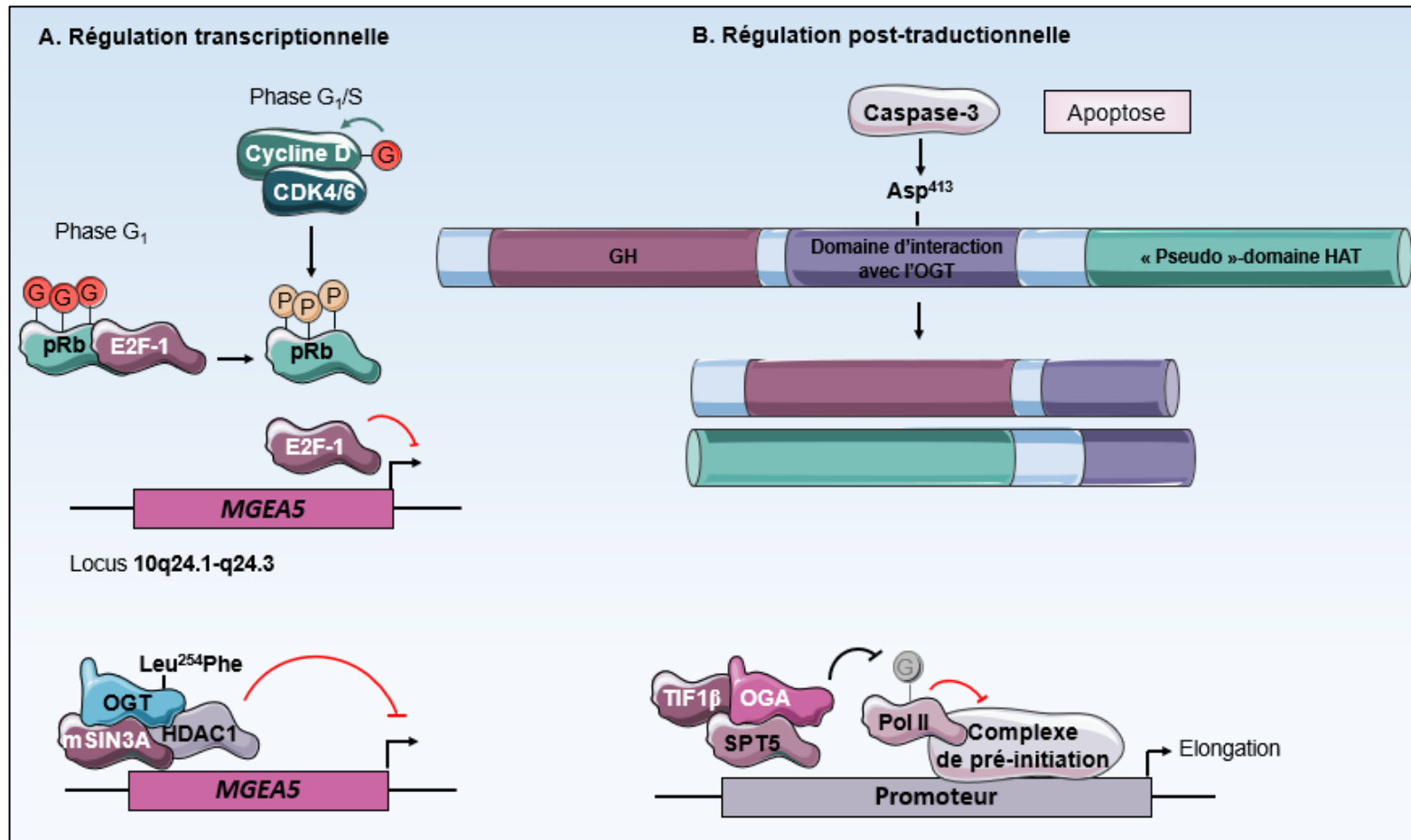


Figure 36 : Mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle de l'OGA. A. L'expression de *MGEA5* est négativement régulée au niveau génique par le facteur de transcription E2F-1 et épigénétique par le complexe OGT/mSIN3A/HDAC1. B. Au cours de l'apoptose, l'OGA est clivée par la caspase-3 en 2 domaines distincts qui restent physiquement liés. L'association de l'OGA avec TIF1β et SPT5 régule son interaction avec Pol II.

Asp : Aspartate ; **G** : GlcNAc ; **G₁** : Gap 1 phase ; **GH** : Glycoside Hydrolase ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **HAT** : Histone AcétylTransférase ; **HDAC1** : Histone DésAcétylase 1 ; **Leu** : Leucine ; **MGEA5** : *MeninGiona Expressed Antigen* ; **mSIN3A** : mammalian Stress-activated protein kinase **IN**teracting protein **3A** ; **OGA** : β-**O**-GlcNAcAse ; **OGT** : β-**O**-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **Phe** : Phénylalanine ; **Pol II** : acide ribonucléique **Pol**ymérase **II** ; **pRb** : protéine du **RétinoBlastome** ; **S** : **S**ynthesis phase ; **SPT5** : Su**P**pressor of Ty 5 ; **TIF1β** : **T**ranscriptional **I**ntermediary **F**actor 1β.

3.2.3.3. Régulation post-traductionnelle

3.2.3.3.1. Par clivage protéolytique

Le résidu Asp⁴¹³ du domaine d'interaction avec l'OGT au niveau de la région « linker » est clivé par la caspase-3 au cours de l'apoptose *in vitro* et *in vivo* (Wells, Gao, et al., 2002; Butkinaree et al., 2008). Néanmoins, les deux domaines N-ter et C-ter resteraient associés ou se réassocieraient après clivage permettant à l'OGA de conserver son activité enzymatique (Butkinaree et al., 2008). Le rôle de ce clivage n'est, à ce jour, toujours pas connu (Figure 36).

3.2.3.3.2. Par les interactions protéiques

Comme l'OGT, l'interaction de l'OGA avec certains partenaires induirait son recrutement auprès de protéines cibles à déglycosyler. Ainsi, dans les cellules HeLa, sa liaison avec les facteurs d'élongation SPT5 (SuPpressor of Ty 5) et TIF1β (Transcriptional Intermediary Factor 1β) au niveau du site d'initiation de la transcription des gènes cibles permettrait la dé-O-GlcNAcylation de Pol II et l'élongation de la transcription (Resto et al., 2016) (Figure 36).

3.2.3.3.3. Par les MPT

Des analyses protéomiques ont permis d'identifier la O-GlcNAcylation, la phosphorylation et l'ubiquitination sur l'OGA.

Ainsi, l'OGA est phosphorylée sur les acides aminés Ser⁶, Ser⁵²² (Mertins et al., 2016) et Ser²⁶⁸ (Rigbolt et al., 2011) du domaine GH, Ser³⁶⁴ et Thr³⁷⁰ (Kettenbach et al., 2011) de la région « linker », Ser⁵⁰⁵, Ser⁵⁰⁹ et Ser⁵¹¹ (Sharma et al., 2014) du domaine d'interaction avec l'OGT et, Thr⁷⁰⁹, Ser⁷¹² (Kettenbach et al., 2011) et Ser⁹¹⁵ (Klammer et al., 2012) du « pseudo »-domaine HAT. Elle est également O-GlcNAcylée sur la Ser⁴⁰⁵ du domaine d'interaction avec l'OGT (Khidekel et al., 2007) et ubiquitinylée sur plus d'une vingtaine de sites répartis sur l'ensemble de l'enzyme (Wagner et al., 2011; Udeshi et al., 2013; Akimov et al., 2018). En revanche, le rôle de ces MPT n'est pas encore élucidé. Néanmoins, Rexach et collaborateurs (2010) montrent que, comme l'OGT, l'OGA est majoritairement non glycosylée ou mono-O-GlcNAcylée (10,8% d'OGA mono-glycosylée) dans les neurones (Rexach et al., 2010) (Figure 37).

4. La voie de biosynthèse des hexosamines (Hexosamine Biosynthetic Pathway, HBP)

4.1. Généralités

Le nucléotide-sucre donneur substrat de l'OGT est l'UDP-GlcNAc, le produit final de la voie HBP. La voie HBP est au carrefour des métabolismes du glucose, des acides aminés (Gln en particulier mais également des acides aminés glucogéniques et céto-géniques), des acides gras (acétyl-CoA) et des nucléotides (UTP) (Wang et al., 1998) (Figure 37).

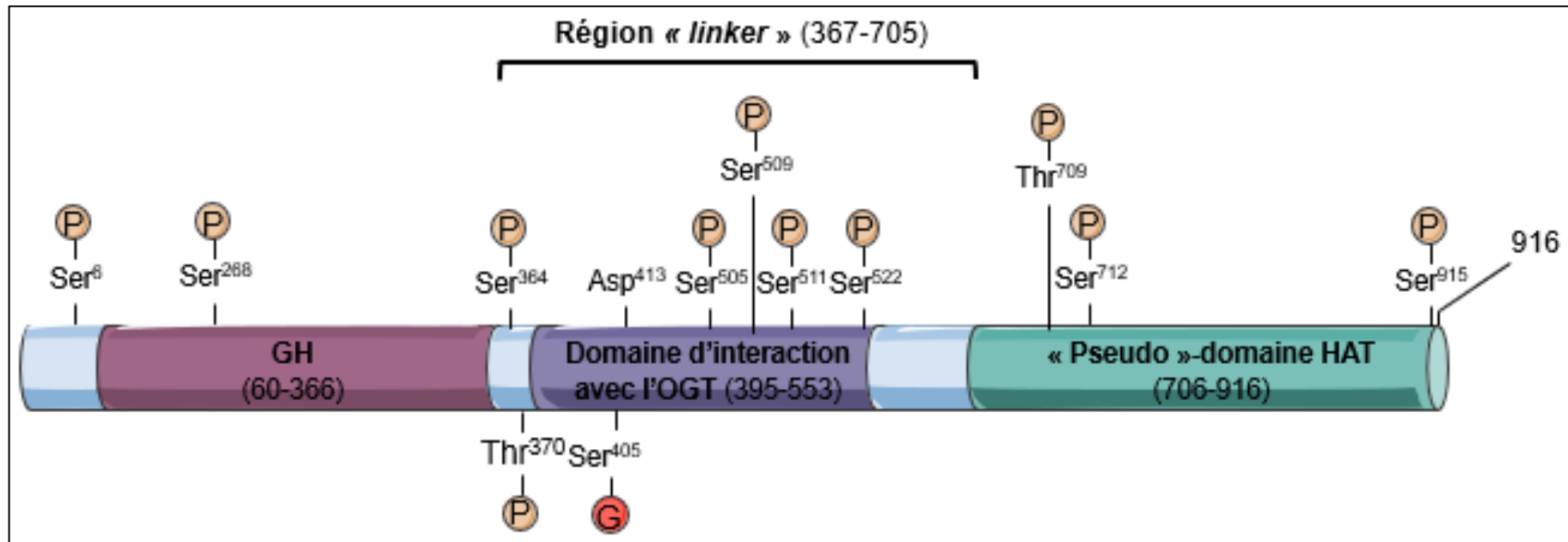


Figure 37 : Modifications post-traductionnelles de l'OGA. L'OGA est notamment la cible de la *O*-GlcNAcylation et de la phosphorylation.

Asp : Aspartate ; **G** : GlcNAc ; **GH** : Glycoside Hydrolase ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **HAT** : Histone AcétylTransférase ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétylGlucosaminylation ; **OGA** : β-O-GlcNAcAse ; **OGT** : β-O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **Ser** : Sérine ; **Thr** : Thréonine.

Via ces différents métabolismes, l'apport nutritionnel peut moduler la quantité d'UDP-GlcNAc synthétisé dans la voie HBP. Cette caractéristique confère alors à l'UDP-GlcNAc un statut de senseur nutritionnel cellulaire. Il est estimé qu'environ 2 à 3% du glucose entrant dans la cellule par les transporteurs membranaires **GLUT** (**GLU**cose **T**ransporter) emprunte cette voie (Marshall et al., 1991b). La production d'UDP-GlcNAc à partir de Glc suit un ensemble de réactions enzymatiques successives, certaines communes à la glycolyse et d'autres spécifiques à la voie HBP (Figure 38).

4.2. Régulation de la voie HBP

La voie HBP peut être régulée par le flux en substrats mais également par l'activité de certaines de ses enzymes et notamment de la GFAT, la GNPAT et PGM3.

4.2.1. Par le flux en substrats

Les flux de Glc, de Gln et de GlcNH₂ régulent la concentration d'UDP-GlcNAc (Marshall et al., 2004). Ainsi, l'addition de ces substrats de la voie HBP dans le milieu de culture augmente le niveau de O-GlcNAcylation globale (Taylor et al., 2008; Laczy et al., 2011) (Figure 38). D'autre part, les fortes concentrations extracellulaires en GlcNH₂ entraîne sa phosphorylation en GlcNH₂-6-P dans la voie HBP, une séquestration du phosphate cellulaire et une déplétion rapide en ATP qui pourrait être létale pour la cellule (Marshall et al., 2004).

4.2.2. Par les enzymes de la voie HBP

La GFAT (EC :2.6.1.16) est l'enzyme limitante de la voie HBP (Marshall et al., 1991a) (Figure 38). En plus de catalyser une réaction irréversible, elle subit un rétrocontrôle négatif par l'UDP-GlcNAc et potentiellement par la GlcN-6-P afin d'éviter l'augmentation trop importante de la concentration intracellulaire en nucléotide-sucre (Kornfeld, 1967; Broschat et al., 2002). Chez les mammifères, la GFAT consiste en une enzyme homotétramérique cytoplasmique constituée de deux domaines : un domaine glutaminase N-ter de liaison à la Gln et un domaine isomérase C-ter de liaison au Fru-6-P reliés par une région « linker » flexible. Deux gènes distincts **GFPT1** (*Glutamine :Fructose-6-Phosphate amidoTransférase 1*) et **GFPT2** localisés sur les chromosomes 2 et 5 (en position 2p13.3 et 5q34-q35) codent les isoformes GFAT1 et GFAT2 respectivement. Ces dernières sont très conservées (56,9% et 57,3% d'identité de séquence entre l'Homme et *Caenorhabditis elegans* pour la GFAT1 et la GFAT2 respectivement). Chez l'Homme, ces deux enzymes présentent 77,3% d'homologie, ont des activités enzymatiques et des caractéristiques biochimiques similaires mais diffèrent par leur répartition tissulaire. En effet, la GFAT1 est plus exprimée dans le pancréas, le placenta, les testicules et la prostate alors que la GFAT2 est surtout exprimée dans le cœur, le placenta et le système nerveux central (Oki et al., 1999).

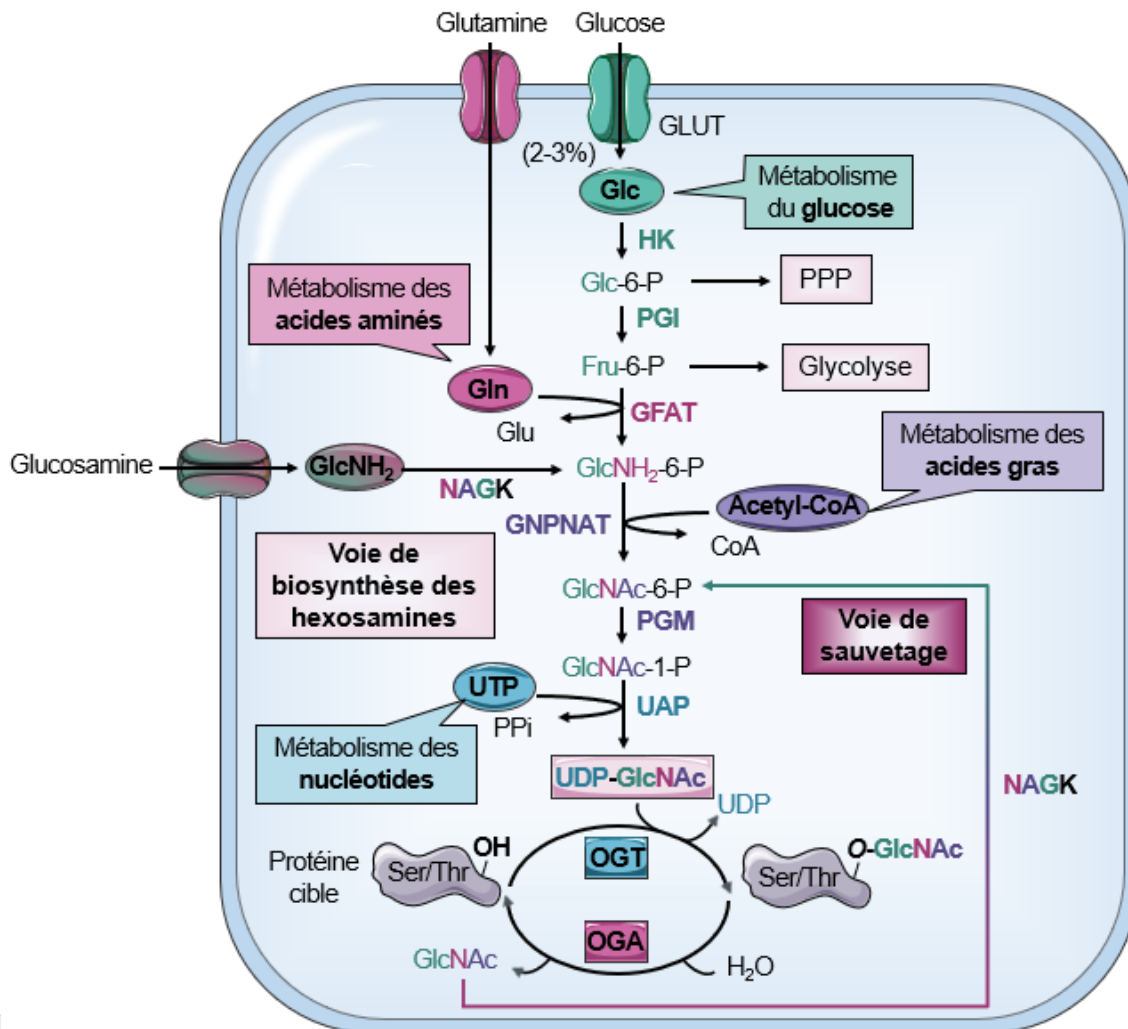


Figure 38 : Voie de biosynthèse *de novo* et de sauvetage des hexosamines. HK phosphoryle le Glc pour produire du Glc-6-P qui est alors isomérisé en Fru-6-P par la PGI. Ces deux réactions sont communes aux voies HBP et de la glycolyse. Dans la voie HBP, la GFAT catalyse le transfert irréversible du groupement amine de la Gln sur le Fru-6-P pour former la GlcNH₂-6-P. La GlcNH₂-6-P peut également être formée à partir de la GlcNH₂ par la NAGK. La GlcNH₂-6-P est alors acétylée par GNPAT à partir de l'acétyl-CoA pour former du GlcNAc-6-P, converti ensuite en GlcNAc-1-P par PGM. Enfin, UAP active le GlcNAc-1-P en UDP-GlcNAc en utilisant l'UTP. Une voie de sauvetage faisant intervenir la NAGK permet de synthétiser l'UDP-GlcNAc en circuit fermé. La NAGK catalyse la phosphorylation du GlcNAc hydrolysé par l'OGA en GlcNAc-6-P qui est réinjecté dans la voie HBP.

CoA : Coenzyme A ; **Fru** : Fructose ; **GFAT** : Gln :Fru-6-P AmidoTransférase ; **Glc** : Glucose ; **GlcNH₂** : Glucosamine ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **Gln** : Glutamine ; **Glu** : Glutamate ; **GLUT** : GLUCOSE Transporter ; **GNPNAT** : GlcN-6-P N-AcétylTransférase ; **HK** : HexoKinase ; **NAGK** : N-Acétyl-Glucosamine Kinase ; **OGA** : β-O-GlcNAcAse ; **OGT** : β-O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **PGI** : PhosphoGlucose Isomérase ; **PGM** : PhosphoGlucose Mutase ; **PPi** : PyroPhosphate inorganique ; **PPP** : Pentose Phosphate Pathway ; **Ser** : Sérine ; **Thr** : Thréonine ; **UAP** : UDP-N-Acétylglucosamine Pyrophosphorylase ; **UDP** : Uridine DiPhosphate ; **UTP** : Uridine TriPhosphate.

L'activité enzymatique de la GFAT est régulée en fonction des signaux nutritionnels, énergétiques et mitogéniques. D'une part, la déprivation en glucose induit la phosphorylation de GFAT1 (Ser²⁴³) par l'AMPK et par conséquent son inhibition (Eguchi et al., 2009). D'autre part, en réponse à l'AMPc (AMP cyclique), PKA phosphoryle la Ser²⁰⁵ de GFAT1 et diminue son activité alors qu'elle augmente celle de GFAT2 (Chang et al., 2000; Hu et al., 2004). Ainsi, quelle que soit la concentration en AMPc, une synthèse minimale d'UDP-GlcNAc serait maintenue par l'une ou l'autre des isoformes de GFAT. Le *KO* de *GFPT1* entraîne la léthalité embryonnaire chez la souris. En revanche, son *KO* conditionnel dans les tissus musculaires dérégule la transmission neuromusculaire (Issop et al., 2018). Ce défaut est retrouvé chez les patients atteints de **SMC** (Syndromes **M**yasthéniques **C**ongénitaux) présentant une mutation de *GFPT1* (Senderek et al., 2011). D'autre part, la présence de SNP au niveau du 3'-UTR (rs7725) ou de l'exon 14 (substitution Ile⁴⁷¹Val, rs2303007) est associée au DT2 dans la population Caucasienne (Zhang et al., 2004).

La GNPAT (EC :2.3.1.4) est une autre enzyme clé de la voie HBP (**Figure 38**). Chez l'Homme, elle est codée par le gène *GNPNAT* localisé sur le chromosome 14 (en position 14q22.1). Il s'agit d'un homodimère associé à la membrane plasmique et, constitué d'un domaine N-ter de liaison à la GlcN-6-P et d'un domaine C-ter de liaison à l'acétyl-CoA (Boehmelt, Fialka, et al., 2000). Le *KO* de *GNPNAT* dans les cellules ES murines entraîne la mort de l'embryon à 7,5 jours de gestation. Les cellules présentent alors une diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation globale et, une perturbation de la prolifération et de l'adhésion cellulaires (Boehmelt, Wakeham, et al., 2000).

Enfin, la PGM3 (EC :5.4.2.3) (**Figure 38**) est codée par le gène *PGM3* localisé sur le chromosome 6 (en position 6q14.1-q14.2). Elle est formée de quatre domaines : un domaine catalytique et trois domaines de liaison au **Mg²⁺** (**Magnésium II**), au GlcNAc-6-P et au phosphate respectivement. Le *KO* de *PGM3* entraîne la diminution du niveau d'UDP-GlcNAc et la mort des embryons murins entre 3,5 et 6,5 jours. Le *knock-down* de *PGM3* conduit, quant à lui, à des souris viables mais avec des défauts hématologiques et de fertilité (Greig et al., 2007).

5. Méthodes d'étude des protéines *O*-GlcNAcylées

5.1. Régulation du niveau de *O*-GlcNAcylation globale

La compréhension des fonctions biologiques de la *O*-GlcNAcylation sur les protéines cibles et son impact sur les mécanismes cellulaires fondamentaux a nécessité le développement d'outils de régulation des enzymes de la voie HBP, de l'OGT et de l'OGA. Ainsi, l'inactivation des enzymes de la voie HBP ou de l'OGT diminue le niveau de *O*-GlcNAcylation globale alors que celle de l'OGA l'augmente. A l'échelle de l'organisme, les *KO* constitutifs de l'OGT, l'OGA, *GFPT1*, *GNPNAT* et *PGM3* sont létaux. En revanche, il est possible de réaliser des *KO* tissus spécifiques (O'Donnell et al., 2004; Stichelen et al., 2017; Issop et al., 2018). Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs permet d'étudier le rôle de la *O*-GlcNAcylation sans affecter le niveau d'expression des enzymes et en conservant leurs activités non catalytiques.

5.1.1. Inhibiteurs de l'OGT

5.1.1.1. Composés naturels

Comme décrit précédemment, l'OGT est inhibée par l'UDP-GlcNAc ainsi que par l'UDP/UTP (concentrations inhibitrices médianes (**IC₅₀**, half maximal Inhibitory Concentration) respectivement de 0,18 μ M et 0,20 μ M). L'UDP-GalNAc, l'UMP et le **NaCl** (**Chlorure de sodium**)/**KCl** (**Chlorure de potassium**) sont de moins puissants inhibiteurs (**IC₅₀** de 16 μ M, 19 μ M et 50 mM) (Haltiwanger et al., 1992; Marshall et al., 2003). Néanmoins, le fait que ces composés soient incapables de pénétrer dans la cellule et qu'ils soient substrats d'une multitude d'enzymes a incité au développement d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de l'OGT.

5.1.1.2. Alloxane

Historiquement, l'alloxane (2, 4, 5, 6,-tétraoxyypyrimidine) (**Figure 39**) a été le premier inhibiteur pharmacologique de l'OGT (**IC₅₀** de 18 μ M) (Konrad et al., 2002; Dorfmüller et al., 2011). Il s'agit d'un analogue de l'uracile utilisé comme agent diabétogène. Il est incorporé dans la cellule par un transporteur GLUT (Elsner et al., 2002) et il est suggéré qu'il entre directement en compétition avec l'UDP-GlcNAc au niveau du domaine CDII de l'OGT (Dorfmüller et al., 2011). Néanmoins, l'alloxane est une molécule chimiquement instable (demi-vie de 1,5 minutes à pH 7,4 et à 37°C) (Lenzen and Munday, 1991) qui présente une faible spécificité puisqu'elle inhibe également la **GK** (**Glucokinase**) et l'OGA (Lenzen et al., 1987; Lee et al., 2006). De plus, il induit une forte toxicité cellulaire notamment par la génération de ROS (Zhang et al., 1992). Ces observations ont limité son utilisation et ont incité au développement d'autres inhibiteurs pharmacologiques basés sur la structure de l'UDP-GlcNAc.

5.1.1.3. Mimétiques de l'Uridine DiPhosphate (UDP)-GlcNAc

UDP-1-désoxy-1-Thio-GlcNAc (UDP-S-GlcNAc)

Le remplacement de l'atome d'oxygène endocyclique glycosidique de l'UDP-GlcNAc par un atome de soufre (UDP-S-GlcNAc) (**Figure 39**) lui confère une résistance à l'hydrolyse enzymatique et chimique. Malgré une efficacité démontrée *in vitro* (**IC₅₀** de 93 μ M) (Dorfmüller et al., 2011), l'activité de l'UDP-S-GlcNAc est limitée *in cellulo* du fait de sa faible incorporation cellulaire. Afin d'assurer la perméabilité cellulaire, l'inhibiteur doit posséder une polarité et une charge minimales.

1,3,4,6-tétra-O-acétyl-2-désoxy-5-Thio-GlcNAc (Ac₄-5S-GlcNAc)

Ainsi, Gloster et collaborateurs (2011) ont synthétisé l'**Ac₄-5S-GlcNAc** (1,3,4,6-tétra-O-acétyl-2-désoxy-5-Thio-GlcNAc) (**Figure 39**) (**IC₅₀** de 5 μ M *in cellulo*) qui pénètre plus facilement dans la cellule car plus lipophile. L'Ac₄-5S-GlcNAc est ensuite désacétylé par des estérases, puis phosphorylé en 5S-GlcNAc-6P par la NAGK dans la voie de sauvetage HBP. Il sera ensuite isomérisé en 5S-GlcNAc-1P puis activé afin de donner l'UDP-5S-GlcNAc (Gloster et al., 2011).

Or, l'UDP-5S-GlcNAc est utilisé 3 200 fois moins rapidement par l'OGT que son analogue UDP-GlcNAc (Lazarus et al., 2012) et l'OGA hydrolyse le résidu 5S-GlcNAc 5 fois moins efficacement que le GlcNAc (Gloster et al., 2011). Ces résultats suggèrent que l'effet inhibiteur de l'UDP-5S-GlcNAc provient du fait qu'il encombre le site catalytique de l'OGT et le rend inaccessible au substrat naturel UDP-GlcNAc. Il est cependant à noter que ces molécules, tout comme le **BADGP** (Benzyl-2-Acétamido-2-Désoxy- α -D-GalactoPyranoside), peuvent également inhiber d'autres GT participant aux glycosylations complexes et utilisant l'UDP-GlcNAc ou son épimère UDP-GalNAc comme nucléotide-sucre donneur (Hennebicq-Reig et al., 1998; Dorfmüller et al., 2011). A l'heure actuelle, l'Ac₄-5S-GlcNAc demeure l'inhibiteur pharmacologique de l'OGT le plus utilisé malgré la découverte récente d'autres petites molécules inhibitrices.

5.1.1.4. Petites molécules inhibitrices

Dérivé de BenZoXazolinone (BZX)

Afin d'identifier des petites molécules inhibitrices de l'OGT, l'équipe de Walker a utilisé la méthode de criblage à haut débit (HTS, High-Throughput Screening) par polarisation de fluorescence de 64 000 composés. Elle a notamment identifié un dérivé de **BZX** (BenZoXazolinone, 4-méthoxyphényl 6-acétyl-2-oxobenzo[d]oxazole-3(2H)-carboxylate, IC₅₀ de 10 μ M) (Figure 39) (Gross et al., 2005). Cet isostère disphosphate est un inhibiteur covalent irréversible de l'OGT dont l'activité a été observée sur l'ovocyte de xénope (Dehennaut et al., 2007) ainsi que sur la lignée mammaire MCF-10A (Caldwell et al., 2010).

ES1 et UDP-ES1

Worth et collaborateurs (2019) ont très récemment synthétisé un autre inhibiteur covalent, ES1 (1,3,4,6-tétra-O-acétyl-2-[[[(2E)-1-oxo-4-chloro-2-butèn-1-yl]amino]-2-désoxy-5-thio- α -D-glucose) (Figure 39), qui traverse la membrane plasmique et interagit spécifiquement avec le résidu Cys⁹¹⁷ non conservé de l'OGT. Ainsi, il a été montré qu'il ne modifie pas le profil des O-glycanes et N-glycanes des cellules cancéreuses mammaires MCF-7. De plus, cette équipe a également synthétisé l'analogue UDP-ES1 (Figure 39) qui inhibe spécifiquement l'OGT *in vitro* avec une efficacité K_{inact}/K_i de 0,06 μ M⁻¹ min⁻¹ (Worth et al., 2019).

OGT with a Small Molecular Inhibitor 1 (OSMI-1)

La méthode HTS a également permis d'identifier **OSMI-1** (OGT with a Small Molecule Inhibitor 1, α R-[[[(1,2-dihydro-2-oxo-6-quinoliny]sulfonyl]amino]-N-(2-furanylméthyl)-2-méthoxy-N-(2-thiénylméthyl)-benzèneacétamide, IC₅₀ de 2,7 μ M) (Figure 439). Cette petite molécule inhibitrice de la classe des **Q6S** (Quinolinone-6-Sulfonamides) n'altère pas les glycosylations membranaires complexes. En revanche, malgré que la membrane plasmique lui soit perméable, elle est relativement large, a une faible solubilité aqueuse et induirait une toxicité limitant son activité *in cellulo* (Ortiz-Meoz et al., 2015).

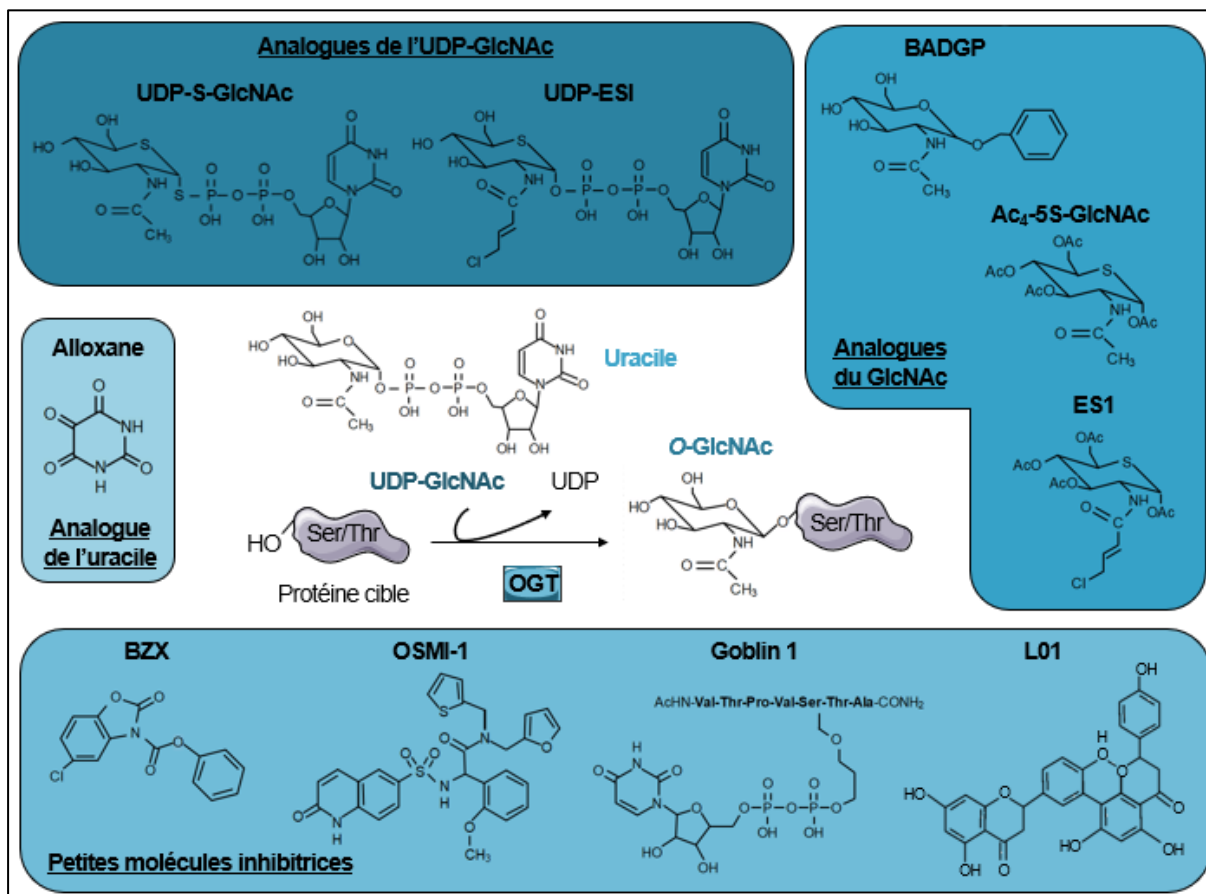


Figure 39 : Inhibiteurs de l'OGT. Les inhibiteurs de l'OGT regroupent des analogues de son substrat (UDP-GlcNAc) et de ses précurseurs (uracile et GlcNAc) ou encore des petites molécules inhibitrices.

Ac₄-5S-GlcNAc : 1,3,4,6-tétra-O-acétyl-2-désoxy-5S-GlcNAc ; **Ala** : Alanine ; **BADGP** : Benzyl-2-Acétamido-2-Désoxy- α -D-GalactoPyranoside ; **BZX** : BenZoXazolinone ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **Goblin 1** : OGT' bisubstrate-linked inhibitor 1 ; **OGT** : β -O-GlcNAcTransférase ; **OSMI-1** : OGT with a Small Molecule Inhibitor 1 ; **Pro** : Proline ; **S-GlcNAc** : Thio-GlcNAc ; **Ser** : Sérine ; **Thr** : Thréonine ; **UDP** : Uridine DiPhosphate ; **Val** : Valine.

L01

Très récemment et à partir d'un criblage virtuel basé sur la structure d'environ 61 000 composés, Liu et collaborateurs (2017) ont identifié la première petite molécule inhibitrice naturelle de l'OGT, L01 (**Figure 39**) (IC₅₀ de 21 µM), extrait de la noix de cajou produit de l'anacardier (*Semecarpus anacardium*). Il s'agit d'un dérivé amentoflavone qui se lie au domaine CDII de l'OGT et dont l'activité *in cellulo* et *in vivo* n'affecte pas les glycanes de surface et ne produit qu'une faible toxicité (Liu et al., 2017).

Inhibiteurs d'OGT bi-substrats (OGT's bisubstrate-linked inhibitor, goblin)

Enfin, des inhibiteurs d'OGT bi-substrats (**goblin**, OGT' bisubstrate-linked inhibitor) goblin 1 et 2 (**Figure 39**) (IC₅₀ de 18 µM et 40 µM respectivement) ont été synthétisés en couplant un peptide accepteur Val-Thr-Pro-Val-Ser-Thr-Ala à l'UDP avec un petit espaceur qui remplace le motif GlcNAc du substrat donneur. La limitation actuelle de ces composés est le manque de perméabilité cellulaire (Borodkin et al., 2014).

5.1.2. Inhibiteurs de l'OGA

5.1.2.1. PUGNAc

Le PUGNAc (O-(2-acétamido-2-désoxy-D-glucopyranosylidène)amino-N-phénylcarbamate) (**Figure 40**) est historiquement le premier inhibiteur décrit de l'OGA (Dong and Hart, 1994). Il s'agit d'un inhibiteur général des β-N-acétylglucosaminidases comprenant l'OGA mais également les HexA et HexB lysosomales (Beer et al., 1990) (IC₅₀ de 0,05 µM et ratio de sélectivité HexA/B/OGA de 1 *in vitro*) (Dorfmueller and van Aalten, 2010). L'inhibition des hexosaminidases par le PUGNAc altère le catabolisme des N-glycoprotéines et provoque l'accumulation d'oligosaccharides libres dans les cellules ovariennes de hamster CHO (Mehdy et al., 2012). En plus de manquer de spécificité, le PUGNAc ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (Zou et al., 2007) et ne peut atteindre le cerveau où l'OGA est la plus exprimée (Gao et al., 2001).

5.1.2.2. STreptoZotocine (STZ)

La **STZ** (STreptoZotocine, 2-désoxy-2-[[[(méthylnitrosamino)carbonyl]amino]-D-glucopyranose) (**Figure 40**) est une molécule méthylnitrosourée analogue de la GlcNAc utilisée comme agent diabétogène (Roos et al., 1998). Dans les cellules β pancréatiques, la STZ pénétrerait *via* un transporteur GLUT, produirait du NO et provoquerait des dommages à l'ADN. Elle induirait ainsi leur mort cellulaire par apoptose et un DT1 (Bennett and Pegg, 1981; Elsner et al., 2000). La STZ est, par ailleurs, un inhibiteur modeste de l'OGA (IC₅₀ de 1 500 µM et ratio de sélectivité HexA/B/OGA de 30) (Dorfmueller and van Aalten, 2010). L'OGA lie la STZ dans son site actif et la convertit en un composé, énergétiquement plus stable, analogue de l'état de transition de son ligand naturel énergétiquement plus stable. Ainsi, la STZ agit en encombrant le site actif de l'OGA, de ce fait l'hydrolyse des résidus O-GlcNAc est altérée (C. Toleman et al., 2006).

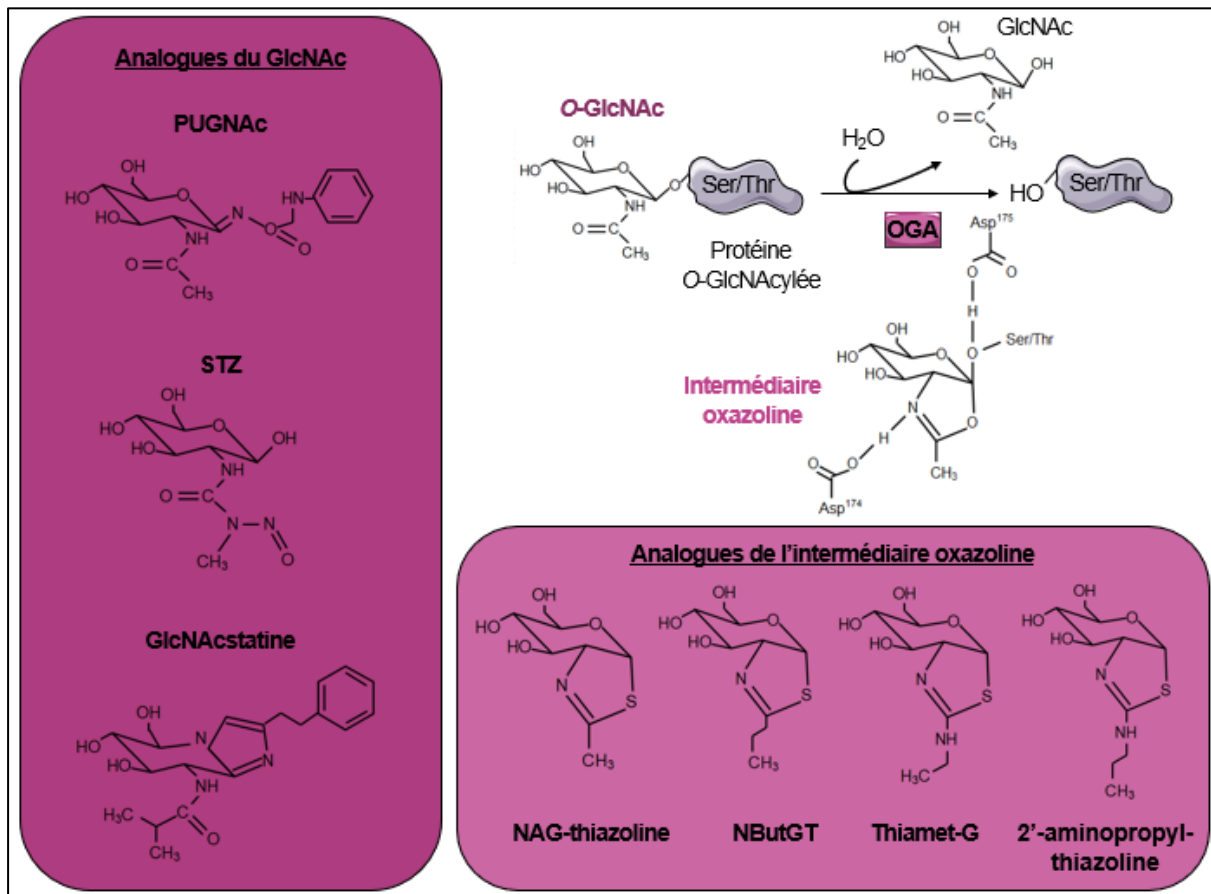


Figure 40 : Inhibiteurs de l'OGA. Les inhibiteurs de l'OGA regroupent des analogues de son substrat (GlcNAc) et de l'intermédiaire oxazoline.

Asp : Aspartate ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **NAG-thiazoline** : N-Acétyle-Glucosamine-thiazoline ; **OGA** : β -O-GlcNAcAse ; **Ser** : Sérine ; **STZ** : STreptoZotocine ; **Thr** : Thréonine.

5.1.2.3. Inhibiteurs thiazolines

N-Acétyl-Glucosamine-thiazoline (NAG-thiazoline) et NButGT

La **NAG-thiazoline** (**N-Acétyl-Glucosamine-thiazoline** ; 1,2-didésoxy-2'-méthyl- α -D-glucopyranoso-[2,1-*d*]- Δ 2'-thiazoline) (Knapp et al., 1996) et son dérivé NButGT (1,2-didésoxy-2'-propyl- α -D-glucopyranoso-[2,1-*d*]- Δ 2'-thiazoline) (Macauley et al., 2005) (**Figure 40**) sont d'autres analogues de l'intermédiaire bicyclique de type oxazoline qui se lie au site actif de l'OGA (IC_{50} de 0,07 μ M et 0,23 μ M et, ratio de sélectivité HexA/B/OGA de 1 et 1 500 respectivement) (Macauley et al., 2005). Bien que le NButGT ait une bonne sélectivité, sa stabilité chimique en solution aqueuse est limitée (Yuzwa et al., 2008).

Thiamet-G

Yuzwa et collaborateurs (2008) se sont inspirés de ces inhibiteurs pour synthétiser le dérivé aminothiazoline **Thiamet-G** (3*aR*,5*R*,6*R*,7*R*,7*aR*)-2-(éthylamino)-3*a*,6,7,7*a*-tétrahydro-5-(hydroxyméthyl)-5H-pyrano[3,2-*d*]thiazole-6,7-diol) (**Figure 40**), d' IC_{50} de 0,02 μ M et de ratio de sélectivité HexA/B/OGA de 37 000. Comparé au NButGT, la basicité du groupement aminothiazoline du Thiamet-G augmente sa stabilité chimique au delà de 9 jours en solution aqueuse et à température ambiante. Ainsi, le Thiamet-G est l'inhibiteur de l'OGA le plus utilisé *in vitro* mais également *in vivo* puisqu'il présente une excellente sélectivité, est biodisponible oralement et est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (Yuzwa et al., 2008).

Dérivé 2'-aminopropylthiazoline

Plus récemment, Cekic et collaborateurs (2016) ont synthétisé un dérivé 2'-aminopropylthiazoline (**Figure 40**) qui représente l'inhibiteur de l'OGA le plus sélectif synthétisé à ce jour (IC_{50} de 0,002 μ M et ratio de sélectivité HexB/OGA de 1 850 000) (Cekic et al., 2016).

5.1.2.4. GlcNAcstatines

En parallèle, les GlcNAcstatines sont une classe d'inhibiteurs d'OGA découverte et optimisée par Dorfmüller et collaborateurs (2006) (Dorfmüller et al., 2006). Elles sont des dérivés gluco-configurés de la nagstatine (tétrahydroimidazol[1,2- α]pyridine), une molécule naturelle isolée d'un bouillon de fermentation de *Streptomyces amakuscaensis* et qui possède une activité inhibitrice des hexosaminidases lysosomales (Aoyama et al., 1992). Ainsi, la GlcNAcstatine G ((*E*)-*N*-((2*S*,3*S*,4*aR*,5*S*,10*R*,10*aR*)-2,3-diméthoxy-2,3-diméthyl-7-phenéthyl-10-(((triiisopropylsilyl)oxy)méthyl)-2,3,4*a*,5,10,10*a*-hexahydro-[1,4]dioxino[2,3-*d*]imidazo[1,2-*a*]pyridine-5-yl)penta-2,4-diénamide) (**Figure 40**) est un puissant inhibiteur de l'OGA (IC_{50} de 0,004 μ M et ratio de sélectivité HexA/B/OGA de 900 000). Néanmoins, malgré qu'elle soit diffuse à travers la membrane plasmique, la GlcNAcstatine G possède une faible solubilité aqueuse et sa synthèse est compliquée (Borodkin and van Aalten, 2010; Dorfmüller et al., 2010).

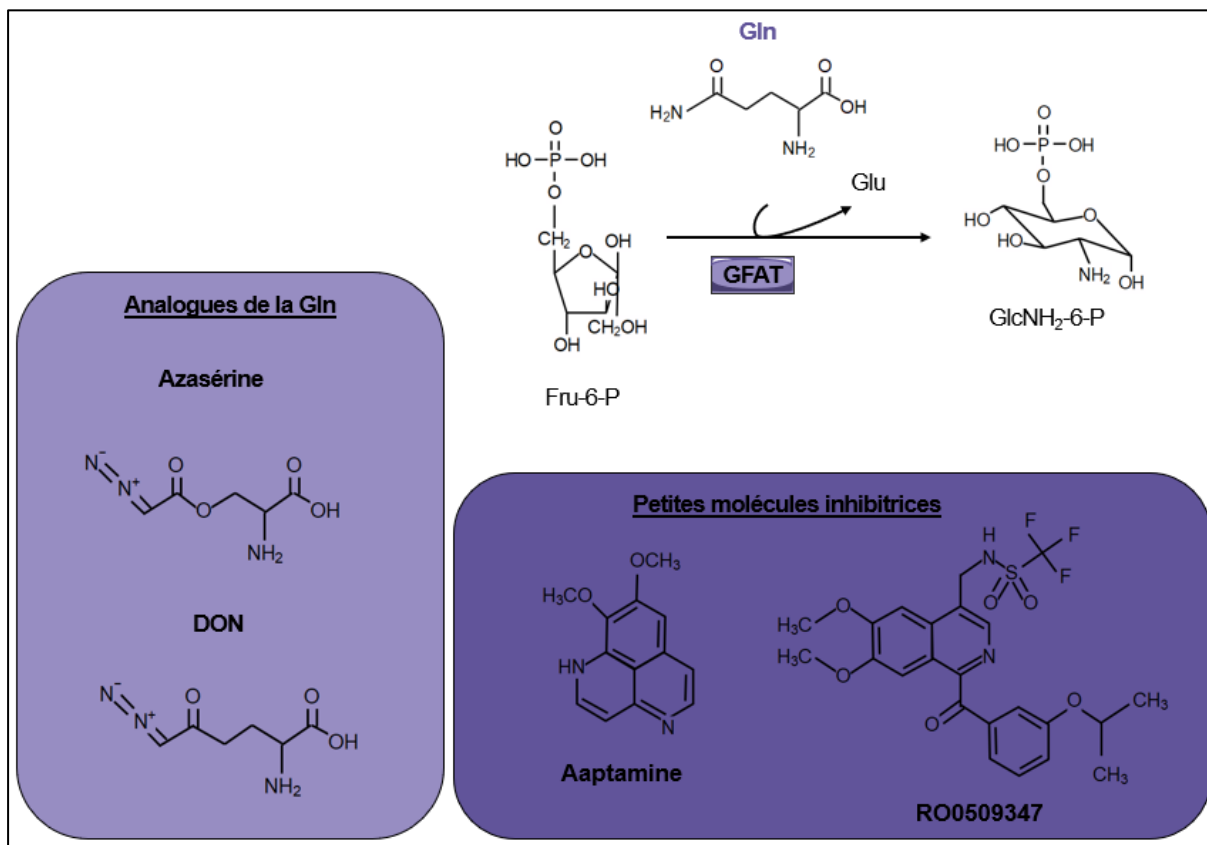


Figure 41 : Inhibiteurs de la Glutamine : Fructose-6-phosphate AmidoTransférase (GFAT). Les inhibiteurs de la GFAT regroupent des analogues de son substrat (Gln) et des petites molécules inhibitrices.

Azasérine : O-(2-diazoacétyl)-L-sérine ; **DON** : 6-Diazo-5-OxoNorleucine ; **Fru-6-P** : Fructose-6-Phosphate ; **GFAT** : Gln:Fru-6-P AmidoTransférase ; **GlcN-6-P** : Glucosamine-6-Phosphate ; **Gln** : Glutamine ; **Glu** : Glutamate.

5.1.3. Inhibiteurs de la Glutamine : Fructose-6-phosphate

AmidoTransférase (GFAT)

La GFAT est l'enzyme clé de la voie HBP. C'est l'enzyme limitante dans la synthèse du produit final de cette voie, l'UDP-GlcNAc, et par conséquent son activité se reflète très largement sur les niveaux de O-GlcNAcylation globale. Ainsi, deux analogues structuraux de la Gln, l'**azasérine** (O-(2-diazoacétyl)-L-sérine, IC₅₀ de 1,3 µM) (**Figure 42**) et le **DON** (6-Diazo-5-OxoNorleucine) (**Figure 41**), sont des inhibiteurs compétitifs et non métabolisables de la GFAT (Marshall et al., 1991b). Néanmoins, ils ne sont pas spécifiques de la GFAT car ils inhibent également l'ensemble des amidotransférases et affectent les voies de biosynthèse des acides nucléiques (Barclay et al., 1962; Miller-Patrick et al., 1993).

Au cours d'une analyse HTS, Bobzin et collaborateurs (2000) ont identifié le premier inhibiteur de la GFAT non dérivé d'un acide aminé et naturel, l'aaptamine (**Figure 41**) (IC₅₀ de 120 µM). Il s'agit d'un alcaloïde 1H-benzo[de][1,6]-naphtyridine extrait de l'éponge *Aaptos* sp. (Bobzin et al., 2000). Ultérieurement, Qian et collaborateurs (2011) ont synthétisé le composé RO0509347 (**Figure 41**) (IC₅₀ de 1 µM), un dérivé 1-arylcarbonyl-6,7-diméthoxyisoquinoline. C'est un inhibiteur réversible qui traverse la membrane plasmique et présente une faible clairance et une bonne biodisponibilité orale *in vivo* (Qian et al., 2011).

5.2. Enrichissement, détection et identification des protéines O-GlcNAcylées

Initialement, la O-GlcNAcylation a été mise en évidence à la surface des lymphocytes murins (Torres and Hart, 1984). C'est l'utilisation combinée de **GaIT** (**Galactosyl**Transférase) bovine imperméante et du nucléotide-sucré UDP-[³H]-Gal qui a permis de marquer les résidus GlcNAc terminaux de protéines membranaires. L'analyse des produits de β-élimination des glycanes ainsi marqués révélera l'existence de Galβ1,4GlcNAcitol, preuve de l'abondance de la O-GlcNAcylation dans ce modèle cellulaire. Des études complémentaires réalisées sur du foie de rat et publiées deux années plus tard démontreront que ce type de glycosylation est présent au sein même de la cellule et en particulier dans les fractions nucléaire et soluble (Holt and Hart, 1986). L'étude de cette MPT reste difficile du fait de son dynamisme, de sa sub-stœchiométrie et de sa labilité nécessitant le développement de nouveaux outils. L'utilisation d'anticorps, de lectines et de la chimie-click permet la détection et l'enrichissement des protéines O-GlcNAcylées, la spectrométrie de masse quant à elle permet la détection et l'identification des résidus O-GlcNAcylés.

5.2.1. Anticorps

Les anticorps RL2 et CTD110.6 sont les plus fréquemment utilisés pour l'enrichissement des protéines O-GlcNAcylées par **IP** (**Immuno**Précipitation) et leur détection par immunoblotting ou **IF** (**Immuno**Fluorescence) *in cellulo*. L'anticorps monoclonal RL2 a initialement été identifié pour

reconnaître le résidu *O*-GlcNAc et une partie peptidique adjacente (Holt, Snow, et al., 1987) des protéines du pore nucléaire de foie de rat (Snow et al., 1987). Bien que moins sensible, le RL2 présente moins de problèmes de spécificité que l'anticorps monoclonal CTD110.6. Le CTD110.6, développé beaucoup plus tard que le RL2, est dirigé quant à lui contre le motif *O*-GlcNAc du domaine **CTD (C-Ter Domain)** de la Pol II murine (Comer and Hart, 2001) (Figure 42). La fiabilité de l'anticorps CTD110.6 a été remise en doute. En effet, cet anticorps reconnaît également les épitopes *N*-GlcNAc β (1-4)GlcNAc induits par la déprivation en glucose (Isono, 2011; Reeves et al., 2014) ou encore les GlcNAc terminaux des glycoprotéines à la surface cellulaire (Tashima and Stanley, 2014). Il est donc préconisé de réaliser un pré-traitement à la **PNGase F (Peptide-N-Glycosidase F)** avant d'utiliser cet anticorps afin d'éliminer les *N*-glycanes. Enfin, plus récemment, les anticorps monoclonaux 18B10.C7, 9D1.E4 et IF5.D6 ont été générés (Teo et al., 2010). Pour ce faire, les auteurs ont combiné la technologie des hybridomes à la méthodologie immunogène à trois composants : un peptide *O*-GlcNAcylé dérivé de CK2 α , l'épitope du **CMH II (Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II)** murin et un agoniste du récepteur **TLR2 (Toll-Like Receptor 2)**. Ces anticorps ont permis l'identification de plus de 200 nouvelles protéines *O*-GlcNAcylées de mammifères mais restent peu utilisés (Teo et al., 2010) (Figure 42).

5.2.2. Lectines

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines essentiellement d'origine végétale capables de reconnaître des glycanes plus ou moins sélectivement. Les lectines de germe de blé (*Triticum vulgare*) (**WGA, Wheat Germ Agglutinin**), de *Griffonia simplicifolia* (**GSL-II, Griffonia Simplicifolia Lectin-II**), d'*Agrocybe aegerita* (**AAL-2, Agrocybe Aegerita Lectin 2**) et de *Psathyrella velutina* (**PVL, Psathyrella Velutina Lectin**) ou encore les lectines synthétiques sont utilisées pour enrichir les protéines *O*-GlcNAcylées par chromatographie d'affinité, ou pour les détecter à la manière d'un anticorps en immunoblotting ou *in cellulo* par IF (Figure 42).

Historiquement, le couplage de la WGA au **FITC (Fluorescein IsoThioCyanate)** a été la première méthode utilisée pour localiser par fluorescence les protéines *O*-GlcNAcylées des chromosomes polytènes de glandes salivaires de drosophile (Kelly and Hart, 1989). La WGA reconnaît les résidus β -GlcNAc internes ou terminaux non réducteurs mais également les acides sialiques, son utilisation nécessite de ce fait quelques précautions. Ainsi, pour l'étude des protéines *O*-GlcNAcylées, il est préférable d'utiliser la forme succinylée de la WGA (**sWGA, succinyl-WGA**) qui évite la reconnaissance des acides sialiques par répulsion électrostatiques des charges négatives (Monsigny et al., 1979) (Figure 42).

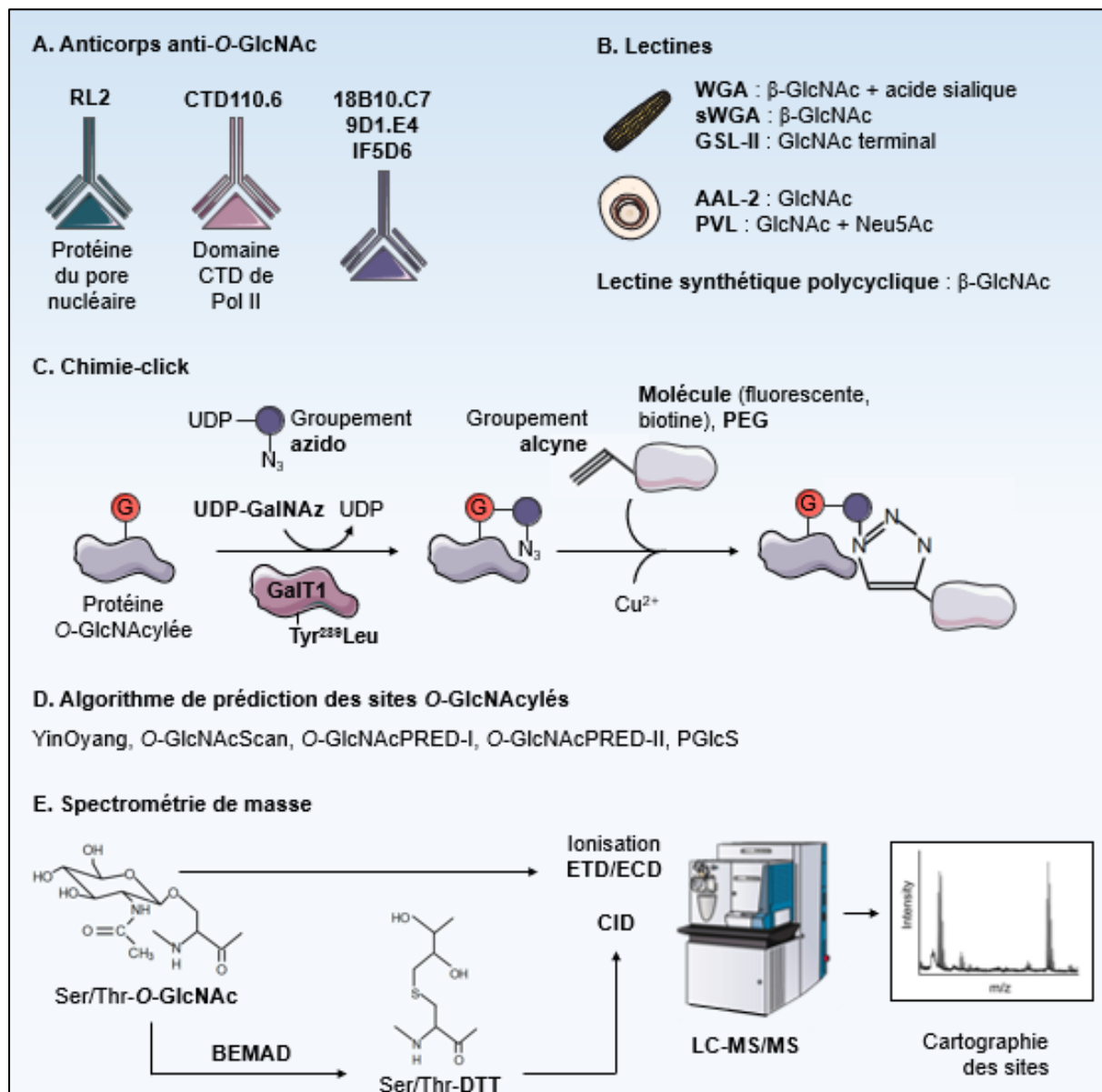


Figure 42 : Techniques d'enrichissement, de détection et d'identification des protéines O-GlcNAcylées. Les anticorps, les lectines et la chimie-click permettent d'enrichir les protéines O-GlcNAcylées par IP ou chromatographie d'affinité et de les détecter par immunoblotting ou IF. Les sites O-GlcNAcylés peuvent être prédits par différents algorithmes et identifiés par spectrométrie de masse.

AAL-2 : *Agrocybe Aegerita* Lectin 2 ; **BEMAD** : β -Elimination followed by Michael Addition of DTT ; **LC-MS/MS** : Liquid Chromatography tandem-Mass Spectrometry ; **CID** : Collision Induced Dissociation ; **CTD** : Carboxy-Terminal Domain ; **DTT** : DiThioThrétol ; **ECD** : Electron Capture Dissociation ; **ETD** : Electron Transfer Dissociation ; **G** : GlcNAc ; **GalNAz** : N-azidoAcétylGalactosamine ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **GSL-II** : *Griffonia Simplicifolia* Lectin II ; **IF** : ImmunoFluorescence ; **IP** : ImmunoPrécipitation ; **Leu** : Leucine ; **O-GlcNAcPRED** ; **PEG** : PolyEthylène Glycol ; **PGlcS** : Prediction of O-GlcNAcylated Sites ; **PVL** : *Psathyrella Velutina* Lectin ; **Ser** : Sérine ; **sWGA** : succinyl-WGA ; **Thr** : Thréonine ; **Tyr** : Tyrosine ; **UDP** : Uridine DiPhosphate ; **WGA** : Wheat Germ Agglutinin.

La lectine végétale GSL-II reconnaît les résidus GlcNAc terminaux non réducteurs de manière **Ca²⁺ (Calcium (II))**-dépendante (Jiang et al., 2012). La lectine fongique AAL-2 reconnaît les résidus α -GlcNAc et β -GlcNAc internes ou terminaux non réducteurs et posséderait une affinité plus importante pour ces résidus que la WGA ou la GSL-II (Jiang et al., 2012). La PVL est une autre lectine fongique qui lie également les résidus GlcNAc internes ou terminaux non réducteurs et le **Neu5Ac** (acide *N*-AcétylNeuraminique). Elle possède une spécificité et une structure similaire à l'AAL-2 avec 6 sites de liaison aux glycanes (Cioci et al., 2006). De manière intéressante, la lectine PVL recombinante (**rPVL**, recombinant **PVL**) présente une affinité plus forte pour le résidu GlcNAc que pour le Neu5Ac (Machon et al., 2017) (**Figure 42**). Enfin, des lectines synthétiques polycycliques ont été récemment synthétisées à partir de l'association d'un pyrène tétramine et d'un espaceur de type isophtaloyle et, présentent une affinité 25 fois plus importante pour le motif β -GlcNAc que la WGA (Rios et al., 2016) (**Figure 42**).

5.2.3. Chimie-click

La chimie-click fait intervenir l'enzyme GalT1 mutée par substitution Tyr²⁸⁹Leu (Ramakrishnan and Qasba, 2002). Cette mutation lui confère la capacité de transférer un Gal modifié par le groupement non naturel azido **GalNAz** (**N**-azidoAcétylGalactosamine) à partir de l'UDP-GalNAz sur un résidu GlcNAc terminal. Ce transfert est suivi d'une réaction biorthogonale consistant à la cycloaddition chimique du groupement azido du GalNAz et du groupement alcyne porté par une biotine ou une molécule fluorescente. Cette réaction chimio-enzymatique spécifique permet donc l'enrichissement des protéines *O*-GlcNAcylées à partir d'un extrait protéique par chromatographie d'affinité ainsi que leur détection par immunoblotting. La chimie-click peut également être utilisée pour visualiser *in cellulo* les protéines glycosylées par traitement et incorporation métabolique d'**Ac₄GlcNAz** (**N**-azidoAcétylGlucosamine **peracétylée**). En effet, ce monosaccharide modifié pénètre dans la cellule puis est désacétylé dans le cytoplasme afin d'intégrer la voie de sauvetage de l'UDP-GlcNAc et former de l'UDP-GlcNAz (Vocadlo et al., 2003). Enfin, afin de déterminer la stœchiométrie de la *O*-GlcNAcylation, la chimie-click peut être suivie d'un marquage avec du **PEG** (**P**oly**E**thylène **G**lycol), une molécule soluble chimiquement inerte et de masse moléculaire définie de l'ordre du kDa. Ainsi, une unique molécule de PEG se fixe sur un résidu GlcNAc et l'augmentation subséquente de la masse moléculaire de la protéine *O*-GlcNAcylée est alors visible et quantifiable par la présence d'un shift moléculaire en immunoblotting (Rexach et al., 2010) (**Figure 42**).

5.2.4. Algorithmes de prédiction des sites *O*-GlcNAcylés

Il est également possible de prédire informatiquement les sites *O*-GlcNAcylés à l'aide d'algorithmes plus ou moins puissants notamment basés sur les séquences glycosylées déjà identifiées. A l'heure actuelle, ces algorithmes incluent YinOYang (Gupta and Brunak, 2002), *O*-GlcNAcScan (Wang et al., 2011), *O*-GlcNAcPRED-I et -II (Jia et al., 2013; Jia et al., 2018) ou encore **PGlcS** (**P**rediction of **O**-**G**lcNAcylated Sites) (Zhao et al., 2015) (**Figure 42**).

5.2.5. Spectrométrie de masse

La *O*-GlcNAcylation est une modification neutre sub-stœchiométrique de 203 Da dont la liaison glycosidique avec l'acide aminé Ser ou Thr présente une forte labilité chimique et enzymatique (Kim, 2011). Pour s'affranchir de ces limitations, il est préférable de coupler une des techniques d'enrichissement des protéines *O*-GlcNAcylées préalablement citées à la spectrométrie de masse de type LC-MS/MS (Chalkley and Burlingame, 2003). Cette technique permet d'identifier les protéines et les sites occupés par une **HexNAc** (N-AcetylHexosamine) de 203 Da (GlcNAc ou GalNAc) ; il sera donc nécessaire de confirmer la présence spécifique de *O*-GlcNAcylation par une méthode d'identification alternative. Par la suite, la mutation des sites *O*-GlcNAcylés permet de déterminer leur rôle sur les propriétés de la protéine cible et leur impact sur les mécanismes cellulaires (Figure 42).

En raison de la labilité de la liaison glycosidique, une technique d'ionisation douce telle que la dissociation par transfert (ETD, Electron Transfer Dissociation) ou capture d'électrons (ECD, Electron Capture Dissociation) est alors préférée à la dissociation induite par collision (CID, Collision Induced Dissociation). En effet, contrairement à la méthode conventionnelle CID, l'ETD et l'ECD induisent la fragmentation des protéines *O*-GlcNAcylées le long de l'axe peptidique en préservant la liaison glycosidique. Néanmoins, l'ETD présente une faible efficacité de fragmentation, ce qui limite l'efficacité d'identification des sites *O*-GlcNAcylés (Guthals and Bandeira, 2012) (Figure 42).

Il est possible d'utiliser la technique de **BEMAD** (β -Elimination followed by Michael Addition of DTT (DiThioThreitol)) afin de remplacer la liaison peptide-GlcNAc labile par une liaison peptide-DTT stable conservée au cours de l'ionisation CID (Wells, Vosseller, et al., 2002). La β -élimination libère les résidus *O*-liés de l'axe polypeptidique résultant en un groupement α,β -insaturé pouvant être lié par le DTT. Néanmoins, cette technique peut induire une dégradation du squelette peptidique et une perte de données de séquence (Hahne et al., 2013). De plus, d'autres MPT telles que la phosphorylation sont réactives au BEMAD, il est donc nécessaire de réaliser un traitement à la phosphatase alcaline (Figure 42).

6. Régulation des propriétés protéiques par *O*-GlcNAcylation

6.1. Dialogue entre *O*-GlcNAcylation et phosphorylation

La *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation sont deux MPT qui partagent de nombreux points communs. D'une part, elles modifient, de manière dynamique et réversible, le groupement hydroxyle des acides aminés Ser et Thr des protéines cibles cytoplasmiques, nucléaires et mitochondriales. D'autre part, elles dépendent du métabolisme cellulaire puisque la synthèse de leur substrat donneur, l'UDP-GlcNAc et l'ATP respectivement, reflète respectivement les états nutritionnel et énergétique. Il est ainsi considéré que la *O*-GlcNAcylation est l'équivalent « sucré » de la phosphorylation.

Les principales différences entre ces MPT sont que la *O*-GlcNAcylation est une modification non chargée et que sa dynamique est catalysée uniquement par l'OGT et l'OGA. Les mécanismes de phosphorylation apportent une charge anionique aux protéines cibles et sont catalysés par plus de 500 kinases et 150 phosphatases (Manning et al., 2002). De manière intéressante, l'ensemble des protéines *O*-GlcNAcylées identifiées à ce jour sont également phosphorylées et plusieurs études révèlent un dialogue complexe entre ces deux MPT (Figure 43).

Tout d'abord, plusieurs études montrent que ces deux MPT peuvent s'exclure mutuellement. En effet, la *O*-GlcNAcylation globale des protéines est diminuée en réponse à l'inhibition des phosphatases (Lefebvre et al., 1999; Wang et al., 2008) mais est augmentée en retour à l'inhibition des kinases PKA et PKC (Griffith and Schmitz, 1999). Réciproquement, la phosphorylation globale est diminuée par surexpression de l'OGT ou inhibition pharmacologique de l'OGA (Wang et al., 2008; Wang, Udeshi, Slawson, et al., 2010). Néanmoins, cette observation globale ne peut être généralisée à toutes les protéines ciblées par ces MPT. En effet, Wang et collaborateurs (2007) montrent dans les fibroblastes COS-7 que l'inhibition de la kinase GSK3- β augmente la *O*-GlcNAcylation de certaines protéines chaperonnes (Hsp90 β) ou du cytosquelette (vimentine) mais diminue celle de facteurs de transcription (HCF-1) ou des protéines interagissant avec l'ARN (hnRNP-C) (Z. Wang et al., 2007). De même, l'analyse du phosphoprotéome des cellules HeLa montre que la surexpression de l'OGT induit la diminution de plus de 50% de la phosphorylation sur 17% des sites analysés mais également son augmentation de plus de 200% sur 7% des sites (Wang, Udeshi, Slawson, et al., 2010). Ainsi, la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation ne sont pas toujours exclusives mais peuvent être également coopératives (Figure 43).

O-GlcNAcylation et phosphorylation peuvent entrer en compétition sur un même résidu Ser ou Thr de la protéine cible. C'est le cas, par exemple, de la Thr⁵⁸ de c-Myc (Chou et al., 1995), la Ser¹⁶ du récepteur aux œstrogènes β (ER β , Estrogen Receptor β) (Cheng and Hart, 2001), la Ser¹¹⁷⁷ d'eNOS (endothelial NO Synthase) (Federici et al., 2002), la Ser¹⁰ de l'histone H3 (Kaleem et al., 2008), la Ser¹⁰ de la Δ -lactoferrine (Hardivillé et al., 2010), la Ser⁴⁷³ de AKT (Kang et al., 2008), la Thr⁴¹ de la β -caténine (Olivier-Van Stichelen et al., 2014), les Ser², Ser⁵ et Ser⁷ de Pol II (Kelly et al., 1993; Ranunco et al., 2012; Lewis et al., 2016) ou encore la Thr⁴¹⁰ de PKC ζ (Miura et al., 2018). Par encombrement stérique ou par modification des charges de surface, ces deux MPT peuvent également s'exclure mutuellement sur des sites distincts, souvent séparés par un maximum de 10 acides aminés. Cette régulation a été démontrée, par exemple, lorsque la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation ciblent respectivement la Ser¹⁴⁹ et la Thr¹⁵⁵ de p53 (W.H. Yang et al., 2006), les Thr⁵⁷/Ser⁵⁸ et la Thr²⁰⁰ de CAMKIV (Dias et al., 2009), la Ser³⁴⁷ et la Thr³⁴⁴ de CK2 α (Tarrant et al., 2012), les Thr³⁰⁵/Thr³¹² et la Thr³⁰⁸ de AKT (Wang et al., 2012) ou encore les Ser²¹⁹/Thr²³⁹/Thr²⁴¹ et la Ser⁵¹ d'eIF2 α (eukaryotic Initiation Factor 2 subunit α) (Jang et al., 2015) (Figure 43).

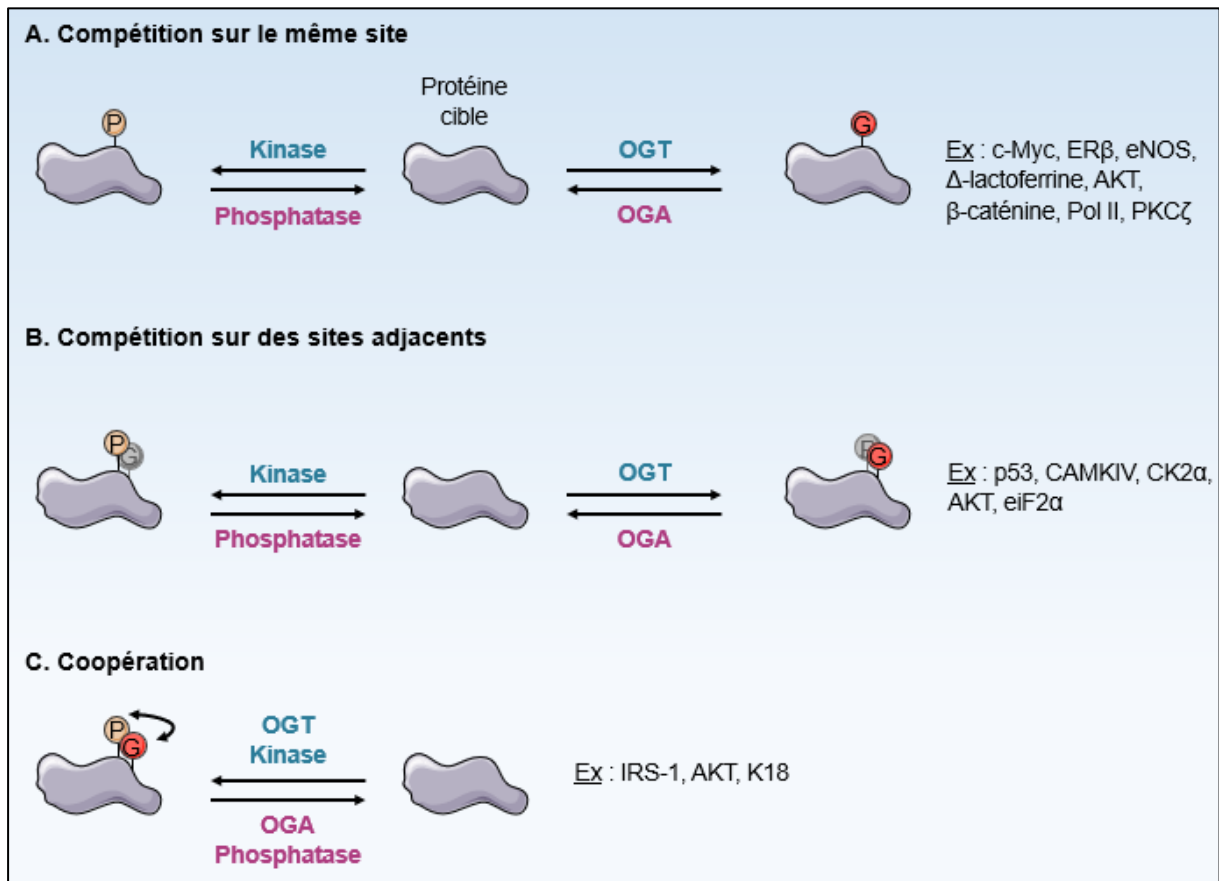


Figure 43 : Dialogue entre la *O*-N-AcétyleGlucosaminylation (*O*-GlcNAcylation) et la phosphorylation.

La *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation peuvent entrer en compétition sur le même site **(A)**, sur des sites adjacents **(B)** ou être coopératives **(C)**.

CaMKIV : Calcium/CalModulin-dependent protein Kinase IV ; **CK2 α** : Casein Kinase 2 α ; **eIF2 α** : eukaryotic Initiation Factor2 α ; **eNOS** : endothelial Nitric Oxide Synthase ; **ER β** : Estrogen Receptor β ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **IRS-1** : Insulin Receptor Substrate 1 ; **K18** : Kératine 18 ; ***O*-GlcNAcylation** : *O*-N-AcétyleGlucosaminylation ; **OGA** : β -*O*-GlcNAcAse ; **OGT** : β -*O*-GlcNAcTransférèse ; **P** : Phosphate ; **p53** : protéine de 53 kilodaltons ; **Pol II** : acide ribonucléique Polymérèse II ; **PKC ζ** : Protéine Kinase C ζ .

Ce mécanisme de compétition est appelé « *Yin Yang* », en référence au symbole taoïste de dualité. Néanmoins, ces modifications peuvent également coopérer de sorte que la présence de l'une favorise l'intervention de l'autre. Ainsi, dans les adipocytes murins 3T3-L1 stimulés par l'insuline, l'inhibition pharmacologique de l'OGA par le PUGNAc induit l'augmentation de la O-GlcNAcylation de IRS-1 mais également de sa phosphorylation sur les résidus Ser³⁰⁷ et Ser^{632/635} (X. Yang et al., 2008). D'autre part, la O-GlcNAcylation de AKT sur les résidus Thr⁴³⁰ et Thr⁴⁷⁹ favorise sa phosphorylation sur la Ser⁴⁷³ dans des modèles de vaisseaux diabétiques *in vitro* et *in vivo* (Heath et al., 2014). Enfin, la glycosylation de K18 sur la Ser³⁰ augmente sa phosphorylation sur la Ser³³ dans les hépatocytes immortalisés HHL-17 (Kakade et al., 2016) (Figure 43).

De plus, plusieurs études ont mis en évidence des complexes contenant l'OGT et/ou l'OGA ainsi que des kinases et/ou des phosphatases. Ainsi, dans des extraits de cerveau de rat, l'OGT est associée avec les phosphatases PP1β (Protein Phosphatase 1 β) et PP1γ dans un complexe stable et actif (Wells et al., 2004). D'autre part, l'OGT et l'OGA, complexées avec la kinase AKB (Aurora Kinase B) et la phosphatase PP1c, s'assemblent au niveau du « *midbody* » afin de réguler le statut post-transcriptionnel de la vimentine lors de la cytokinèse des cellules HeLa (Slawson et al., 2008; Z. Li et al., 2017). Enfin, comme mentionné précédemment, l'OGT et l'OGA sont elles-mêmes les cibles de la phosphorylation, en contrepartie de nombreuses kinases et phosphatases sont également O-GlcNAcylées (Cheung et al., 2008; Dias et al., 2012). Ainsi, une étude protéomique réalisée à partir d'extraits synaptiques a révélé que, contrairement aux phosphatases (8%), les kinases (16%) sont plus fréquemment O-GlcNAcylées que les autres classes de protéines (10%) (Trinidad et al., 2012). Ces MPT régulent ainsi mutuellement les interactions protéine-protéine, la stabilité, la localisation subcellulaire mais également l'activité enzymatique des protéines cibles.

6.2. Régulation des propriétés protéiques

La O-GlcNAcylation modifie les propriétés de protéines cibles impliquées dans de nombreux mécanismes cellulaires fondamentaux. Cette régulation peut se faire directement *via* le résidu de GlcNAc même ou par dialogue entre la O-GlcNAcylation et tout autre MPT telle que la phosphorylation. Dans le premier cas comme dans l'autre, c'est généralement la modification de la surface d'interaction entre les partenaires qui régit leur association ou leur dissociation (Tarbet et al., 2018).

6.2.1. Interactions protéine-protéine

Plusieurs études ont révélé que la O-GlcNAcylation de certaines protéines, dont Sp1, empêche leur interaction avec leurs partenaires. Au contraire, d'autres études ont mis en évidence que la modification d'autres protéines, et notamment PGC-1α, pouvait favoriser leurs interactions protéiques (Tarbet et al., 2018). De manière intéressante, la O-GlcNAcylation peut également promouvoir les interactions lectiniques avec les protéines de choc thermique telles que Hsp70 et Hsc70 (71 kDa Heat shock cognate) (Lefebvre et al., 2001; Guinez et al., 2004, p.20; Guinez et al., 2007).

Inhibition

Le facteur de transcription Sp1 intervient dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du métabolisme, de la croissance et de la mort cellulaires (Beishline and Azizkhan-Clifford, 2015). La O-GlcNAcylation de Sp1 a initialement été identifiée sur la Ser⁴⁹¹ au niveau de son second domaine de transactivation riche en Gln. Cette glycosylation empêche, *in vitro*, l'interaction de ce domaine avec celui des protéines **TAF110** (TATA-box-Associated Factor 110) et holo-Sp1 de drosophile. Dans les cellules HeLa, la O-GlcNAcylation de la Ser⁴⁹¹ de Sp1 diminue son activité transcriptionnelle (Roos et al., 1997). D'autres études ont montré que la O-GlcNAcylation de Sp1 au niveau de sa seconde région riche en Ser/Thr (localisée entre les résidus ³²⁶Ser-Thr³³³) inhibe sa liaison aux facteurs de transcription **Elf1** (E74-like factor 1), **Oct1** (Octamer-binding transcription factor 1) ou encore **SREBP2** (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2). La O-GlcNAcylation empêche ainsi la liaison coopérative de Sp1 aux promoteurs de gènes cibles tels que *Pem*, **RNU2** (*RNA U2 small nuclear*) et **AceCS1** (*Acétyl-CoA Synthétase 1*) (Lim and Chang, 2009b; Lim and Chang, 2009a, p.1; Lim and Chang, 2010).

D'autres protéines perdent également l'interaction avec leurs partenaires une fois O-GlcNAcylées. Ainsi, en condition hyperglycémique dans les cellules musculaires de rat VSMC, la O-GlcNAcylation de la Thr³⁵² de la sous-unité p65 du facteur de transcription NF-κB diminue sa liaison avec son inactivateur IκBα, et favorise sa translocation nucléaire et l'activation de ses gènes cibles (W.H. Yang et al., 2008). La glycosylation des facteurs de transcription **CREB** (c-AMP Response Element-Binding protein) (Lamarre-Vincent and Hsieh-Wilson, 2003) et **YY1** (Yin Yang 1) (Hiromura et al., 2003) perturbe leur interaction respectivement avec TAF4 dans les cellules ovariennes d'insecte Sf9 et pRB dans les cellules musculaires humaines CSMC. La O-GlcNAcylation du domaine cytoplasmique de la **E-cadhérine** (cadhérine Epithéliale) empêche sa liaison avec la protéine d'échafaudage **PIPK1γ** (PI Phosphate Kinase type I γ) et induit l'apoptose des cancéreuses mammaires MCF-7 (Geng et al., 2012). D'autre part, notre équipe a montré que la O-GlcNAcylation cible les six sous-unités du complexe de pré-réplication **MCM2-7** (MiniChromosome Maintenance protein 2-7) et déstabilise ce dernier dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Leturcq et al., 2018). Plus récemment encore, Hardivillé et collaborateurs (2019) ont démontré que la glycosylation de **TBP** (TATA-box Binding Protein) sur la Thr¹⁴⁴ bloque son interaction avec **BTAF1** (B-TFIID TATA-box-binding protein Associated Factor 1) et régule l'expression génique dans plusieurs lignées cellulaires (Hardivillé et al., 2019). La modification des résidus Ser³⁶², Thr³⁶⁵, Thr⁴⁰⁵ et Ser⁴⁰⁶ de PKM2 perturbe les interactions du tétramère et favorise la glycolyse dans les cellules MCF-7 et HeLa (Y. Wang et al., 2017; Singh et al., 2020). Dans les cellules MCF-7, la O-GlcNAcylation de la Ser¹⁴⁹ du facteur de transcription p53 diminue sa phosphorylation sur la Thr¹⁵⁵, son interaction avec l'ubiquitine ligase E3 MDM2 et augmente ainsi sa stabilité (W.H. Yang et al., 2006). Cette MPT augmente également la stabilité du coactivateur transcriptionnel YAP en affectant sa liaison avec la kinase **LATS1** (LArge Tumor Suppressor kinase 1) puis l'ubiquitine ligase E3 βTrCP dans les cellules cancéreuses hépatiques BEL-7402

et SMMC-7721 et pancréatiques L3.6 (Zhang et al., 2017; Peng et al., 2017). Enfin, Sekine et collaborateurs (2018) montrent que la glycosylation du facteur de transcription NRF1 diminue sa phosphorylation sur les résidus Ser⁴⁴⁸ et Ser⁴⁵¹ et son interaction avec β TrCP (Sekine et al., 2018).

Favorisation

Le co-activateur transcriptionnel PGC-1 α est O-GlcNAcylé sur la Ser³³³ dans les cellules HEK293T, ce qui facilite le recrutement de la DUB **BAP1** (**B**reast cancer 1 **A**ssociated **P**rotein-1). La déubiquitination de PGC-1 α augmente sa stabilité ainsi que son activité transcriptionnelle sur les gènes gluconogéniques cibles tels que **G6Pase** (**G**lucose-**6-Phosphatase**) (Ruan et al., 2012).

Après stimulation des cellules cancéreuses mammaires murines HC11 par la prolactine, le facteur de transcription **STAT5** (**S**ignal **T**ransducer and **A**ctivator of **T**ranscription **5**) est O-GlcNAcylé sur la Thr⁹². Cette glycosylation est nécessaire pour son interaction avec le co-activateur transcriptionnel CBP et l'activation de la transcription (Gewinner et al., 2004). Dans les cellules HeLa, la O-GlcNAcylation de la Ser¹¹² de l'histone H2B permet le recrutement de l'ubiquitine ligase E3 Bre1A qui, en retour, mono-ubiquitinylye la Lys¹²⁰ et active la transcription (Fujiki et al., 2011). Wang et collaborateurs (2015) ont également montré qu'en réponse aux cassures double-brin de l'ADN, la Ser¹¹² de H2B est O-GlcNAcylée et recrute la protéine de réparation de l'ADN **NSB1** (**N**ijmegen **B**reakage **S**yndrome **1**) (P. Wang et al., 2015). Enfin, dans les cellules HeLa S3 arrêtées en phase G₁ du cycle cellulaire, pRB est O-GlcNAcylée. Cette modification induit son hypo-phosphorylation, sa liaison et la neutralisation au facteur de transcription E2F-1 qui contrôle l'entrée en phase S (Wells et al., 2011).

Enfin, le résidu GlcNAc peut être spécifiquement reconnu par des protéines de choc thermique *via* des interactions lectiniques. Ainsi, Hsp70 et Hsc70 se lient aux protéines O-GlcNAcylées nucléocytoplasmiques hépatiques *in vitro* et *ex vivo* (Lefebvre et al., 2001; Guinez et al., 2004, p.20). De manière intéressante, cette interaction augmente au cours du stress cellulaire, ce qui suggère qu'elle protégerait les protéines O-GlcNAcylées de la dégradation (Guinez et al., 2007).

6.2.2. Stabilité

La O-GlcNAcylation régule la stabilité des protéines cibles en modulant leur ubiquitylation (Ruan, Nie, et al., 2013). Elle peut notamment modifier les interactions des protéines cibles avec des ubiquitine ligases E3 (exemple de CK2 α) ou des DUB (exemples de PGC-1 α , **BMAL1** (**B**rain and **M**uscle **A**ryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-Like protein **1**) et CLOCK) et ce, de manière directe ou indirecte par compétition avec la phosphorylation (exemple de la β -caténine). En effet, la phosphorylation est une modification qui peut créer un signal de reconnaissance pour la liaison d'une ubiquitine ligase E3 mais également induit la relocalisation de la protéine cible au niveau du compartiment contenant l'enzyme de dégradation (Hunter, 2007) (**Figure 44**).

Inhibition

CK2 α est une kinase qui phosphoryle des centaines de substrats impliqués dans tous les processus cellulaires, majoritairement la croissance cellulaire (Trembley et al., 2009). Dans les fibroblastes embryonnaires de rat REF52, la O-GlcNAcylation de CK2 α sur la Ser³⁴⁷ diminue la phosphorylation de la Thr³⁴⁴ elle-même antagoniste à son ubiquitination. Ainsi, la glycosylation de CK2 α diminue sa stabilité (Tarrant et al., 2012) (Figure 44).

La O-GlcNAcylation peut diminuer la stabilité d'autres protéines cibles. Ainsi, l'hyperglycémie favorise la O-GlcNAcylation et la dégradation de la protéine à doigt de zinc TNFAIP3 (TNF Alpha-Induced Protein 3) *in vitro* et *in vivo*. TNFAIP3 possède un domaine d'activité ubiquitine ligase E3 qui serait régulé par O-GlcNAcylation favorisant l'auto-ubiquitination de l'enzyme (Shrikhande et al., 2010). Dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2, la O-GlcNAcylation des résidus Ser²⁹, Ser³⁰ et Ser⁴⁸ de la kératine K18 augmente sa solubilité, son ubiquitination et sa dégradation protéasomale (Srikanth et al., 2010). Enfin, le facteur de transcription Nkx2.5 (Nk2 homeobox transcription factor related, locus 5) est O-GlcNAcylé et déstabilisé *in vitro* dans les cellules HEK293 traitées avec le PUGNAc et *in vivo* dans le tissu cardiaque de souris diabétiques (Kim et al., 2012) (Figure 44).

Favorisation

Comme mentionné précédemment, la liaison de la DUB BAP1 à PGC-1 α est permise grâce à la O-GlcNAcylation de la Ser³³³ du coactivateur transcriptionnel. Néanmoins, cette interaction n'est pas due à une modification de la phosphorylation de PGC-1 α mais à un effet direct de la glycosylation (Ruan et al., 2012). Similairement, la glycosylation de BMAL1 sur la Ser⁴¹⁸ et de CLOCK augmente leur stabilité par recrutement de BAP1 (Li et al., 2013). Enfin, notre équipe a également montré que la O-GlcNAcylation de la FAS (Fatty Acid Synthase) hépatique augmente son interaction avec la DUB USP2A (Ubiquitin-Specific Protase-2A) et sa stabilité *in vitro* et *in vivo* (Baldini et al., 2016) (Figure 44).

La β -caténine agit comme co-activateur transcriptionnel nucléaire dans la voie de signalisation Wnt (cf. 2.2.1 page 36) et comme constituant des adhésions cellulaires en s'associant avec la cadhérine au niveau de la membrane plasmique (Prakash and Swaminathan, 2015). Elle subit notamment une série séquentielle de phosphorylations sur la Ser⁴⁵ par CK1 α puis sur les acides aminés Thr⁴¹, Ser³⁷ et Ser³³ par GSK3- β au niveau de la D-box. L'ubiquitine ligase E3 β TrCp peut alors lier les résidus Ser³³ et Ser³⁷ phosphorylés (Liu et al., 2002), induire l'ubiquitination des résidus Lys¹⁹ et la Lys⁴⁹ (Winer et al., 2006) et la dégradation protéasomale de la β -caténine. Dans les cellules cancéreuses coliques HT-29, la β -caténine est O-GlcNAcylée sur les acides aminés Ser²³, Thr⁴⁰, Thr⁴¹ et Thr¹¹². La O-GlcNAcylation de la Thr⁴¹ empêche sa phosphorylation et provoque ainsi la stabilisation de la β -caténine (Olivier-Van Stichelen et al., 2014). En augmentant l'expression de la β -caténine, la O-GlcNAcylation favorise également son activité transcriptionnelle dans les cellules MCF7 et dans les fibroblastes murins NIH3T3 (Olivier-Van Stichelen, Guinez, et al., 2012; Harosh-Davidovich and Khalaila, 2018) (Figure 44).

La *O*-GlcNAcylation exclut la phosphorylation inductrice du signal de dégradation d'autres protéines cibles. C'est le cas du facteur de transcription c-Myc sur la Thr⁵⁸ (Kamemura et al., 2002; Luanpitpong et al., 2017; Lee et al., 2020) et de la Δ -lactoferrine sur la Ser¹⁰ (Hardivillé et al., 2010). La *O*-GlcNAcylation de p53 (W.H. Yang et al., 2006), YAP (Zhang et al., 2017; Peng et al., 2017) et NRF1 (Sekine et al., 2018) diminue leur phosphorylation et leur interaction avec les ubiquitine ligases MDM2 et β TrCP respectivement (**Figure 44**).

6.2.3. Localisation subcellulaire

La découverte de la *O*-GlcNAcylation de nucléoporines, constituants essentiels du pore nucléaire impliqués dans le transport nucléaire (Holt and Hart, 1986; Holt, Snow, et al., 1987; Hanover et al., 1987), a ouvert l'investigation du rôle de cette MPT dans la localisation subcellulaire de ses protéines cibles (**Figure 46**). La *O*-GlcNAcylation modulerait la sélectivité des pores nucléaires et le trafic nucléocytoplasmique des protéines. Ainsi, la *O*-GlcNAcylation au niveau des domaines de répétitions **FG (Phe-Gly)** de **Nup62 (Nucléoporine de 62 kDa)** et de Nup98 affaiblit la cohésion entre ces répétitions et facilite l'import nucléaire des complexes cargo/**NTR (Nuclear Transport Receptor)** (Labokha et al., 2013). Plusieurs études montrent que les formes *O*-GlcNAcylées de certaines protéines sont majoritairement nucléaires. C'est le cas de **Pax6 (Paired box 6)** (Lefebvre et al., 2002, 6) et STAT5 (Nanashima et al., 2005).

Par ailleurs, d'autres études mécanistiques montrent que la *O*-GlcNAcylation régule le transport nucléaire de la β -caténine dans les cellules cancéreuses de prostate DU-14 5 (Sayat et al., 2008), des facteurs de transcription Sp1 (Majumdar et al., 2003; Majumdar et al., 2006) et **NeuroD1 (Neurogenic Differentiation 1)** dans les cellules β -pancréatiques murines MIN6 (Andrali et al., 2007), Tau dans les cellules de neuroblastome Kelly (Lefebvre et al., 2003) ou encore la protéine de choc thermique Hsp27 dans des lignées de carcinome hépatocellulaire (Guo et al., 2012) (**Figure 45**).

6.2.4. Activité enzymatique

De manière intéressante, Trinidad et collaborateurs (2012) révèlent que, contrairement à la phosphorylation, la *O*-GlcNAcylation est rarement localisée dans le domaine catalytique des kinases (Trinidad et al., 2012). Ainsi, la *O*-GlcNAcylation modifierait l'activité enzymatique principalement par un mécanisme « *Yin-Yang* » avec la phosphorylation et par modification des interactions protéiques ou de la localisation subcellulaire de ses protéines cibles.

Selon le contexte pathologique, la *O*-GlcNAcylation peut réguler différemment l'activité enzymatique de sa cible. Par exemple, certains travaux démontrent que la glycosylation de AKT inhibe la kinase dans le cancer et les désordres métaboliques mais l'active dans les maladies vasculaires liées au diabète (*cf. 8 page 190*) (**Figure 46**).

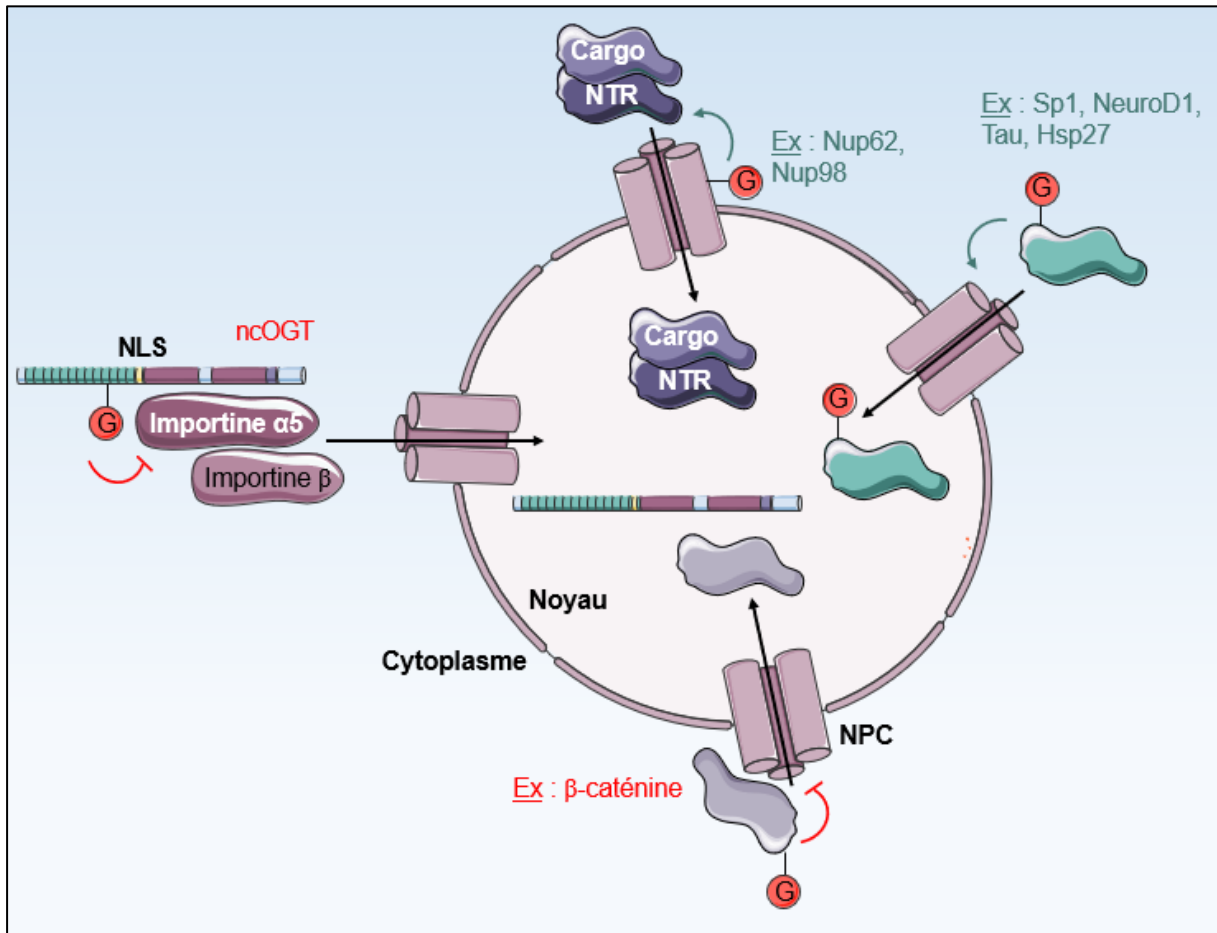


Figure 45 : Régulation de la localisation nucléaire des protéines par la *O*-GlcNAcylation. La translocation nucléaire des protéines peut être favorisée par leur *O*-GlcNAcylation ou par celle des Nup. Au contraire la *O*-GlcNAcylation peut inhiber la translocation nucléaire des protéines en empêchant leur interaction avec les importines ou le NPC.

G : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **Hsp** : Heat shock protein ; **ncOGT** : nucleocytoplasmic β -*O*-GlcNAcTransférase ; **NeuroD1** : Neurogenic Differentiation 1 ; **NLS** : Nuclear Localization Signal ; **NPC** : Nuclear Pore Complex ; **NTR** : Nuclear Transport Receptor ; **Nup** : Nucléopore ; ***O*-GlcNAcylation** : *O*-N-Acetylglucosaminylation ; **Sp1** : Specificity protein 1 ; **Tau** : Tubulin associated unit.

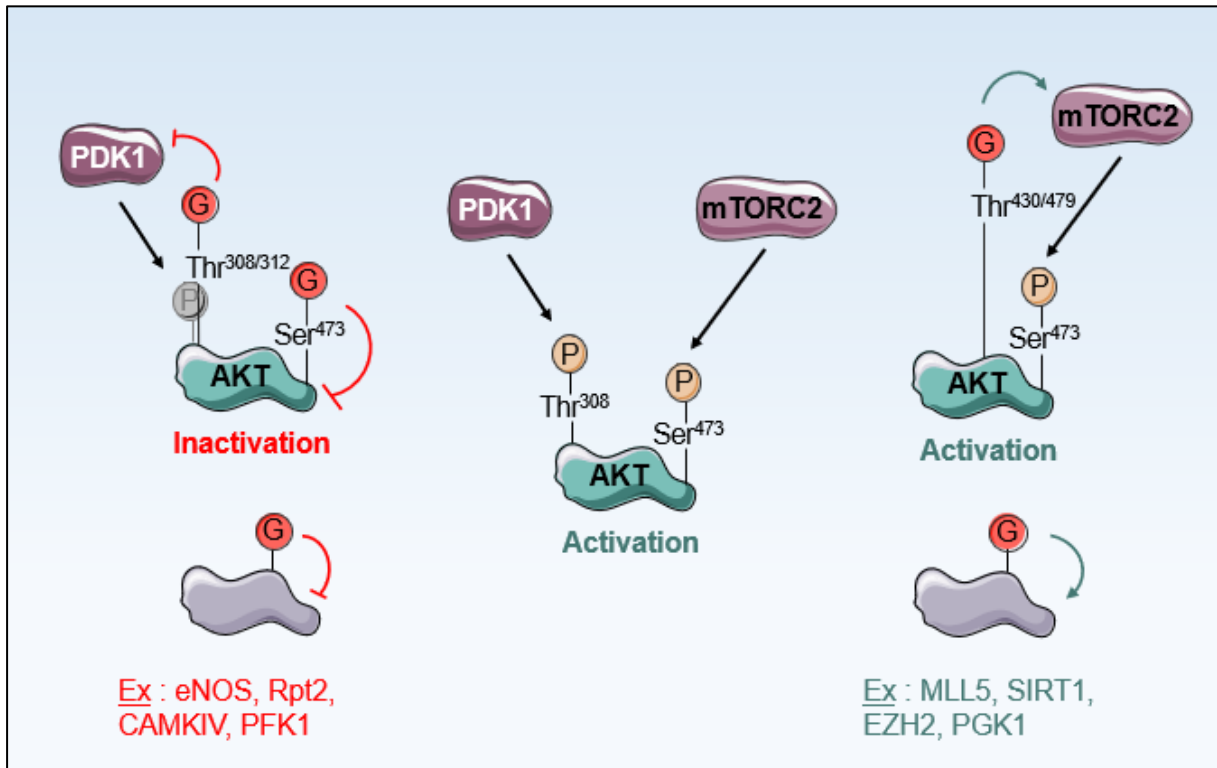


Figure 46 : Régulation de l'activité enzymatique des protéines par la O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation peut augmenter ou diminuer l'activité enzymatique de sa protéine cible. Notamment, elle inactive AKT par diminution de son interaction avec PDK1 et elle l'active par augmentation de son interaction avec mTORC2.

CaMKIV : Calcium/CalModulin-dependent protein Kinase IV ; **eNOS** : endothelial Nitric Oxide Synthase ; **EZH2** : Enhancer of Zeste Homolog 2 ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **MLL5** : Mixed-Lineage Leukemia 5 ; **mTORC2** : mammalian Target Of Rapamycin Complex 2 ; **P** : Phosphate ; **PDK1** : Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 ; **PFK1** : PhosphoFructoKinase 1 ; **PGK1** : PhosphoGlycérate Kinase 1 ; **Rpt2** : Regulatory particle triple-A adenosine triphosphatase 2 ; **Ser** : Sérine ; **SIRT1** : SIRTuine 1 ; **Thr** : Thréonine.

Inhibition

AKT est une kinase de la voie de signalisation mitogène PI3K/AKT/mTOR. Son activation dépend des phosphorylations sur la Thr³⁰⁸ de sa boucle d'activation par **PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Kinase 1)** et sur la Ser⁴⁷³ de son extrémité C-ter par **mTORC2 (mTOR Complex 2)** (Bhaskar and Hay, 2007). Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7, la *O*-GlcNAcylation de AKT sur les résidus Thr³⁰⁵ et Thr³¹² empêche la phosphorylation sur la Thr³⁰⁸ par perturbation de l'interaction entre AKT et PDK1. Ainsi, l'inhibition de AKT réprime la prolifération et la migration cellulaires (Wang et al., 2012) La diminution de la phosphorylation de AKT concomitante à sa *O*-GlcNAcylation a également été observée dans les adipocytes et est associée au mécanisme de résistance à l'insuline (Park et al., 2005; Whelan et al., 2010). Enfin, l'inhibition de AKT par *O*-GlcNAcylation de la Ser⁴⁷³ conduit à l'apoptose des cellules β -pancréatiques murines en condition d'hyperglycémie (Kang et al., 2008) (Figure 46).

D'autres enzymes sont inhibées par *O*-GlcNAcylation. Ainsi, en réponse à l'hyperglycémie dans les cellules endothéliales HCAEC, eNOS est *O*-GlcNAcylé sur la Ser¹¹⁷⁷, site activateur et cible de la phosphorylation par AKT (Federici et al., 2002). La modification de la sous-unité **Rpt2 (Regulatory particle triple-A ATPase (ATP hydrolase) subunit 2)** du protéasome 26S diminue son activité ATPasique dans les cellules rénales de rat NRK (Zhang et al., 2003). En réponse à l'hypoxie, **PFK1 (PhosphoFructoKinase 1)** est inactivée par *O*-GlcNAcylation de la Ser⁵²⁹ dans les cellules cancéreuses pulmonaires H1299 (Yi et al., 2012, p.1) (Figure 46).

Activation

Heath et collaborateurs (2014) révèlent que la *O*-GlcNAcylation de AKT sur les acides aminés Thr⁴³⁰ et Thr⁴⁷⁹ favorise sa liaison avec la sous-unité **RICTOR (Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR)** du complexe mTORC2 et sa phosphorylation activatrice sur la Ser⁴⁷³ *in vitro* dans les cellules musculaires lisses vasculaires murines VSMC et *in vivo* dans les artères de souris diabétiques. Ainsi activée, AKT stimule l'expression du facteur de transcription ostéogénique *RUNX2* et la calcification (Heath et al., 2014) (Figure 46).

La *O*-GlcNAcylation favorise également l'activité enzymatique d'autres protéines cibles dont figure un bon nombre d'enzymes du « marquage » épigénétique. Ainsi, la *O*-GlcNAcylation de **MLL5 (Mixed-Lineage Leukemia 5)** sur son domaine SET (Thr⁴⁴⁰) augmente son activité H3K4 HMT dans les cellules leucémiques HL60 (Fujiki et al., 2009). Très récemment, il a été montré que la glycosylation de **SIRT1 (SIRTuine 1)** sur la Ser⁵⁴⁹ augmente son activité désacétylase dans les cellules cancéreuses pulmonaires NCI-H1299 en réponse au stress. Elle régulerait l'efficacité catalytique et l'affinité de substrats de l'enzyme (Han et al., 2017, p.1). De même, la *O*-GlcNAcylation de **EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2)** sur la Ser⁷²⁹ modifie la sous-conformation de son domaine SET, et est nécessaire pour l'activité HMT et la formation des marques épigénétiques H3K27me2/3 dans les cellules HEK293T (Lo et al., 2018, p.2) (Figure 46).

7. Régulation des mécanismes cellulaires fondamentaux par O-GlcNAcylation

A l'heure actuelle, plus de 4 000 protéines O-GlcNAcylées ont été identifiées. L'analyse de O-GlcNAcome a révélé la diversité des protéines cibles de mammifères engagées dans de nombreux mécanismes cellulaires fondamentaux. Ceux-ci incluent la transcription/traduction (26% des protéines O-GlcNAcylées), le métabolisme (13%), l'architecture (14%), la réponse au stress (11%) la signalisation (8%), le trafic intracellulaire (7%), la conformation protéique (7%), le cycle cellulaire (2%) ou encore la dégradation protéasomale, l'apoptose et le développement (Love and Hanover, 2005).

7.1. Transcription

Les premières études sur le rôle de la O-GlcNAcylation dans la transcription génique datent de la fin des années 1980. En effet, Kelly et Hart (1989) montrent un enrichissement des protéines O-GlcNAcylées au niveau de la chromatine de drosophile et notamment dans les régions condensées inactives (Kelly and Hart, 1989). Chez *Caenorhabditis elegans*, l'analyse transcriptionnelle sur l'entièreté du génome a démontré par mutation de l'*OGT* et de *MGEA5* que les produits de ces deux gènes régulent respectivement 688 et 509 gènes (environ 3,6% et 2,7% du génome) majoritairement impliqués dans l'immunité innée, la réponse au stress, la détoxification, le vieillissement et, le métabolisme des glucides et des lipides (Love et al., 2010). Ces observations suggèrent l'implication de la O-GlcNAcylation dans la régulation de la machinerie transcriptionnelle, des facteurs de transcription mais également des acteurs épigénétiques remodelant la structure de la chromatine (Figure 47).

Pour faciliter le contrôle des programmes de transcription, le génome eucaryote est empaqueté sous forme de chromatine dont l'unité de base, le nucléosome, correspond à l'enroulement de l'ADN autour d'un octamère d'histones. Le remodelage de la chromatine par modification épigénétique de l'ADN et des histones régule l'accès de la machinerie transcriptionnelle (Vakoc et al., 2006). La O-GlcNAcylation a notamment pour cibles les protéines PcG, les HMT et les histones (Decourcelle et al., 2019).

Chez la drosophile, l'*OGT* est codée par *Sxc* (*Super sex combs*) classifié parmi les gènes *PcG* impliqués dans la répression des gènes homéotiques *Hox* (*Homeobox*) au cours du développement (Gambetta et al., 2009). Il existe un chevauchement entre les sites de liaison des protéines O-GlcNAcylées et les éléments de réponse aux protéines PcG (**PRE**, **PcG Responsive Element**) des complexes PRC1, PRC2 et **PhoRC** (**Pleiohomeotic-Repressive Complexe**) (Gambetta et al., 2009). La O-GlcNAcylation de Ph prévient son agrégation et promeut le bon assemblage du complexe PRC1 (Gambetta and Müller, 2014). La glycosylation stabilise tout un ensemble d'acteurs des complexes PRC : c'est le cas pour BMI-1 de PRC1 sur la Ser²⁵⁵ (Y. Li et al., 2017), EZH2 de PRC2 sur les Ser⁷⁶ et Ser⁸⁴ (Chu et al., 2014,

p.2; Lo et al., 2018) et **ASXL1** (**A**dditional **S**eX combs **L**ike **1**) de **PR-DUB** (**P**olycomb **R**epressive **D**e**U**biqitinase) sur la Ser¹⁹⁹ (D. Inoue et al., 2018). La *O*-GlcNAcylation de **RING1B** (**R**ING finger protein **1B**) sur les résidus Thr²⁵⁰, Ser²⁵¹ et Ser²⁷⁸ régule sa liaison aux autres sous-unités de PRC1 dans les CSE humaines (Maury et al., 2015). YY1 de PhoRC est également *O*-GlcNAcylé (Hiromura et al., 2003; Y. Li et al., 2017). Enfin, la *O*-GlcNAcylation de EZH2 sur la Ser⁷²⁹ augmente son activité HMT H3K27me2/3 (Lo et al., 2018). Récemment, il a été démontré un enrichissement des protéines *O*-GlcNAcylées et de la marque répressive H3K27me3 au niveau des promoteurs de 61 gènes dont celui du facteur de transcription **MYBL1** (**MYB proto-oncogene Like 1**) régulant le phénotype souche des cellules cancéreuses coliques HT-29 (Guo et al., 2017). D'autre part, l'OGT permet le recrutement d'EZH2 du complexe PRC2 et le dépôt de la marque H3K27me3 sur le promoteur de 16 gènes suppresseurs de tumeur incluant **IL1R1** (**IL-1 Receptor type 1**) et **UNC5A** dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 (Chu et al., 2014, p.2). De manière intéressante, il existe une boucle de régulation puisque les CSE murines dépourvues d'un complexe PRC2 fonctionnel présentent une diminution des niveaux d'OGT et de *O*-GlcNAcylation globale (Myers et al., 2011).

La *O*-GlcNAcylation régule l'activité d'autres H3K4 HMT telles MLL5 et **SETD1A** (**S**ET Domain containing **1A**). Ainsi, dans les cellules leucémiques HL60, la *O*-GlcNAcylation du domaine SET de MLL5 (Thr⁴⁴⁰) augmente son activité et co-active **RAR α** (**R**etinoic **A**cid **R**eceptor **α**) au niveau des promoteurs des gènes cibles (Fujiki et al., 2009). L'activité de l'OGT est nécessaire pour l'intégrité du complexe SET1/COMPASS et la liaison de SETD1A à la chromatine (Deplus et al., 2013) (**Figure 47**).

Enfin, la *O*-GlcNAcylation a été identifiée sur l'ensemble des sous-unités du core d'histones, à savoir H2A (Ser⁴⁰ et Thr¹⁰¹), H2B (Ser³⁶ et Ser¹¹²), H3 (Ser¹⁰ et la Thr³²) et H4 (Ser⁴⁷) (Kaleem et al., 2008; Sakabe et al., 2010; Fujiki et al., 2011; Fong et al., 2012; Hirosawa et al., 2016) (**Figure 47**). Alors que la *O*-GlcNAcylation de la Ser¹⁰ de H3 induirait la répression génique par compétition avec la phosphorylation et méthylation de la Lys⁹ (Kaleem et al., 2008), celle de la Ser¹¹² de H2B conduirait à l'activation génique par augmentation de l'interaction avec l'ubiquitine ligase E3 RNF20/40 et la mono-ubiquitination de la Lys¹²⁰ (Fujiki et al., 2011). L'interaction de l'OGT avec TET2 favoriserait la glycosylation de H2B au niveau des sites d'initiation de la transcription (Chen et al., 2013). Enfin, en réponse au stress induit par le choc thermique, les niveaux d'OGT, de *O*-GlcNAcylation des histones H2B, H3 et H4, et de compaction de la chromatine sont augmentés (Sakabe et al., 2010) (**Figure 47**).

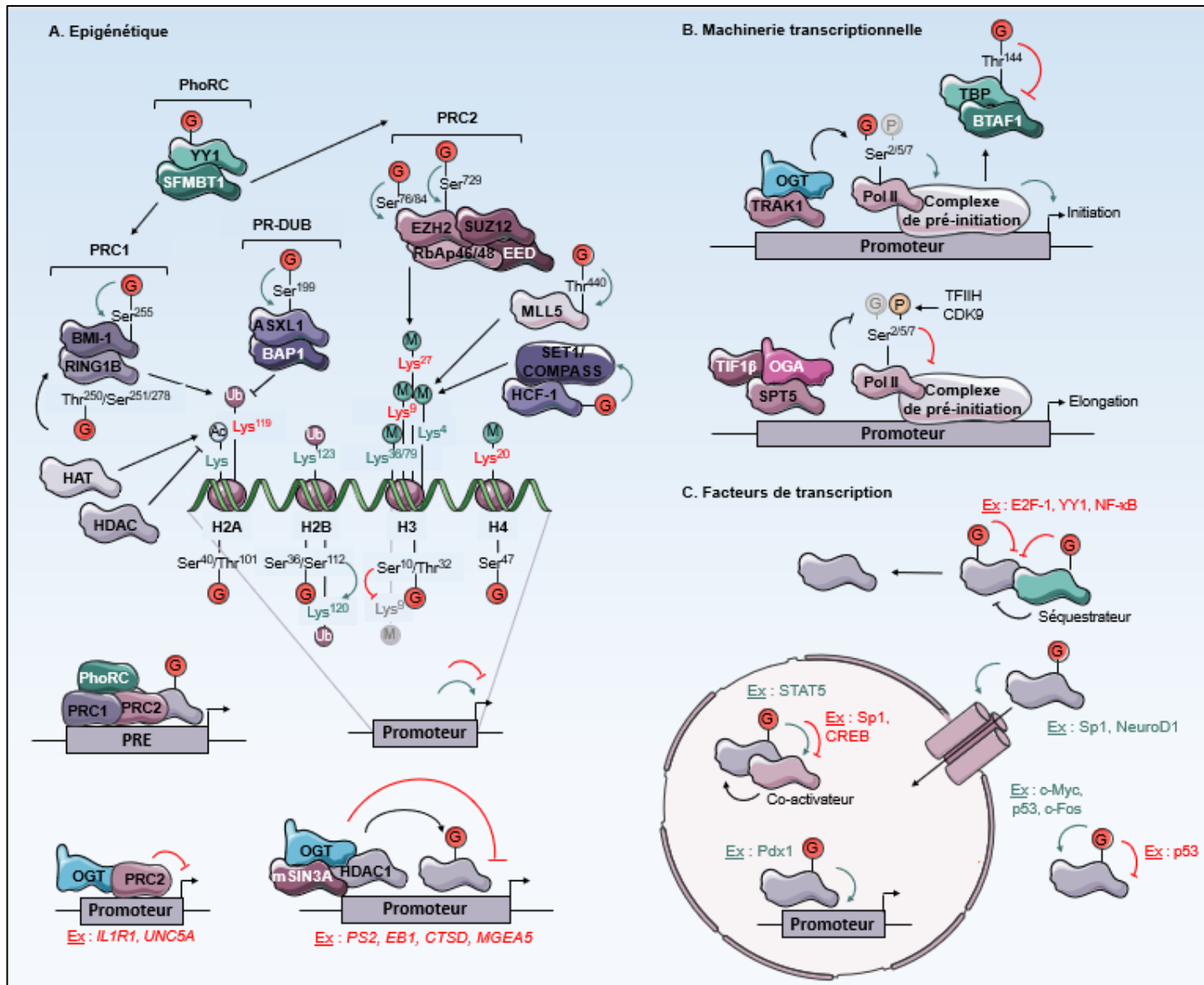


Figure 47 : Régulation de la transcription par la O-GlcNAcylation. A. L'OGT participe à la régulation des marques épigénétiques et de l'expression génique en interagissant et en O-GlcNAcyant les protéines PcG, les HMT ou encore les histones. **B.** L'OGT et l'OGA régulent l'initiation et l'élongation de la transcription en modulant l'état de O-GlcNAcylation et de phosphorylation de Pol II. **C.** La O-GlcNAcylation régule également la stabilité de certains facteurs de transcription ainsi que leur transport nucléaire, leur interaction avec des séquestrateurs ou des co-activateurs, et leur fixation à l'ADN.

Ac : Acétyle ; **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique ; **ASXL1** : Additional SeX combs Like 1 ; **BAP1** : Breast cancer 1 Associated Protein 1 ; **BMI-1** : B-cell-specific Moloney murine leukemia virus Insertion site 1 ; **BTAF1** : B-TFIID TATA-box-binding protein Associated Factor 1 ; **CDK9** : Cyclin-Dependent Kinase 9 ; **COMPASS** : COMplex Proteins ASSociated with SET1 ; **CREB** : C-Adenosine monophosphate Response Element-Binding protein ; **CTSD** : *CaThespine D* ; **EB1** : *End-Binding protein 1* ; **EED** : Embryonic Ectoderm Development ; **EZH2** : Enhancer of Zeste Homolog 2 ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **H** : Histone ; **HAT** : Histone AcétylTransférase ; **HCF-1** : Host Cell Factor 1 ; **HDAC** : Histone DésAcétylase ; **IL1R1** : *InterLeukine-1 Receptor 1* ; **Lys** : Lysine ; **M** : Méthyle ; **MGEA5** : *MeninGioma Expressed Antigen* ; **MLL5** : Mixed-Lineage Leukemia 5 ; **mSIN3A** : mammalian Stress-activated protein kinase INteracting protein 3A ; **NeuroD1** : Neurogenic Differentiation 1 ; **NF-κB** : Nuclear Factor κB ; **OGA** : β-O-GlcNAcAse ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétyleGlucosaminylation ; **OGT** : β-O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **p53** : protéine de 53 kilodaltons ; **PcG** : Polycomb-Group proteins ; **Pdx1** : Pancreatic and duodenal homeobox 1 ; **PhoRC** : Pleiohomeotic-Repressive Complexe ; **Pol II** : acide ribonucléique Polymérase II ; **PRC** : Polycomb Repressive Complex ; **PR-DUB** : Polycomb Repressive DeUBiquitinase ; **PRE** : PcG Responsive Element ; **PS2** : *ParaSporine 2* ; **RbAp** : RetinoblastomA-binding protein ; **RING1B** : Really Interesting New Gene 1B ; **Ser** : Sérine ; **SET1** : Su(var)3-9 ; Enhancer-of-zeste and Trithorax 1 ; **SFMBT1** : Structural maintenance of chromosomes like with Four Malignant Brain Tumor domains 1 ; **Sp1** : Specificity protein 1 ; **SPT5** : SuPpressor of Ty 5 ; **STAT5** : Signal Transducer and Activator of Transcription 5 ; **Suz12** : Suppressor-of-zeste 12 ; **TATA** : Thymine-Adénine-Thymine-Adénine ; **TBP** : TATA-box Binding Protein ; **TF** : B-Transcription Factor ; **Thr** : Thréonine ; **TIF1β** : Transcriptional Intermediary Factor 1β ; **TRAK1** : TRAfficking Kinesin protein 1 ; **Ub** : Ubiquitine ; **YY1** : Yin Yang 1.

L'initiation de la transcription par les ARN polymérase fait intervenir une machinerie transcriptionnelle complexe dont l'un des facteurs clés est la protéine TBP. La transcription par l'ARN polymérase Pol II peut être initiée par la formation du complexe **TFIID** (B-Transcription Factor II D) formé par TBP et BTAF1. La O-GlcNAcylation de TBP sur la Thr¹⁴⁴ bloque son interaction avec BTAF1, modifie le transcriptome et régule le métabolisme cellulaire (Hardivillé et al., 2019). L'activité *in vitro* de l'OGT est également nécessaire pour le recrutement de Pol II au niveau des promoteurs (Lewis et al., 2016). L'interaction de l'OGT avec TRAK1 permettrait son recrutement à Pol II au niveau des complexes transcriptionnels (Iyer et al., 2003). Le domaine CTD C-ter de Pol II est phosphorylé au niveau des résidus Ser⁵ et Ser⁷ par TFIIH puis de la Ser² par CDK9 lors de la transition des phases d'initiation et d'élongation de la transcription (Buratowski, 2009). La O-GlcNAcylation des Ser², Ser⁵ et Ser⁷ de Pol II a été identifiée *in vitro* et *in vivo* (Kelly et al., 1993; Ranuncolo et al., 2012; Lewis et al., 2016). La glycosylation de Ser⁵ et Ser⁷ est nécessaire à la formation du complexe de pré-initiation de la transcription et leur déglycosylation par l'OGA permet leur phosphorylation et l'élongation de la transcription (Comer and Hart, 2001; Ranuncolo et al., 2012) (**Figure 47**).

L'OGA est complexée avec les facteurs d'élongation SPT5 et TIF1 β au niveau des sites d'initiation de la transcription (Resto et al., 2016). La O-GlcNAcylation modifie également d'autres composants de la machinerie transcriptionnelle tels que les protéines de liaison à l'ARN hnRNP (Nandi et al., 2006; Z. Wang et al., 2007; Liu et al., 2019) et les facteurs de transcription (Özcan et al., 2010). La liaison de l'OGT au corépresseur mSIN3A favoriserait la répression génique par modification de Pol II ou de facteurs de transcription au niveau des promoteurs des gènes cibles (Yang et al., 2002) dont *MGEA5* (Vaidyanathan et al., 2017) (**Figure 47**).

La O-GlcNAcylation augmente la transcription en stabilisant c-Myc (Kamemura et al., 2002; Luanpitpong et al., 2017; Lee et al., 2020), p53 (W.H. Yang et al., 2006) et c-Fos (Choi et al., 2019) et en favorisant le transport nucléaire de NeuroD1 (Andrali et al., 2007) et Sp1 (Majumdar et al., 2003; Dauphinee et al., 2005; Majumdar et al., 2006). Elle inhibe l'interaction de NF- κ B avec son inactivateur I κ B α (W.H. Yang et al., 2008), et de E2F-1 (Wells et al., 2011) et YY1 (Hiromura et al., 2003) avec la protéine de séquestration pRB. Elle augmente l'interaction de STAT5 avec le co-activateur transcriptionnel CBP (Gewinner et al., 2004) et favorise la fixation à l'ADN de **Pdx1** (Pancreatic and duodenal homeobox 1) (Gao et al., 2003). Au contraire, la O-GlcNAcylation réprime la transcription en inhibant l'interaction de Sp1 et de CREB avec les facteurs de transcription Elf1, Oct1 et SREBP2 (Lim and Chang, 2009b; Lim and Chang, 2009a, p.1; Lim and Chang, 2010) et TAF4 (Lamarre-Vincent and Hsieh-Wilson, 2003) respectivement ou en déstabilisant p53 (Luanpitpong et al., 2017) (**Figure 47**).

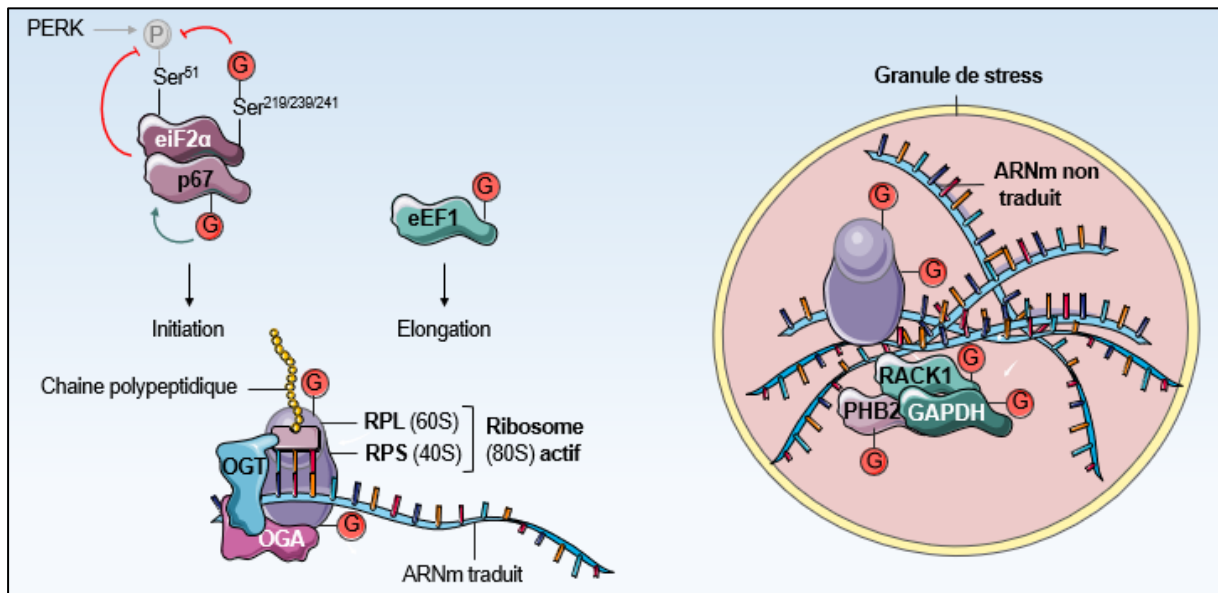


Figure 48 : Régulation de la traduction par la O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation cible des protéines d'initiation et d'élongation de la traduction, des protéines ribosomiques ou encore des protéines résidentes des granules de stress.

ARNm : Acide RiboNucléique messenger ; **eEF1** : eukaryotic Elongation Factor 1 ; **eIF2α** : eukaryotic Initiation Factor 2α ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **GAPDH** : GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase ; **OGA** : β-O-GlcNAcAse ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcetylGlucosaminylation ; **OGT** : β-O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **p67** : protéine de 67 kilodaltons ; **PERK** : Protein kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase ; **PHB2** : ProHiBitine 2 ; **RACK1** : Receptor of Activated protein C Kinase 1 ; **RPL** : Ribosomal Protein of the Large subunit ; **RPS** : Ribosomal Protein of the Small subunit ; **Ser** : Sérine.

7.2. Traduction

La *O*-GlcNAcylation contrôle la synthèse protéique en ciblant des facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction, des protéines ribosomiques ainsi que des protéines résidentes des granules de stress (**Figure 48**).

En réponse au stress, la phosphorylation de la Ser⁵¹ du facteur d'initiation eIF2 α inhibe la formation du complexe de pré-initiation de la traduction 43S. La protéine p67 lie et protège eIF2 α de cette phosphorylation inhibitrice. La *O*-GlcNAcylation initie la traduction en modifiant eIF2 α et p67. Plus particulièrement, la glycosylation de eIF2 α sur les résidus Ser²¹⁹, Thr²³⁹ et Thr²⁴¹ inhibe sa phosphorylation sur la Ser⁵¹ par **PERK** (Protein kinase R-like *Endoplasmic Reticulum* Kinase) (Jang et al., 2015). D'autre part, la *O*-GlcNAcylation stabilise p67 en ciblant la région ⁶⁰Ser-Ser⁶³ (Datta et al., 2003) (**Figure 48**).

Le facteur d'élongation de la traduction **eEF1** (eukaryotic Elongation Factor 1) a également été identifié comme *O*-GlcNAcylé dans les ovocytes de xénope mais son rôle n'a pas été investigué (Dehennaut, Slomianny, et al., 2008). Les deux enzymes de la dynamique de la *O*-GlcNAcylation, l'OGT et l'OGA, sont associées aux ribosomes actifs dans les foies de rat (Zeidan et al., 2010). Ainsi, une trentaine de protéines des sous-unités 40S (**RPS**, Ribosomal Protein of the Small subunit) et 60S (**RPL**, Ribosomal Protein of the Large subunit) du ribosome (80S) sont actuellement connues pour être *O*-GlcNAcyliées (Gurcel et al., 2008; Ohn et al., 2008; Dehennaut, Slomianny, et al., 2008; Teo et al., 2010; Zeidan et al., 2010). En revanche, le rôle de cette glycosylation reste inconnu (**Figure 48**).

Enfin, il est connu que les granules de stress régulent la synthèse protéique mais également la dégradation des ARNm. En réponse au stress, induit par l'arsénite, la *O*-GlcNAcylation cible plusieurs protéines de ces granules telles que certaines RPS et RPL, **RACK1** (Receptor of Activated protein C Kinase 1), GAPDH et **PHB2** (ProHiBitine 2). La glycosylation des sous-unités ribosomiques favoriserait l'agrégation de **RNP** (RiboNucléoProtéines) 48S constituées d'ARNm non traduits dans les granules de stress (Ohn et al., 2008) (**Figure 48**).

7.3. Dégradation protéasomale

Le système ubiquitine-protéasome (**UPS**, Ubiquitin Proteasome System) est le principal mécanisme de dégradation ATP-dépendant des protéines dans le cytoplasme et le noyau des cellules. Le protéasome 26S en est l'élément central. Il s'agit d'un complexe enzymatique multiprotéique composé de deux complexes régulateurs 19S qui lient la chaîne d'ubiquitine et possèdent une activité ATPasique, et d'un cœur catalytique 20S à activité protéolytique. L'UPS dégrade les protéines mal conformées, oxydées, mutées, endommagées et potentiellement toxiques ainsi que les protéines en fin de vie. Les motifs de dégradation **PEST** (Pro-Glu-Ser-Thr), les séquences D-box (motif consensus Arg-X-X-X-Leu-X-X-X-X-Asn/Asp/Glu) et **KEN**-box (Lys-Glu-Asn-X-X-X-Asn) favorisent la poly-ubiquitination des protéines par un système multienzymatique. La protéine ainsi poly-ubiquitinylée est alors ciblée au protéasome 26S, dépliée par des ATPases puis dégradée en

peptides de 2 à 22 acides aminés. La *O*-GlcNAcylation peut réguler la dégradation protéasomale des protéines en modulant leur ubiquitination ainsi que l'activité du protéasome 26S (**Figure 44**).

Comme décrit précédemment, la *O*-GlcNAcylation module l'ubiquitination des protéines en modifiant leur interaction avec des ubiquitine ligases E3 et des DUB (*cf.* 6.2.2 page 159). D'autre part, l'enzyme E1 Uba1 et la DUB **UCH-L1** (**Ubiquitin C-terminal Hydrolase L1**) sont *O*-GlcNAcylées (Cole and Hart, 2001; Guinez et al., 2008) mais le rôle de la MPT sur l'activité de ces enzymes n'est pas connu (**Figure 44**). Pourtant de manière intrigante, il existe ainsi une corrélation positive entre les niveaux de *O*-GlcNAcylation et d'ubiquitination globales des protéines (Guinez et al., 2008). Plusieurs sous-unités des complexes 19S (Zhang et al., 2003; Sümegi et al., 2003) et 20S (Sümegi et al., 2003; Overath et al., 2012) sont la cible de la *O*-GlcNAcylation. Notamment, la glycosylation diminue l'activité ATPasique de Rpt2 du complexe 19S (Zhang et al., 2003; Xu et al., 2012) (**Figure 44**). Enfin et de manière plus générale, l'OGT inhibe le protéasome 26S alors que l'OGA l'active (Zhang et al., 2003). Par exemple, la sOGA active le protéasome 26S promouvant la dégradation des périlipines essentielles au maintien des stockages lipidiques. Par rétroaction négative, elle induit également sa propre dégradation protéasomale limitant ainsi sa disponibilité en fonction des réserves lipidiques (Keembiyehetty et al., 2011).

Un des processus de contrôle qualité des protéines naissantes implique l'ubiquitination co-traductionnelle qui entraîne la dégradation prématurée des chaînes polypeptidiques à la sortie des ribosomes. L'OGT interagit stablement avec les ribosomes actifs (Zeidan et al., 2010), et la *O*-GlcNAcylation co-traductionnelle stabilise les chaînes polypeptidiques de Sp1 et de Nup62 par compétition avec l'ubiquitine (Zhu et al., 2015) (**Figure 44**). Ainsi, Sp1 naissant est plus *O*-GlcNAcylé que la protéine mature, soulignant le rôle de cette modification dans le contrôle qualité des protéines (Zhu et al., 2015). La glycosylation de ces polypeptides est retrouvée au niveau de régions désordonnées, ce qui expliquerait la présence de certains sites *O*-GlcNAcylés inaccessibles à l'OGT sur les protéines matures telles que la Thr¹⁷⁰ de l' α -cristalline (Roquemore et al., 1996).

7.4. Trafic intracellulaire

La *O*-GlcNAcylation peut réguler le trafic intracellulaire des protéines à la membrane plasmique et au noyau ainsi que la mobilité des mitochondries (**Figure 49**).

La E-cadhérine est un acteur essentiel dans l'adhésion des cellules épithéliales par le biais de son domaine extracellulaire. Quant à sa queue cytoplasmique, elle se lie à la β -caténine afin d'assurer son propre transport vers la membrane plasmique et son association avec l' α -caténine et le cytosquelette d'actine. L'association de la E-cadhérine avec p120 la stabilise à la membrane et empêche sa dégradation endocytaire.

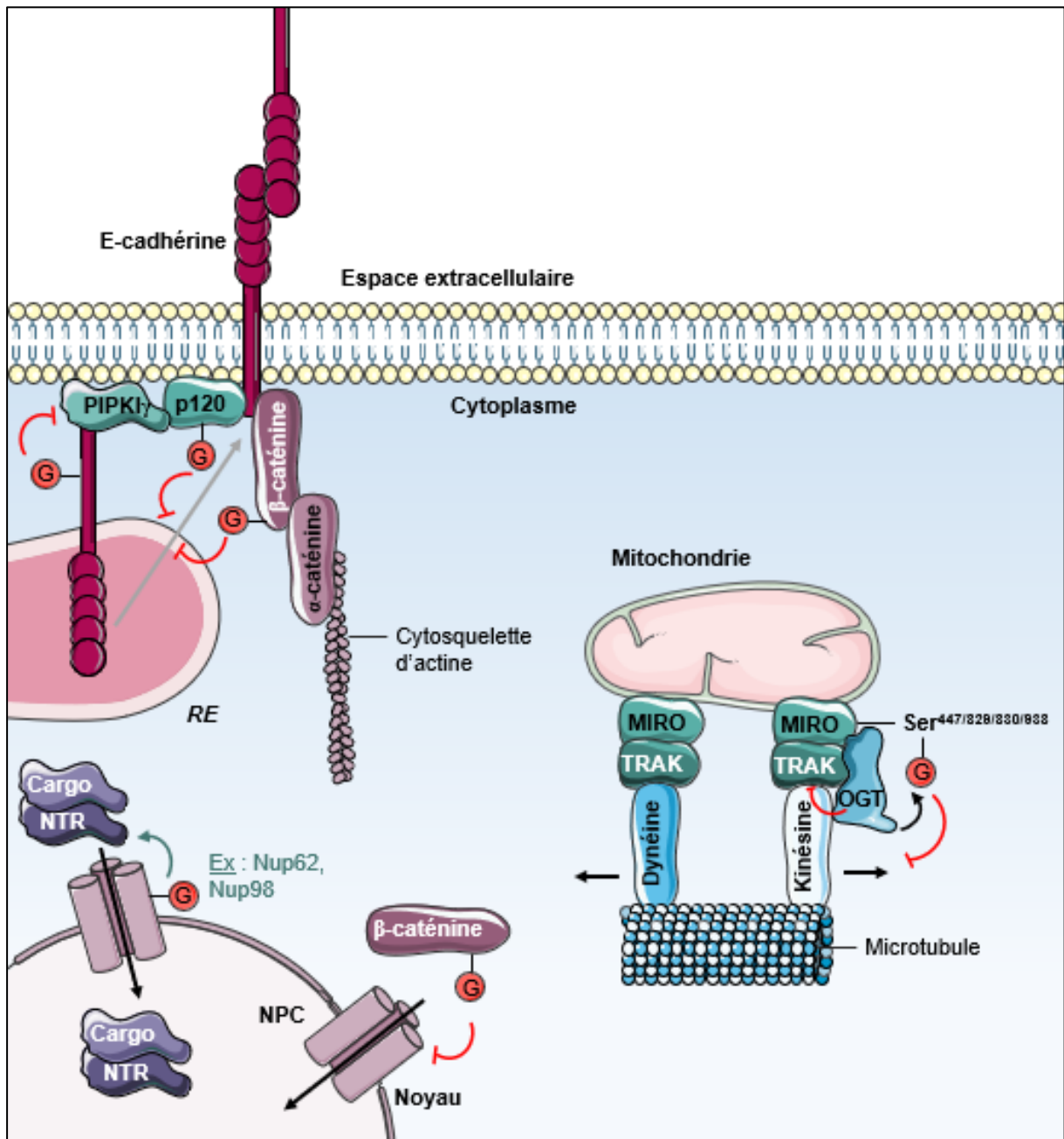


Figure 49 : Régulation du trafic intracellulaire par la *O*-GlcNAcylation. La *O*-GlcNAcylation régule le trafic intracellulaire de certaines protéines à la membrane plasmique et au noyau ainsi que la mobilité des mitochondries.

E-cadhérine : cadhérine Epithéliale ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **MIRO** : Mitochondrial RAS hOmolog gene family ; **NPC** : Nuclear Pore Complex ; **NTR** : Nuclear Transport Receptor ; **Nup** : Nucléopore ; **O-GlcNAcylation** : *O*-N-Acetylglucosaminylation ; **OGT** : β-*O*-GlcNAcTransférase ; **p120** : protéine de 120 kilodaltons ; **PIPKI γ** : PhosphatidylinositolPhosphate Kinase type γ ; **RE** : Réticulum Endoplasmique ; **Ser** : Sérine ; **TRAK** : TRAfficking Kinesin protein.

La *O*-GlcNAcylation de la β -caténine et de p120 pourrait réguler leur liaison à la E-cadhérine puisque la localisation membranaire de cette dernière est diminuée dans les cellules cancéreuses mammaires murines 4T1 (Gu et al., 2010). Enfin, PIPKI γ agit comme protéine d'échafaudage liant un complexe protéique adaptateur nécessaire au recrutement de la E-cadhérine au niveau des sites d'adhésion. La *O*-GlcNAcylation du domaine cytoplasmique de la E-cadhérine empêche sa liaison avec PIPKI γ , induit sa rétention dans le RE et l'apoptose des cellules MCF-7 (Geng et al., 2012) (Figure 49).

Les nucléoporines ont rapidement été identifiées comme groupe de protéines *O*-GlcNAcylées (Holt and Hart, 1986; Holt, Snow, et al., 1987; Hanover et al., 1987). Leur *O*-GlcNAcylation régulerait la sélectivité des pores nucléaires et le trafic nucléocytoplasmique des protéines. La *O*-GlcNAcylation de certaines protéines peut modifier leur conformation et ainsi leur capacité à lier les protéines du pore nucléaire. En ce sens, la glycosylation de la β -caténine diminue sa translocation nucléaire dans les cellules DU-14 (Sayat et al., 2008) (Figures 45 et 49).

La distribution des mitochondries est déterminée par la régulation de leur motilité *via* l'interaction de la kinésine, de la dynéine et des protéines d'ancrage aux microtubules. Le complexe moteur/adaptateur mitochondrial joue un rôle central dans la régulation de ce mécanisme. Ainsi, la GTPase **MIRO** (**M**itochondrial **RhO** GTPase) interagit avec la protéine adaptatrice TRAK1/2 qui couple la kinésine et la dynéine à la mitochondrie. L'OGT interagit avec TRAK1 (Iyer et al., 2003), TRAK2, MIRO et la kinésine (Poza and Stephenson, 2011). L'OGT altère l'association entre TRAK1/2 et la kinésine, et engendre l'agrégation des mitochondries dans les fibroblastes COS-7 (Poza and Stephenson, 2011). Dans les neurones, la *O*-GlcNAcylation de MIRO sur les résidus Ser⁴⁴⁷, Ser⁸²⁹, Ser⁸³⁰ et Ser⁹³⁸ arrête la motilité des mitochondries (Pekkurnaz et al., 2014) (Figure 49).

7.5. Signalisation

Plusieurs études ont montré l'implication de la *O*-GlcNAcylation dans la signalisation cellulaire notamment en régulant la phosphorylation de plusieurs acteurs des voies PI3K/AKT/mTOR, MAPK ou encore NF- κ B (Figure 50). Réciproquement, l'OGT est régulée par les voies PI3K/AKT/mTOR et MAPK (cf.3.1.4 page 119).

Comme décrit précédemment, en réponse à l'insuline, l'OGT est transloquée à la membrane plasmique grâce à son domaine PPO et est activée par le récepteur IR. Selon le contexte physiopathologique, l'OGT cible et régule différents acteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR et notamment IRS-1 (Patti et al., 1999; Federici et al., 2002; Park et al., 2005; Klein et al., 2009; Whelan et al., 2010), PI3K (Federici et al., 2002), PDK1 (Whelan et al., 2010), AKT (Park et al., 2005; Kang et al., 2008, p.473; Wang et al., 2012; Shi et al., 2015), AMPK (Bullen et al., 2014; Ishimura et al., 2017), **4E-BP1** (**eiF4E** (eukaryotic translation initiation factor **4E**)-Binding Protein-1) (Miller et al., 2016) et RPS6 (Zeidan et al., 2010) (Figure 50).

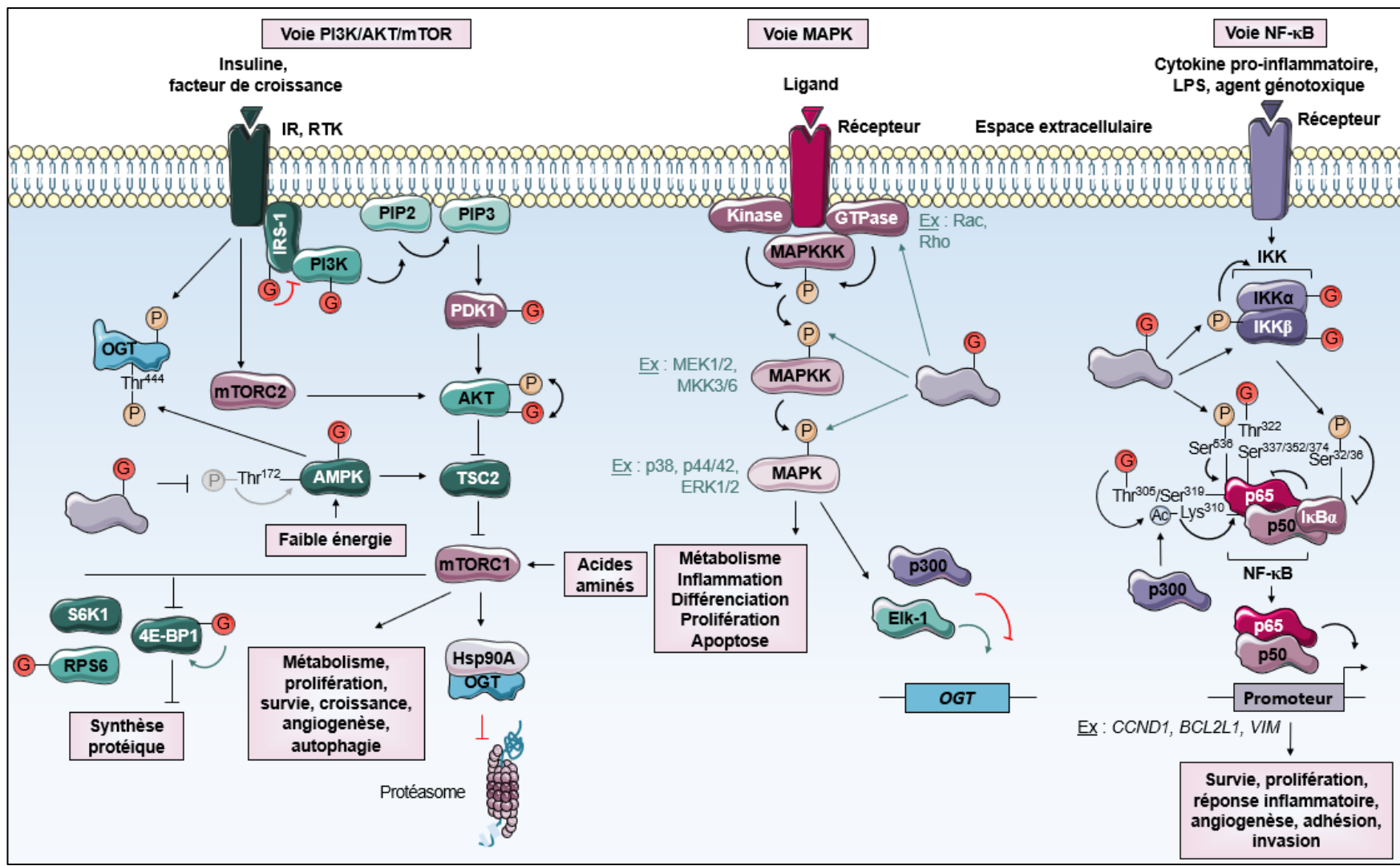


Figure 50 : Régulation de la signalisation cellulaire par O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation régule nombre d'acteurs des voies de signalisation MAPK, PI3K/AKT/mTOR et NF- κ B. Il existe un « *cross-talk* » puisque l'expression, l'activité et la localisation subcellulaire de l'OGT sont également régulées par les voies MAPK et PI3K/AKT/mTOR.

4E-BP1 : eukaryotic translation initiation factor **4E-Binding Protein 1** ; **Ac** : Acétyle ; **AMPK** : Adenosine MonoPhosphate-activated protein Kinase ; **BCL2L1** : *B-Cell Lymphoma 2-Like protein 1* ; **CCND1** : *CyClin D1* ; **Elk-1** : Ets like 1 ; **ERK** : Extracellular signal-Regulated Kinase ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **GTPase** : Guanosine TriPhosphate hydrolase ; **Hsp90A** : Heat shock protein 90A ; **I κ B α** : Inhibitory κ B α ; **IKK** : Inhibitory KappaB Kinase ; **IR** : Insulin Receptor ; **IRS-1** : IR Substrate 1 ; **kDa** : kiloDalton ; **LPS** : LipoPolySaccharide ; **Lys** : Lysine ; **MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase ; **MAPKK** : MAPK Kinase ; **MAPKKK** : MAPKK Kinase ; **MEK** : MAPK/ERK Kinase ; **MKK** : MAPKK ; **mTOR** : mammalian Target Of Rapamycin ; **mTORC** : mTOR Complex ; **NF- κ B** : Nuclear Factor κ B ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétylGlucosaminylation ; **OGT** : β -O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **p300** : protéine de 300 kDa ; **p38** : protéine de 38 kDa ; **p44/42** : protéine de 44/42 kDa ; **p50** : protéine de 50 kDa ; **p65** : protéine de 65 kDa ; **PDK1** : Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 ; **PI** : Phosphatidylinositol ; **PI3K** : PI-3-Kinase ; **PIP2** : PI-4,5, BisPhosphate ; **PIP3** : PI-3,4,5 TriPhosphate ; **RAC** : RAS-related C3 botulinum toxin substrate ; **RHO** : RAS HOmolog gene family ; **RPS6** : Ribosomal Protein of the Small subunit 6 ; **RTK** : Récepteur Tyrosine Kinase ; **S6K1** : S6 Kinase 1 ; **Ser** : Sérine ; **Thr** : Thréonine ; **TSC2** : Tuberous SCLerosis 2 ; **VIM** : VIMentine.

Le dialogue (« *cross-talk* ») entre la O-GlcNAcylation et la voie de signalisation mTOR dans le contexte physiopathologique du côlon a été décrite *in vitro* et *in vivo* dans l'article original (en page 321) :

[Very N, Steenackers A, Dubuquoy C, Vermuse J, Dubuquoy L, Lefebvre Tand El Yazidi-Belkoura I. \(2018\). Cross regulation between mTOR signaling and O-GlcNAcylation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 50 \(3\) : 213-222.](#)

Nous avons montré dans cette étude une corrélation positive des niveaux d'OGT et de mTOR activé (phosphorylation sur la Ser²⁴⁴⁸) *in vitro* dans les lignées coliques non cancéreuses CCD 841 CoN et cancéreuses HCT116, et *in vivo* dans des tissus colorectaux de souris C57BL/6 et ob/ob. L'activation de mTOR (phosphorylations activatrices de mTOR et de sa cible S6K1 sur la Thr³⁸⁹) est diminuée par l'inhibition de la GFAT (azasérine) et augmentée par le *knock-down* de l'OGA, et ce, dans les cellules HCT116 mais pas dans les cellules CCD 841 CoN.

Un état de l'art de cette thématique a été réalisé plus largement dans les maladies chroniques humaines dans la mini-revue (en page 333) :

[Very N, Vercoutter-Edouart AS, Lefebvre T, Hardivillé S, El Yazidi-Belkoura I. \(2018\). Cross-Dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR Axis in Human Chronic Diseases. *Front Endocrinol \(Lausanne\)*. 9:602.](#)

La cascade de signalisation MAPK est initiée par des signaux extracellulaires et conduit à l'activation d'une MAPK spécifique après l'activation successive d'une **MAPKKK (MAPKK (MAPK Kinase) Kinase)** et d'une MAPKK. La MAPKKK est généralement activée par interaction avec une petite GTPase ou par phosphorylation par des kinases en aval des récepteurs membranaires. L'élévation du niveau de O-GlcNAcylation globale augmente l'activité des petites GTPase Rac et Rho (Kawamura Harukiyo et al., 2004; Kneass and Marchase, 2005) ainsi que la phosphorylation et l'activation de différentes MAPKK (MEK1/2 et **MKK3/6 (MAPKK3/6)**, MAPK (p38, p44/42 et ERK1/2) et certaines cibles (synapsine) (Dehennaut et al., 2007; Rexach et al., 2008; Skorobogatko et al., 2014; Guo et al., 2015) (Figure 50).

Le facteur NF-κB contrôle de nombreux processus biologiques comme l'immunité innée, l'inflammation, la survie, la prolifération ou encore la tumorigenèse. La forme prototypique de NF-κB est l'hétérodimère p65/p50 séquestré dans un état inactif par l'inhibiteur **IκBα (Inhibitory κB α)** au niveau du cytoplasme. En réponse à la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, des LPS ou des agents génotoxiques, le complexe **IKK (Inhibitory KappaB Kinase)** constitué des kinases IKKα et IKKβ phosphoryle les résidus Ser³² et Ser³⁶ de IκBα et induit sa dégradation protéasomale. Une fois libéré, NF-κB est transloqué dans le noyau où il active l'expression de ses gènes cibles. Il a été montré que la O-GlcNAcylation active la voie de signalisation NF-κB en ciblant IKKα, IKKβ et p65 (Thr³⁰⁵, Ser³¹⁹, Thr³²², Ser³³⁷, Thr³⁵² et Ser³⁷⁴), et en augmentant leurs phosphorylations activatrices (Golks et al., 2007; W.H. Yang et al., 2008; Ma et al., 2013). La O-GlcNAcylation de p65 sur les résidus Thr³⁰⁵ et Ser³¹⁹ favorise son acétylation sur la Lys³¹⁰ par p300/CBP et son activité transcriptionnelle (Allison et al., 2012; Ma et al., 2017) (Figure 50).

7.6. Réponse au stress

En réponse à différentes formes de stress, l'activité de l'OGT et la *O*-GlcNAcylation des protéines sont rapidement et dynamiquement augmentées *in vitro* et *in vivo*. De plus, l'élévation de la *O*-GlcNAcylation avant ou après l'induction d'une lésion cellulaire protège les cellules et les tissus (Zou et al., 2007; Jones et al., 2008; Champattanachai et al., 2008; Ngoh et al., 2008; Ngoh et al., 2009). Plusieurs voies sont modulées par la *O*-GlcNAcylation afin de favoriser la survie cellulaire : la remise en conformation des protéines par les chaperons moléculaires ou encore la diminution du stress du *RE* par exemple (**Figure 51**).

Des conditions de stress peuvent déstabiliser le repliement des protéines cytoplasmiques. Les protéines exposent alors des régions hydrophobes qui peuvent interagir entre elles et induire des agrégats délétères résistants à la protéolyse. Les chaperons moléculaires aident au repliement des protéines altérées ou dirigent les protéines difficiles à replier vers le protéasome. En réponse au stress, la *O*-GlcNAcylation augmente l'expression de plusieurs chaperons moléculaires dont les protéines de choc thermique Hsp40, Hsp70 ou encore Hsp72 (Zachara et al., 2004; Guinez et al., 2007; Kazemi et al., 2010). C'est l'inhibition de GSK3- β par l'OGT et la diminution subséquente de la phosphorylation inhibitrice du facteur de transcription **HSF1** (**H**eat **S**hock **F**actor **1**) sur la Ser³⁰³ qui expliquerait le mécanisme d'induction de l'expression des Hsp (Kazemi et al., 2010). La *O*-GlcNAcylation protège les protéines cibles également en favorisant directement leur interaction avec des protéines Hsp grâce à leurs propriétés lectiniques (Guinez et al., 2004; Guinez et al., 2007). A cela s'ajoute que, dans des conditions d'hyperthermie, l'OGT *O*-GlcNAcyle préférentiellement les protéines dénaturées (K.-C. Sohn et al., 2004) (**Figure 51**).

L'accumulation des protéines mal conformées dans le *RE* entraîne une réponse **UPR** (**U**nfolded **P**rotein **R**esponse). Cet UPR se met notamment en place à partir de l'activation de la protéine transmembranaire du *RE* PERK. PERK phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α sur la Ser⁵¹ et inhibe la synthèse protéique globale à l'exception de celle faisant intervenir certains ARNm impliqués dans la réponse au stress tel que celui codant la protéine pro-apoptotique **CHOP** (**C**CAAT/**e**nhancer-binding protein **H**omologous **P**rotein). Ainsi, dans le cas où l'UPR ne parvient pas à rétablir l'homéostasie du *RE*, elle induit l'apoptose en activant CHOP. La glycosylation de eIF2 α sur les résidus Ser²¹⁹, Thr²³⁹ et Thr²⁴¹ empêche sa phosphorylation par PERK sur la Ser⁵¹ et l'activation subséquente de CHOP (Jang et al., 2015) (**Figure 51**). Une déprivation en glucose peut également induire le stress du *RE* des cellules cancéreuses. La réponse adaptative consiste en l'activation du facteur de transcription **HIF1 α** (**H**ypoxia-**I**nducible **F**actor-**1** **α**), un régulateur clé de la glycolyse aérobie. La *O*-GlcNAcylation stabilise HIF1 α en réduisant son hydroxylation et sa dégradation protéasomale (Ferrer et al., 2014) (**Figure 52**). Enfin, pour rappel, en cas de stress

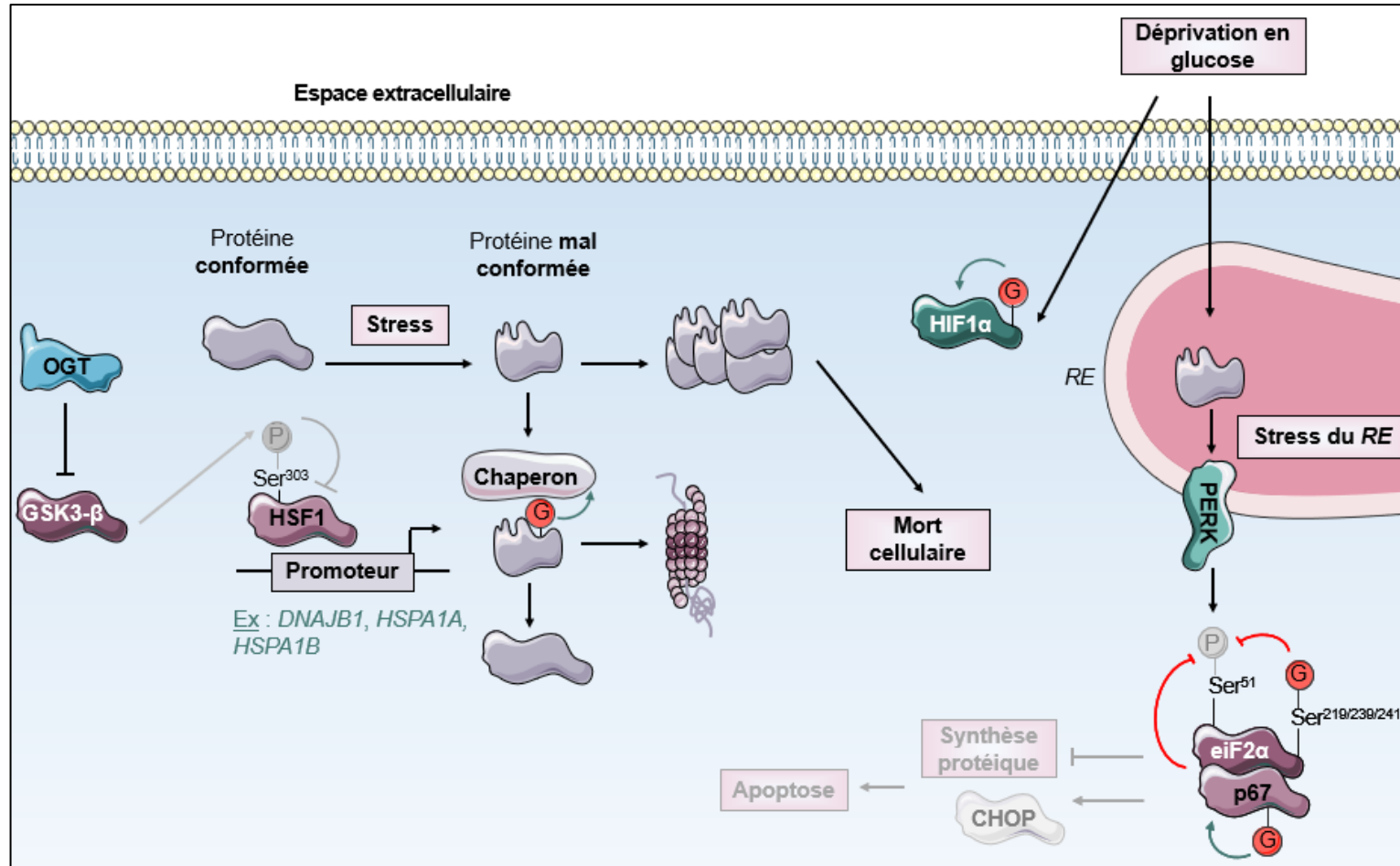


Figure 51 : Régulation de la réponse au stress par O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation favorise la survie cellulaire en régulant la remise en conformation des protéines par les chaperons moléculaires et en diminuant le stress du RE.

DNAJB1 : *DNAJ protein homolog B1* ; **eIF2α** : eukaryotic Initiation Factor 2α ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **GSK3-β** : Glycogene Synthase Kinase 3β ; **HIF1α** : Hypoxia-Inducible Factor 1α ; **HSPA** : *Heat Shock Protein family A* ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétylGlucosaminylation ; **OGT** : β-O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **p67** : protéine de 67 kilodaltons ; **PERK** : Protein kinase R-like *Endoplasmic Reticulum* Kinase ; **RE** : *Réticulum Endoplasmique* ; **Ser** : Sérine.

7.7. Apoptose

Le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur les processus apoptotiques n'est pas totalement élucidé et dépend du type cellulaire et du contexte physiopathologique étudiés. Plusieurs protéines impliquées dans l'apoptose sont directement *O*-GlcNAcylées telles que les protéines pro-apoptotiques TRAIL-R, BMI-1, tBid, les pro-caspases-3 et pro-caspases-9, **DFF40 (DNA Fragmentation Factor 40)** et les facteurs de transcription AP-1 et p53, la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et les acteurs des voies de survie PI3K/AKT et NF-κB (**Figure 52**).

La glycosylation du récepteur TRAIL-R1 sur la Ser⁴²⁴ (H. Lee et al., 2019) et celle de TRAIL-R2 (S.-Z. Yang et al., 2020) augmenterait et inhiberait respectivement l'apoptose induite par TRAIL. La *O*-GlcNAcylation stabilise BMI-1 sur la Ser²⁵⁵ (Y. Li et al., 2017). tBid est également stabilisé par *O*-GlcNAcylation favorisant l'apoptose des cellules de lymphome du manteau (**MCL, Mantle Cell Lymphoma**) (Luanpitpong et al., 2018). La *O*-GlcNAcylation des pro-caspases-3 et -9 les inhibe en empêchant leur clivage en caspases initiateur et effectrice actives (Liu et al., 2018) DFF40, la principale endonucléase responsable de la fragmentation oligosomale de l'ADN durant l'apoptose nucléaire, est également *O*-GlcNAcylée. Or, dans les cellules HBP-ALL, la glycosylation de DFF40 empêche son clivage par les caspases-3 et caspases-7 effectrices, sa libération du complexe formé avec son inhibiteur DFF45 et donc la fragmentation de l'ADN (Johnson et al., 2014) AP-1 régule notamment l'expression des protéines pro-apoptotiques FasL et Bim. Il s'agit d'un hétérodimère composé des facteurs de transcription c-Jun et c-Fos qui sont tous deux la cible de la *O*-GlcNAcylation (H. Tai et al., 2004). En réponse au peptide Aβ, la glycosylation de c-Fos sur la Ser⁵⁶ et la Ser⁵⁷ augmenterait sa stabilité, son activité transcriptionnelle sur **BCL2L1 (BCL2-Like protein 11)** codant Bim et induirait l'apoptose des cellules de neuroblastome SH-SY5Y (Choi et al., 2019). D'autre part, AP-1 est activé par l'OGT après dépolarisation des cellules de neuroblastomes NG-108-15 (Song et al., 2008). La *O*-GlcNAcylation peut également moduler la stabilité du suppresseur de tumeurs p53 dépendamment du statut mutationnel de *TP53*, du site modifié, du type cellulaire et du traitement chimiothérapeutique administré (cf. **1 page 206**). Enfin, Bcl-2 est *O*-GlcNAcylé dans les cardiomyocytes de rats diabétiques et participerait à l'initiation de l'apoptose (Marsh et al., 2013). Le facteur de transcription NF-κB active la transcription de nombreux gènes cibles dont *BCL2L1* codant la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L. Ainsi, le *knock-down* de l'OGT inactive la voie de signalisation de NF-κB (cf. **7.5 page 175**), diminue l'expression de Bcl-x_L et induit l'apoptose des cellules cancéreuses pancréatiques (Ma et al., 2013) (**Figure 52**).

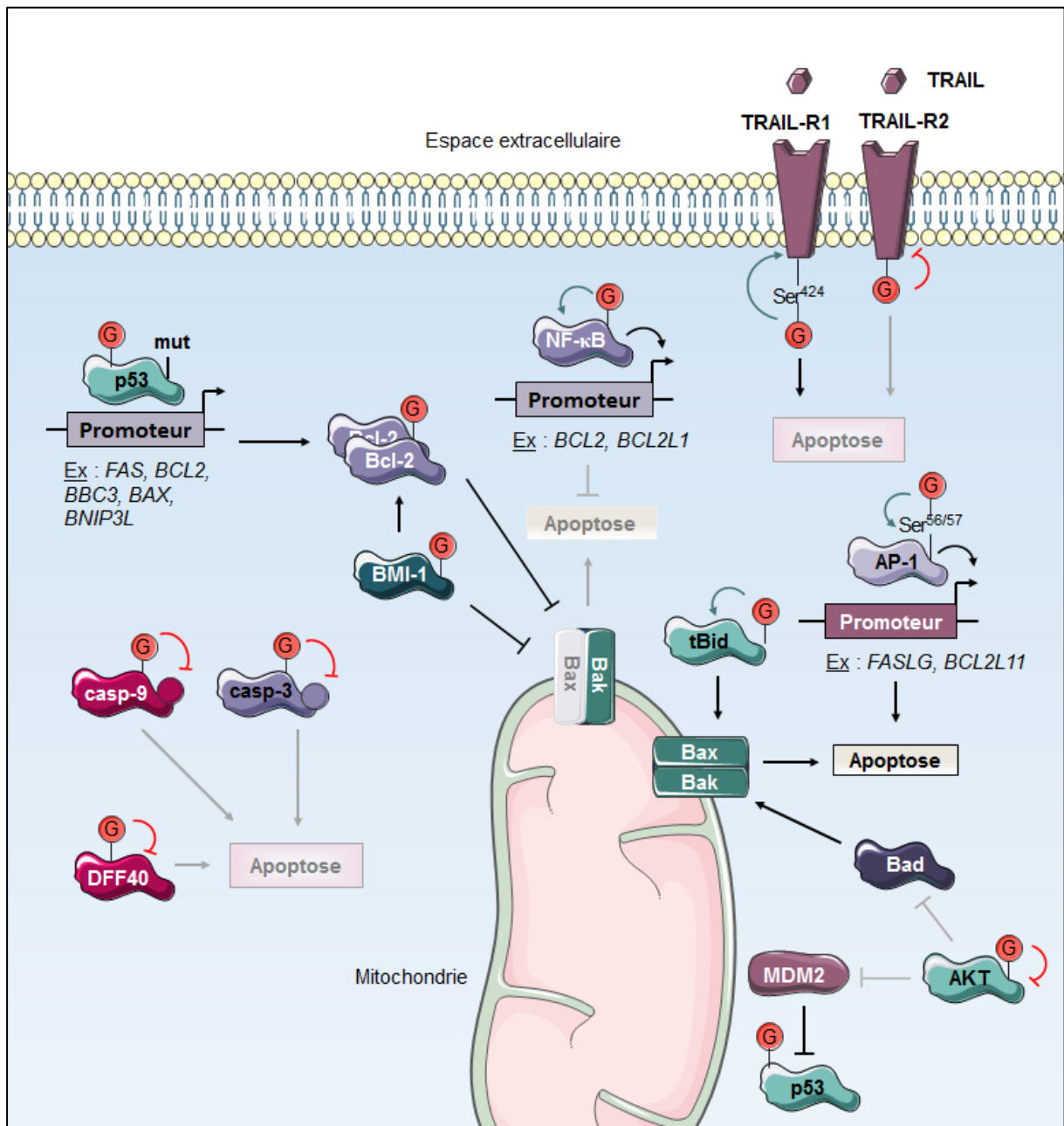


Figure 52 : Régulation de l'apoptose par la O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation régle l'apoptose en modifiant différentes protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques.

AP-1 : Activator Protein 1 ; **Bad** : Bcl-2 associated agonist of cell death ; **Bak** : Bcl-2 homologous antagonist killer ; **Bax** : Bcl-2-associated x ; **BBC3** : *BCL2 Binding Component 3* ; **Bcl-2** : B-cell lymphoma 2 ; **BCL2L** : *BCL2-Like protein* ; **BNIP3L** : *BCL2 Interacting Protein 3-Like* ; **BMI-1** : B-cell-specific Moloney murine leukemia virus Insertion site 1 ; **casp** : caspase ; **DFF40** : Deoxyribonucleic acid Fragmentation Factor 40 ; **FASLG** : *FAS LiGand* ; **G** : N-acétylGlucosamine ; **mut** : muté ; **NF-κB** : Nuclear Factor κB ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétylGlucosaminylation ; **OGT** : β-O-N-acétylGlucosamineTransférase ; **p53** : protéine de 53 kilodaltons ; **Ser** : Sérine ; **tBid** : truncated BH3 interacting-domain death agonist ; **TRAIL** : Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand ; **TRAIL-R** : TRAIL-Receptor.

D'autre part, la régulation par *O*-GlcNAcylation de la kinase anti-apoptotique AKT de la voie PI3K/AKT (cf. 6.2.4 page 162) semble en un régulateur clé de l'apoptose. En effet, AKT phosphorylé et activé favorise la survie cellulaire en phosphorylant et inactivant différentes protéines cibles pro-apoptotiques telles que Bad (Bcl-2 associated agonist of cell death) sur la Ser¹³⁶ et MDM2 sur la Ser¹⁸⁶ (del Peso et al., 1997; Ogawara et al., 2002). MDM2 ubiquitinye et induit la dégradation protéasomale du facteur de transcription p53 impliqué dans la régulation des gènes apoptotiques *FAS*, *BCL2*, *BBC3*, *BAX* et *BNIP3L*. La régulation de AKT par la *O*-GlcNAcylation conduit à l'inhibition de l'apoptose dans le contexte physiopathologique du cancer mais à son induction dans celui du DT2 et des maladies neurodégénératives. L'ensemble de ces mécanismes ont été décrits dans la mini-revue (en page 333) :

[Very N, Vercoutter-Edouart AS, Lefebvre T, Hardivillé S, El Yazidi-Belkoura I. \(2018\). Cross-Dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR Axis in Human Chronic Diseases. *Front Endocrinol \(Lausanne\)*. 9:602.](#)

Il semblerait que la mOGT et la sOGT aient respectivement des propriétés pro- et anti-apoptotiques. Fletcher et collaborateurs (2002) ont initialement identifié le gène *OGT* dépourvu de la séquence codant son domaine N-ter et correspondant à l'isoforme *sOGT* comme un facteur protecteur contre l'apoptose induite par la déplétion en facteurs de croissance dans les cellules progénitrices myéloïdes 32Dcl3 (Fletcher et al., 2002). En parallèle, Shin et collaborateurs (2011) montrent que la surexpression de la *mOGT* induit l'apoptose dans différents types cellulaires. Cette activité pro-apoptotique est dépendante de la présence de sa séquence d'adressage mitochondriale MTS N-ter et de son domaine catalytique C-ter (Shin et al., 2011). Ainsi, il est postulé que la *sOGT* pourrait contrecarrer l'activité pro-apoptotique de la *mOGT* pour coordonner les voies de survie cellulaire.

7.8. Architecture cellulaire

Le cytosquelette est une structure qui permet de maintenir la forme et l'organisation interne de la cellule. Il fournit également un support mécanique permettant à la cellule de se diviser et de se mouvoir. Il se compose de trois grandes classes d'éléments qui diffèrent en taille et en composition protéique : les microtubules composés de tubuline, les microfilaments composés d'actine et les filaments intermédiaires composés notamment de neurofilaments, de desmine, de kératine, de vimentine ou encore de lamine.

L'ensemble de ces protéines est *O*-GlcNAcylé (Chou and Omary, 1994; Walgren et al., 2003; Cieniewski-Bernard et al., 2004; Cheung and Hart, 2008; Slawson et al., 2008; Ramirez-Correa et al., 2008; Wang, Udeshi, Slawson, et al., 2010; Cieniewski-Bernard et al., 2012). Cette MPT est également retrouvée sur les protéines de pontage ou régulatrices du cytosquelette telles que la protéine 4.1 (Holt, Haltiwanger, et al., 1987), la taline (Hagmann et al., 1992), les protéines associées aux microtubules (**MAP**, **Microtubule-Associated Protein**) (Ding and Vandr , 1996), l'ankyrine (Zhang and Bennett, 1996), la plakoglobine (Hatsell et al., 2003) ou encore la troponine (Cieniewski-Bernard et al., 2012).

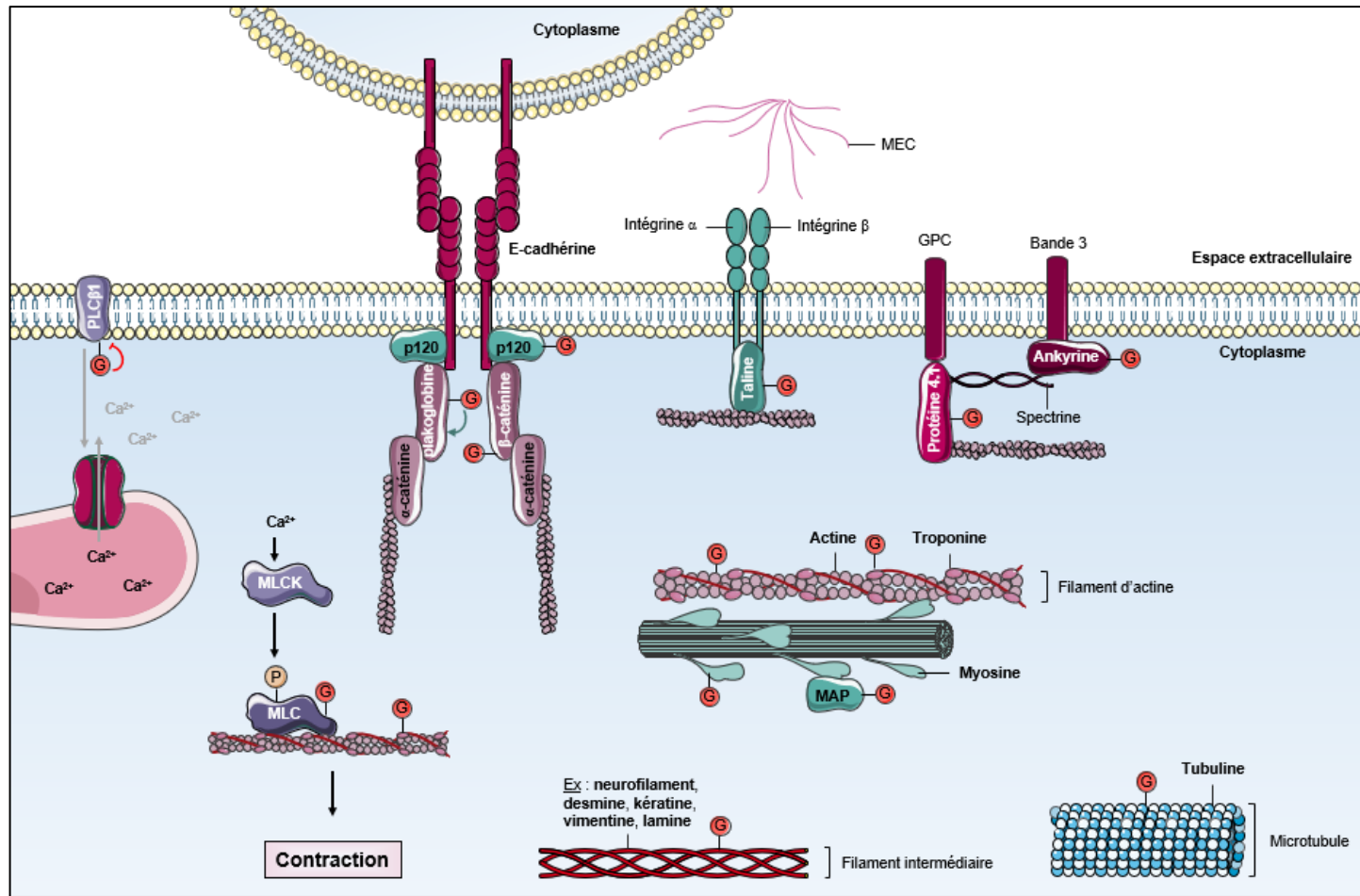


Figure 53 : Organisation de l'architecture cellulaire par O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation contrôle l'organisation des filaments d'actine, des microtubules et des filaments intermédiaires.

AKB : Aurora Kinase B ; **Ca²⁺** : Calcium (II) ; **E-cadhérine** : cadhérine Epithéliale ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **GPC** : pre-Glycoprotein Polyprotein Complex ; **K18** : Kératine 18 ; **MAP** : Microtubule-Associated Protein ; **MEC** : Matrice ExtraCellulaire ; **MLC** : Myosin Light-Chain ; **MLCK** : MLC Kinase ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétylGlucosaminylation ; **OGA** : β-O-GlcNAcAse ; **OGT** : β-O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **p120** : protéine de 120 kilodaltons ; **PLCβ1** : PhosphoLipase C β1 ; **PP1c** : Protein Phosphatase 1c.

La *O*-GlcNAcylation participe à la régulation de l'organisation des filaments intermédiaires, à l'adhésion cellulaire et à l'activité contractile des fibres musculaires (**Figure 53**).

Au cours de la mitose, la vimentine subit une série de phosphorylations au niveau de son domaine principal permettant la déstabilisation et la ségrégation du filament intermédiaire dans les cellules filles. La phosphorylation des kératines K8 et K18 augmente également leur solubilité et leur dégradation (Omary et al., 2006). L'OGT et l'OGA forment un complexe transitoire avec la kinase AKB et la phosphatase PP1c au niveau du « *midbody* » lors de la cytokinèse afin de réguler la réciprocity phosphorylation/*O*-GlcNAcylation de la vimentine (Slawson et al., 2008; Z. Li et al., 2017) (**Figure 54**). La *O*-GlcNAcylation de K18 sur la Ser³⁰ augmente sa phosphorylation sur la Ser³³, sa solubilité et sa dégradation (Srikanth et al., 2010; Kakade et al., 2016) (**Figure 53**).

La plakoglobine et la β -caténine sont des protéines des desmosomes et des jonctions d'adhérence reliant la cadhérine membranaire à l'actine du cytosquelette (Prakash and Swaminathan, 2015). La *O*-GlcNAcylation stabilise la plakoglobine et augmente l'adhésion intercellulaire des kératinocytes (Hu et al., 2006). En régulant la β -caténine et la E-cadhérine, la *O*-GlcNAcylation participe également à la modulation de l'adhésion cellulaire (cf. 8.4.4.2 page 209) (**Figures 49 et 53**).

La phosphorylation de la chaîne légère de la myosine par **MLCK (MLC (Myosin Light-Chain) Kinase)** permet son interaction avec l'actine, son coulisement puis la contraction cellulaire. MLCK est une kinase dépendante du Ca²⁺. La voie du Ca²⁺ et la contraction pourrait être régulées par la *O*-GlcNAcylation. Ainsi, dans le muscle squelettique, la *O*-GlcNAcylation de PLC β 1 diminue son activité enzymatique et le relargage du Ca²⁺ à partir des stocks intracellulaires (Kim et al., 2006). De plus, la glycosylation des MLC et des troponines est associée à une augmentation de la force contractile (Cieniewski-Bernard et al., 2012) (**Figure 53**).

7.9. Cycle cellulaire

Le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation du cycle cellulaire a initialement été proposé par Kears et Hart (1991). Ces auteurs ont observé une augmentation rapide et transitoire de la *O*-GlcNAcylation des protéines nucléaires et une diminution concomitante de celle des protéines cytoplasmiques lors de l'activation mitogène des lymphocytes T murins (Kears and Hart, 1991). Ultérieurement, plusieurs études ont montré que l'inactivation d'une des enzymes de la voie HBP perturbe la prolifération cellulaire (Boehmelt, Wakeham, et al., 2000; O'Donnell et al., 2004; Slawson et al., 2005; Olivier-Van Stichelen, Guinez, et al., 2012). Ainsi, la régulation de la dynamique de la *O*-GlcNAcylation est essentielle à la progression cellulaire dans les différentes phases du cycle. De manière générale, le niveau global de *O*-GlcNAcylation fluctue tout au long du cycle : il augmente entre les phases G₀ et S, diminue en début de phase S, réaugmente jusqu'à atteindre un maximum en début de phase M puis rediminue à nouveau (**Figure 54**).

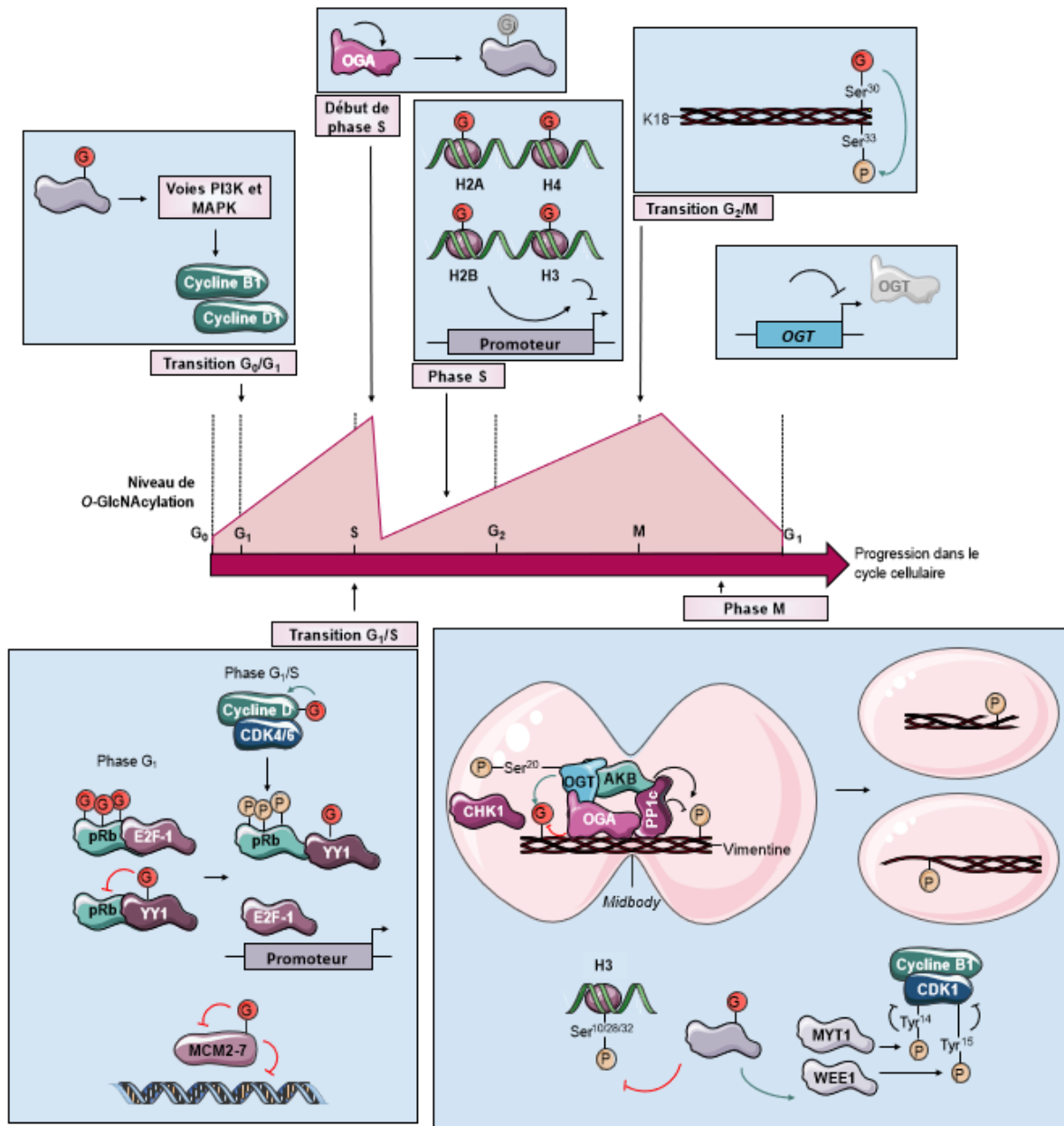


Figure 54 : Régulation du cycle cellulaire par la O-GlcNAcylation. Le niveau de O-GlcNAcylation varie en fonction des différentes phases du cycle cellulaire et permet sa progression.

ASH2 : Absent, Small or Homeotic discs 2 ; **AKB** : Aurora Kinase B ; **ATM** : Ataxia Telangiectasia Mutated ; **CCNB1** : *Cyclin B1* ; **CDK** : Cyclin-Dependent Kinase ; **CHK** : CHeckpoint Kinase ; **DSB** : Double-Strand Break ; **G** : Gap phase ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **H** : Histone ; **HCF-1** : Host Cell Factor 1 ; **HCF-1_C** : domaine Carboxy-terminal de **HCF-1** ; **HCF-1_N** : domaine amino-terminal de **HCF-1** ; **K18** : Kératine 18 ; **MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase ; **MCM** : MiniChromosome Maintenance protéin ; **mSIN3A** : mammalian Stress-activated protein kinase **Interacting** protein 3A ; **MYT1** : Membrane-associated TYr- and threonine-specific CDC2-inhibitory kinase 1 ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcetylGlucosamylation ; **OGA** : β -O-GlcNAcAse ; **OGT** : β -O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **PI3K** : PhosphatidyInositol-3-Kinase ; **PP** : Protein Phosphatase ; **pRB** : protéine du RétinoBlastome ; **S** : Synthesis phase ; **Ser** : Sérine ; **Tyr** : Tyrosine ; **YY1** : Yin Yang 1.

Au cours de la transition G₀/G₁ : La stimulation mitogénique provoque une augmentation rapide des niveaux d'OGT et de *O*-GlcNAcylation des protéines nucléocytoplasmiques, participant à l'activation des voies PI3K et MAPK, à l'augmentation des niveaux de cyclines D1 et B1 et à l'entrée des cellules MCF-7 quiescentes dans le cycle cellulaire (Olivier-Van Stichelen, Drougat, et al., 2012) (Figure 54).

Au cours de la transition G₁/S : L'OGT est nucléaire et péri-nucléaire, et l'OGA est cytoplasmique dans les cellules HeLa (Slawson et al., 2005). La *O*-GlcNAcylation est nécessaire à cette transition puisque sa diminution provoque l'arrêt en phase G₁ des fibroblastes NIH 3T3-L1 synchronisés en phases M ou G₁ tardive mais pas en début de phase S (Slawson et al., 2005). L'ensemble des sous-unités du complexe hexamérique MCM2-7 jouant un rôle essentiel dans l'initiation de la réplication de l'ADN est *O*-GlcNAcylé. La glycosylation perturbe la liaison à la chromatine de MCM2, MCM6 et MCM7, déstabilise le complexe MCM2-7 sans pour autant affecter la réplication de l'ADN des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 (Leturcq et al., 2018). Dans les cellules HeLa, l'hypo-*O*-GlcNAcylation et l'hyper-phosphorylation de pRB par les complexes cycline D/CDK4/CDK6 provoque le relargage du facteur de transcription E2F-1 impliqué dans la régulation des gènes de réplication (Wells et al., 2011). La *O*-GlcNAcylation de YY1 induit également sa dissociation de pRB et l'augmentation de son activité transcriptionnelle dans les cellules CASMC (Hiromura et al., 2003). La glycosylation de la cycline D1 augmente sa stabilité dans les cellules MCF-7 (Masclaf et al., 2019) (Figure 54).

Au cours de la phase S : Au début de la phase S, l'activité de l'OGA est augmentée et corrèle à une diminution du niveau de *O*-GlcNAcylation des protéines dans les cellules MCF-7 (Drougat et al., 2012). Les niveaux d'OGT, de *O*-GlcNAcylation globale (Yang et al., 2012) et de celle de certaines protéines (histones H2A, H2B, H3 et H4) (Zhang et al., 2011) sont faibles en début de phase S puis augmentent progressivement jusqu'à la phase G₂. La modification de H2B et H3 induirait respectivement l'activation et la répression génique (Kaleem et al., 2008; Fujiki et al., 2011) (cf. 7.1 page 166) (Figures 48 et 54).

A la transition G₂/M : L'entrée en méiose des ovocytes de xénope (également appelée mécanisme de maturation) est analogue à la transition G₂/M des cellules non germinales et peut être induite par stimulation hormonale par la progestérone (Schorderet-Slatkine, 1972). La stimulation par la progestérone des ovocytes est accompagnée d'une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation globale (Lefebvre et al., 2004) participant à leur maturation (Dehennaut et al., 2007; Dehennaut, Hanouille, et al., 2008). La *O*-GlcNAcylation de K8 et K18 est augmentée au cours de la transition G₂/M et participe au désassemblage des filaments intermédiaires (Chou and Omary, 1993; Chou and Omary, 1994) (cf. 7.8 page 183) (Figures 53 et 54).

Au cours de la phase M : Les niveaux d'OGT et de *O*-GlcNAcylation globale des protéines atteignent un maximum au début de la phase M puis diminuent au cours de la mitose et réaugmentent lorsque les cellules entrent en phase G₁ (Slawson et al., 2005; Sakabe and Hart, 2010; Yang et al., 2012). La réduction du niveau d'OGT est concomitante à celle de son ARNm (Whitfield et al., 2002). La perturbation de l'homéostasie de la *O*-GlcNAcylation conduit à des défauts de cytokinèse, d'aneuploïdie (Slawson et al., 2005), de formation du fuseau mitotique et de ségrégation chromatidienne (Yang et al., 2012; Lanza et al., 2016). Au cours la mitose, l'OGA nucléocytoplasmique est exclue des membranes nucléaires naissantes. L'OGT est stabilisée et relocalisée au niveau du fuseau mitotique et du « *midbody* » par phosphorylation de la Ser²⁰ par CHK1 (Slawson et al., 2005; Z. Li et al., 2017). où elle régule, avec l'OGA, l'organisation de la vimentine (Slawson et al., 2008; Z. Li et al., 2017) (cf. 7.8 page 183) (Figure 54). Le complexe cycline B/CDK1 est un régulateur clé de la progression en phase M. La *O*-GlcNAcylation diminue l'activité de CDK1 en favorisant ses phosphorylations inhibitrices sur les résidus Thr¹⁴ et Tyr¹⁵ par WEE1 et **MYT1** (Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific CDC2-inhibitory kinase 1) (Wang, Udeshi, Slawson, et al., 2010). Enfin, la glycosylation diminue les phosphorylations mitotiques de l'histone H3 sur les résidus Ser¹⁰, Ser²⁸ et Thr³² (Fong et al., 2012) (Figure 54).

7.10. Développement

Plusieurs études sur différents organismes tels que la drosophile, le poisson-zèbre, le xénope, le rat et la souris ont permis de comprendre l'implication de la *O*-GlcNAcylation dans l'embryogenèse et le développement et, plus particulièrement, au niveau cérébral et placentaire (Figure 55). L'OGT et l'OGA étant plus fortement exprimées dans ces tissus (Lubas et al., 1997; Gao et al., 2001; Okuyama and Marshall, 2003).

Le rôle essentiel de la *O*-GlcNAcylation dans l'embryogenèse a été mis en évidence sur des modèles de *KO* ubiquitaire des gènes codant l'OGT, l'OGA (cf. 2.2.4 page 113) ou des enzymes de la voie HBP telles que GFAT, GNPAT et PGM3 (cf. 4.2.2 page 140). Chez le xénope, le niveau de *O*-GlcNAcylation est élevé au cours de la segmentation, diminué au début de la gastrulation puis ré-augmenté au début de la fermeture du tube neural (Dehennaut et al., 2009). Cette régulation favoriserait respectivement, la prolifération cellulaire, les réarrangements du cytosquelette puis l'organogenèse (Figure 55). Chez le poisson-zèbre, Il existe six variants d'épissage alternatif de l'*OGTA* (var1-4) et de l'*OGTB* (var5 et var6) régulés différemment au cours du développement embryonnaire (Sohn and Do, 2005). Le *knock-down* de l'*OGTA-B* entraîne une morphologie aberrante des tissus endodermiques et de certains tissus mésodermiques et ectodermiques, une réduction de la taille du corps ainsi que du cerveau de l'embryon de poisson-zèbre (Webster et al., 2009).

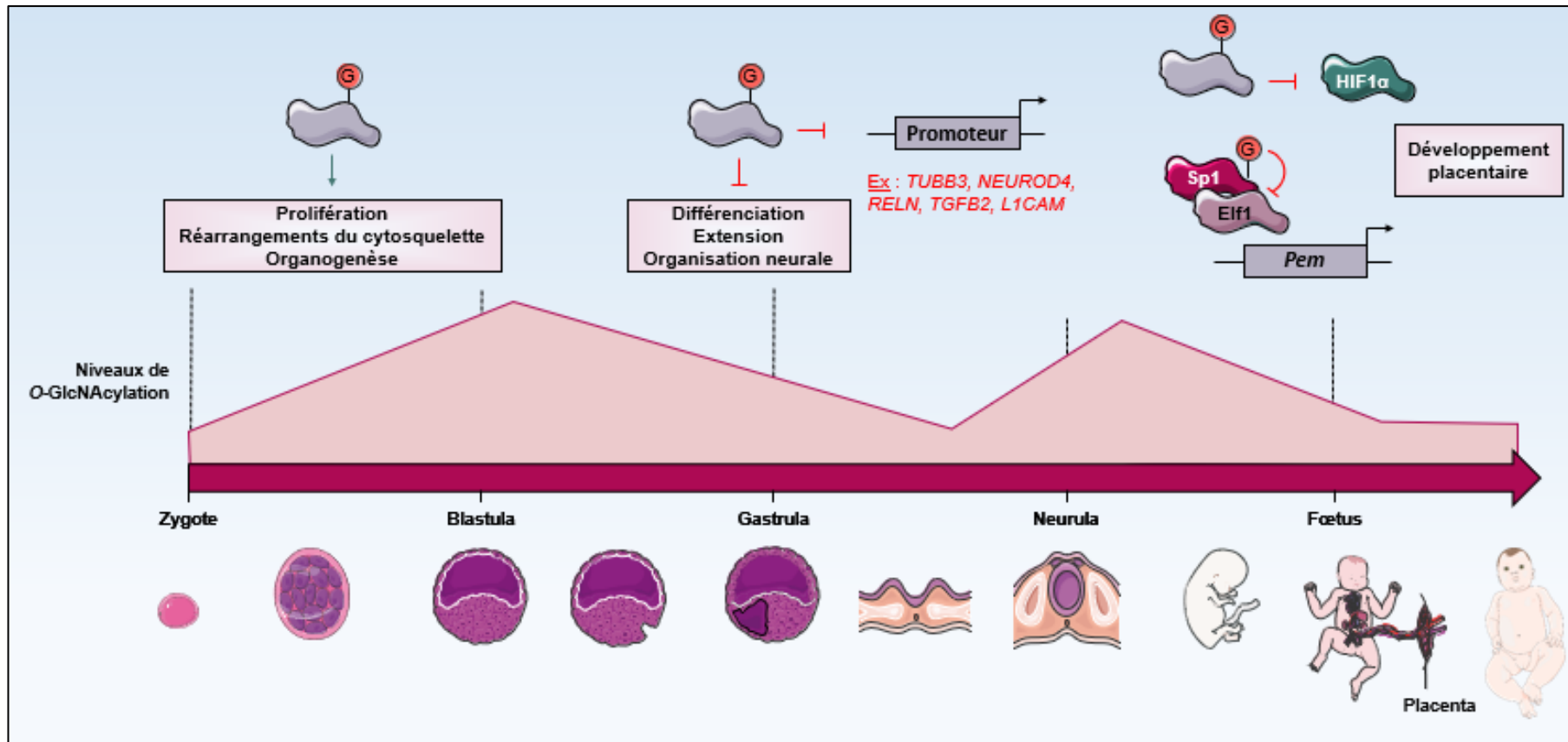


Figure 55 : Régulation du développement par la O-GlcNAcylation. Le niveau de O-GlcNAcylation varie en fonction du stade de développement. La O-GlcNAcylation inhibe le développement neuronal et placentaire.

Elf1 : E74-like factor 1 ; **G** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **HIF1 α** : Hypoxia-Inducible Factor 1 α ; **L1CAM** : L1 Cell Adhesion Molecule ; **NEUROD4** : NEUROgenic Differentiation 4 ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétyleGlucosaminylation ; **Pcm** : Placentae and embryos oncofetal ; **RELN** : RELeLiNe ; **Sp1** : Specificity protein 1 ; **TGFB2** : Transforming Growth Factor Beta 2 ; **TUBB3** : TUBuline Beta

O'Donnell et collaborateurs (2004) montrent que les souris *KO* pour l'*OGT* neuronal présentent un dysfonctionnement neuronal, une déficience de l'activité locomotrice et meurent dans les 10 jours post-natal (O'Donnell et al., 2004). Dans le cerveau de souris, la *O*-GlcNAcylation augmente, diminue puis se stabilise respectivement jusqu'à 5, 7 et 13 mois post-natal (Rex-Mathes et al., 2001). En revanche, dans le cerveau de rat, le niveau de *O*-GlcNAcylation augmente jusqu'au 15^{ème} jour embryonnaire, diminue progressivement jusqu'à 3 mois post-natal puis se stabilise au cours de la maturation jusqu'à 2 ans post-natal (Liu et al., 2012). Ainsi, la diminution et l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation respectivement promeut et inhibe la différenciation, l'extension et l'organisation neuronale dans le système nerveux central (Lagerlöf, 2018). Plus particulièrement, l'inhibition de l'*OGT* par l'*Ac*₄-5S-GlcNAc active les gènes neuronaux tels que *TUBB3* (*TUBulin Beta-3 chain*), *NEUROD4*, *RELN* (*REeLiNe*), *TGFB2* ou *L1CAM* (*L1 Cell Adhesion Molecule*) (Andres et al., 2017) (Figure 55).

Le placenta est indispensable aux échanges nutritifs entre la circulation maternelle et le chorion fœtal. Chez la souris, le *KO* de l'*OGA* conduit à des défauts de la vasculogenèse placentaire, un retard de la croissance fœtale et la mortalité néonatale en diminuant la stabilité de HIF1 α et la transcription des gènes cibles (Yang et al., 2012; Y.R. Yang, Jang, et al., 2015). Dans les cellules de neuroblastome de rat B103, la *O*-GlcNAcylation inhibe l'interaction entre les facteurs Sp1 et Elf1, et leur activité transcriptionnelle sur le promoteur du gène *Placentae and embryos oncofetal (Pem)* codant une protéine Hox spécifique au tissu placentaire (Lim and Chang, 2009b) (Figure 55).

8. Dérégulation de la *O*-GlcNAcylation dans les pathologies

Par son implication dans la régulation des mécanismes cellulaires fondamentaux, la dérégulation de l'homéostasie de la *O*-GlcNAcylation participe au développement de nombreuses pathologies telles que les désordres métaboliques, les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires ou encore le cancer. **L'implication de la dérégulation de la *O*-GlcNAcylation dans le développement de ces pathologies par la modulation de la voie PI3K/AKT/mTOR a été décrite dans la mini-revue (en page 333) :**

[Very N, Vercoutter-Edouart AS, Lefebvre T, Hardivillé S, El Yazidi-Belkoura I. \(2018\). Cross-Dysregulation of *O*-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR Axis in Human Chronic Diseases. *Front Endocrinol \(Lausanne\)*. 9: 602.](#)

8.1. Désordres métaboliques

La consommation de sucres a triplé au cours des 50 dernières années et cette augmentation qui devrait se poursuivre notamment dans les économies émergentes favorise l'incidence de pathologies associées (Lustig et al., 2012). En effet, la consommation chronique d'un régime occidental (« *Western style diet* ») riche en acides gras saturés et en sucres est associée à une homéostasie anormale du glucose et au développement de désordres métaboliques tels que les syndromes métaboliques ou le DT2 (van Dam et al., 2002; Esmailzadeh et al., 2007; Shang et al., 2012).

Le syndrome métabolique qui est le plus souvent lié au mode de vie se caractérise par la présence d'au moins trois des cinq critères suivants : obésité abdominale, hypertension artérielle, taux élevé de triglycérides, faible taux de cholestérol à HDL (High-Density Lipoprotein) et hyperglycémie à jeun (Swarup and Zeltser, 2019). L'hyperglycémie associée au syndrome métabolique peut alors induire une augmentation anormale de la O-GlcNAcylation des protéines. Cette glycosylation pourrait participer à la progression de la maladie vers le DT2 (Figure 56) ou les maladies associées à la toxicité du glucose telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires.

En réponse à une augmentation de la glycémie, les cellules β des îlots de Langerhans sécrètent l'insuline. Cette hormone stimule l'absorption du glucose *via* des transporteurs GLUT, son utilisation et/ou son stockage sous forme de glycogène (par la glycogénogenèse) ou de triglycérides (par la glycolyse et la lipogenèse) respectivement au niveau du foie et, du muscle squelettique et du tissu adipeux. Le DT2 se caractérise alors par une résistance à l'insuline au niveau de ces organes insulino-sensibles entraînant une hyperglycémie et une hyperinsulinémie (Reaven et al., 1976; Ferrannini, 1998) (Figure 56). Dès 1991, il a été démontré que la résistance à l'insuline est induite par la combinaison de l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et l'activation de la voie HBP, notamment par la Gln. En effet, dans ces conditions, l'absorption du Glc est diminuée dans les adipocytes mais est restaurée après inhibition pharmacologique de la GFAT (Marshall et al., 1991b). Le traitement par la GlcNH₂ ou la surexpression de la GFAT induit l'augmentation de la concentration intracellulaire en UDP-GlcNAc et la résistance à l'insuline dans le foie (Rossetti et al., 1995; Veerababu et al., 2000), le muscle squelettique (Rossetti et al., 1995; Baron et al., 1995; Hebert et al., 1996) et le tissu adipeux (Hebert et al., 1996; Heart et al., 2000, p.20; Marshall et al., 2004) *ex vivo* et *in vivo*. Dans le muscle squelettique et le tissu adipeux, cette résistance est liée à la diminution de la translocation membranaire du transporteur insulino-dépendant GLUT4. De plus, les îlots de Langerhans et les tissus insulino-sensibles de modèles diabétiques présentent une augmentation du niveau de O-GlcNAcylation globale des protéines (Akimoto et al., 2007; Ruan et al., 2012; Fricovsky et al., 2012; Zaborska et al., 2017; Shi et al., 2018).

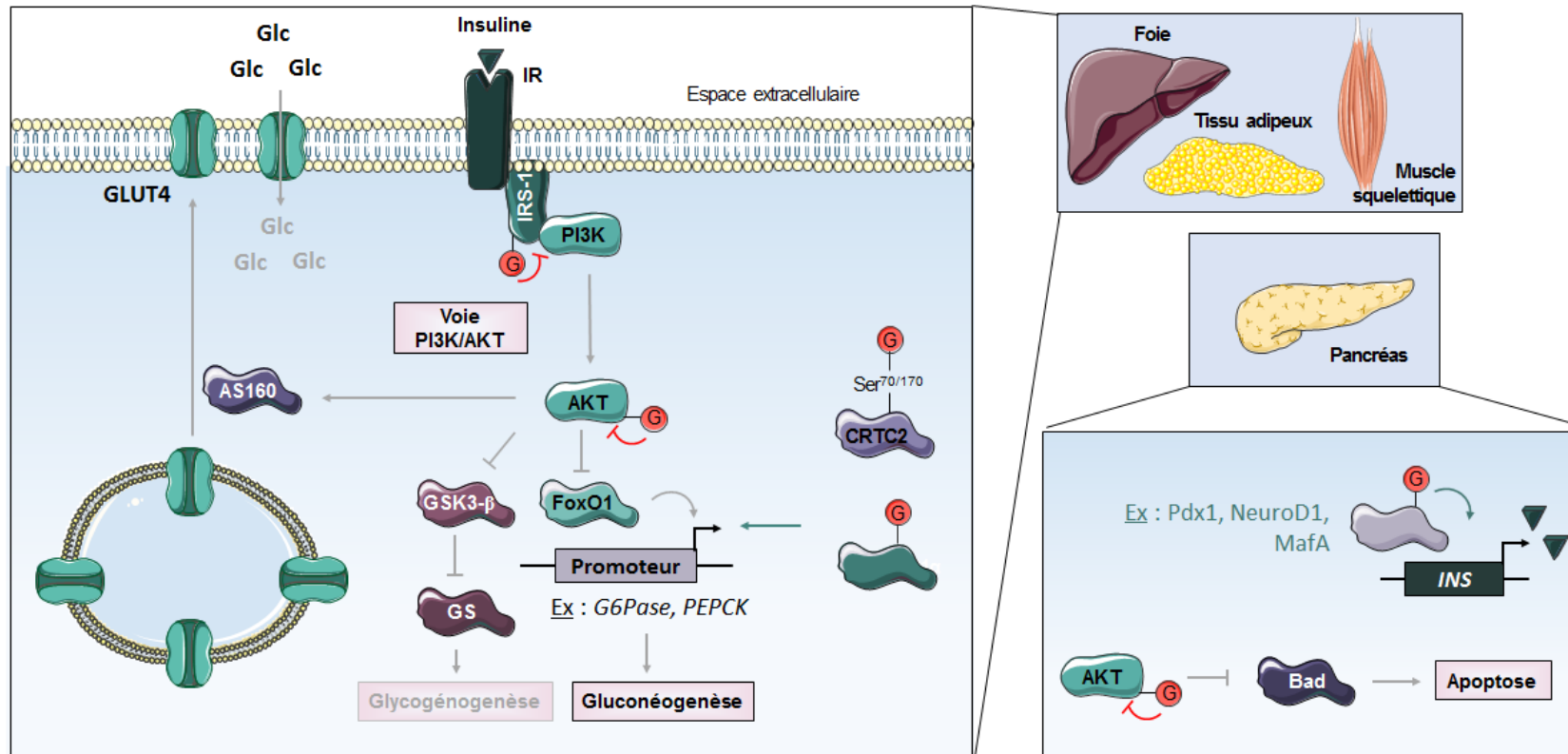


Figure 56 : Dérégulation de la O-GlcNAcylation dans le Diabète de Type 2 (DT2). La O-GlcNAcylation participe à la résistance à l'insuline prémices au DT2. Elle diminue l'absorption du glucose et la glycogénogenèse, et augmente la néoglucogenèse au niveau du foie, du tissu adipeux et du muscle squelettique. Au niveau du pancréas, elle augmente la production d'insuline et induit la mort cellulaire.

AS160 : AKT Substrate of 160 kilodaltons ; **Bad** : B-cell lymphoma 2 associated agonist of cell death ; **CRTC2** : C-adenosine monophosphate response Element-binding protein Regulated Transcription Coactivator 2 ; **DT2** : Diabète de Type 2 ; **FoxO1** : Forkhead box de classe O1 ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **G6Pase** : Glucose-6-Phosphatase ; **Glc** : Glucose ; **GLUT4** : GLUcose Transporter 4 ; **GS** : Glycogene Synthase ; **GSK3-β** : GS Kinase 3β ; **INS** : INSuline ; **IR** : Insulin Receptor ; **IRS-1** : IR Substrate 1 ; **MafA** : V-Maf Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene A ; **NeuroD1** : Neurogenic Differentiation 1 ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétyleGlucosaminylation ; **Pdx1** : Pancreatic and duodenal homeobox 1 ; **PEPCK** : PhosphoEnolPyruvate CarboxyKinase ; **PGC1α** : Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1α ; **PI3K** : Phosphatidylinositol-3-Kinase ; **Ser** : Sérine.

Ainsi, en ciblant et inhibant plusieurs protéines de la voie de signalisation de l'insuline, la dérégulation de la *O*-GlcNAcylation observée dans le DT2 établit un lien entre hyperglycémie et résistance à l'insuline (pour revue : [Very et al., 2018](#)). En résumé, dans les tissus insulino-sensibles, la *O*-GlcNAcylation inhibe l'interaction IRS-1/PI3K, et par conséquent l'activation de la voie. L'inhibition de AKT induit une diminution de la translocation membranaire de GLUT4 possiblement *via* **AS160** (AKT Substrate of 160 kDa) et de l'absorption du glucose. De plus, la répression de AKT inhibe la glycogénogenèse et stimule la gluconéogenèse en régulant GSK3- β , FoxO1 et leurs cibles respectives **GS** (Glycogène Synthase) et, G6Pase et **PEPCK** (PhosphoEnoIPyruvate CarboxyKinase). En réponse au glucose, la glycosylation de **CRTC2** (CREB Regulated Transcription Coactivator 2) sur les Ser⁷⁰ et Ser¹⁷⁰ dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2 ([Dentin et al., 2008](#)) et de PGC-1 α stimule également l'expression des gènes gluconogéniques. Dans les cellules β -pancréatiques murines MIN6, la *O*-GlcNAcylation favorise l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription Pdx1 ([Gao et al., 2003](#)), NeuroD1 ([Andrali et al., 2007](#)) et **MafA** (V-Maf Musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A) ([Vanderford et al., 2007](#)) impliqués dans la régulation de l'expression de **INS** (*INS*uline). L'inhibition de AKT par *O*-GlcNAcylation induit l'apoptose des cellules β (**Figure 56**). Enfin et pour rappel, le polymorphisme des gènes *MGEA5* et *GFPT2* est associé à la prédisposition génétique liée au DT2 (*cf.* [1 page 136](#) et [4.2.2 page 140](#)).

8.2. Maladies neurodégénératives

Il existe une étroite corrélation entre le niveau de *O*-GlcNAcylation des protéines et les neuropathies caractérisées par la formation d'agrégats neuronaux de protéines mal conformées. D'une part, le cerveau est l'organe gluco-dépendant qui présente les niveaux les plus élevés d'OGT et d'OGA ([Lubas et al., 1997](#); [Gao et al., 2001](#)). D'autre part, les gènes codant ces enzymes sont localisés sur des locus associés aux maladies neurodégénératives telles que Parkinson ([Shafi et al., 2000](#); [Nolte et al., 2003](#)) et Alzheimer ([Bertram et al., 2000](#); [Myers et al., 2000](#)).

La maladie de Parkinson est caractérisée par la présence d'agrégats neuronaux d' α -synucléine au sein de corps de Lewy. De manière intéressante, le cerveau de patients atteints de Parkinson présente des niveaux plus élevés de *O*-GlcNAcylation des protéines ([Wani et al., 2017](#)) et de phosphorylation de l' α -synucléine membranaire sur les Ser⁸⁷ et Ser¹²⁹ ([Paleologou et al., 2010](#)). *In vitro*, la phosphorylation de la Ser⁸⁷ bloque la liaison membranaire de l' α -synucléine ainsi que son agrégation ([Paleologou et al., 2010](#)) alors que celle de la Ser¹²⁹ augmente sa capacité à se lier à la membrane synaptique ainsi que sa toxicité neuronale ([Chen and Feany, 2005](#); [Visanji et al., 2011](#)) (**Figure 57**). L' α -synucléine est *O*-GlcNAcyllée sur les résidus Thr⁶⁴, Thr⁷² et Ser⁸⁷ au niveau de son domaine **NAC** (Non-Amyloid- β Component) localisé entre les résidus ⁶¹Glu-Val⁹⁵ et impliqué dans son agrégation ([Wang et al., 2009](#); [Wang, Udeshi, O'Malley, et al., 2010](#); [Alfaro et al., 2012](#)).

Marotta et collaborateurs (2015) montrent, *in vitro*, que la O-GlcNAcylation de la Thr⁷² augmente légèrement la phosphorylation sur la Ser⁸⁷ par CK1 mais diminue celle sur la Ser¹²⁹ catalysée par les kinases CK1, **PLK3** (Polo-Like Kinase 3) et **GRK5** (G protein-coupled Receptor Kinase 5). Cette glycosylation augmente la solubilité de l'α-synucléine et diminue son agrégation sans affecter sa liaison membranaire. Enfin, la MPT diminue également la toxicité de l'α-synucléine dans les cellules neuronales SH-SY5Y de rat (Marotta et al., 2015). Ainsi, les approches biochimiques utilisées dans ces études semblent montrer que la O-GlcNAcylation diminue l'agrégation de l'α-synucléine par compétition avec la phosphorylation. Néanmoins, Wani et collaborateurs (2017) ont également démontré que l'augmentation de la O-GlcNAcylation favorise l'accumulation d'α-synucléine grâce à l'activation de mTOR et la réduction de l'autophagie dans les neurones corticaux primaires de rat traités au Thiamet-G (Wani et al., 2017). Enfin, l'inhibition de AKT par O-GlcNAcylation pourrait être impliquée dans la perte de fonction et dans l'apoptose des cellules neuronales retrouvées dans les maladies neurodégénératives (Kang et al., 2008) (cf. 6.2.4 page 162) (Figure 57). Très récemment, Ryan et collaborateurs (2020) ont synthétisé un peptide analogue du domaine NAC tronqué (⁶⁸Gly-Val⁷⁷) de l'α-synucléine avec, en N-ter, un groupement acétyle et un résidu Ser O-GlcNAcylé et, en C-ter, un groupement amine. Ce peptide s'associe alors avec l'α-synucléine fibrillaire et inhibe son agrégation (Ryan et al., 2020).

La maladie d'Alzheimer se caractérise par la présence d'agrégats neuronaux de peptides Aβ issus du clivage de l'APP (Amyloid Precursor Protein) et formant des plaques séniles au niveau des neurones. Au cours de la maladie, la protéine Tau, qui permet normalement l'assemblage, la stabilité et l'orientation des microtubules axonaux, ainsi que les neurofilaments NF sont également retrouvées sous forme d'agrégats hyper-phosphorylés. Une corrélation existe entre diabète, métabolisme du glucose et développement de la maladie d'Alzheimer. D'une part, les sujets diabétiques ont deux fois plus de risque de développer cette neuropathie (Biessels et al., 2006). D'autre part, comparés aux patients sains, les patients atteints d'Alzheimer ont un métabolisme du glucose significativement plus faible au niveau du cerveau (Alexander et al., 2002). Enfin, la maladie d'Alzheimer est considérée comme le diabète de type 3 (DT3) puisqu'elle présente les caractéristiques de diminution de production de l'insuline et de résistance à l'insuline des récepteurs IR des DT1 et DT2 respectivement (Steen et al., 2005; Lefebvre et al., 2010). Cette diminution du métabolisme du glucose corrèle également avec une dérégulation de la O-GlcNAcylation (Figure 57). La O-GlcNAcylation a été identifiée sur l'APP (Griffith et al., 1995), les neurofilaments NF-M, NF-L (Dong et al., 1993), NF-H (Cheung and Hart, 2008) et Tau (Arnold et al., 1996; Lefebvre et al., 2003). En réponse à la privation en glucose, la O-GlcNAcylation augmente la solubilité et la dépolymérisation de NF-H au niveau des filaments des cellules de neuroblastome Neuro-2A (Cheung and Hart, 2008). En parallèle, la glycosylation de Tau (Lefebvre et al., 2003; Li et al., 2006) et de NF-M (Deng et al., 2008) est inversement corrélée à leur phosphorylation et est dépendante de la prise alimentaire et du métabolisme du glucose *in vitro* et *in vivo*.

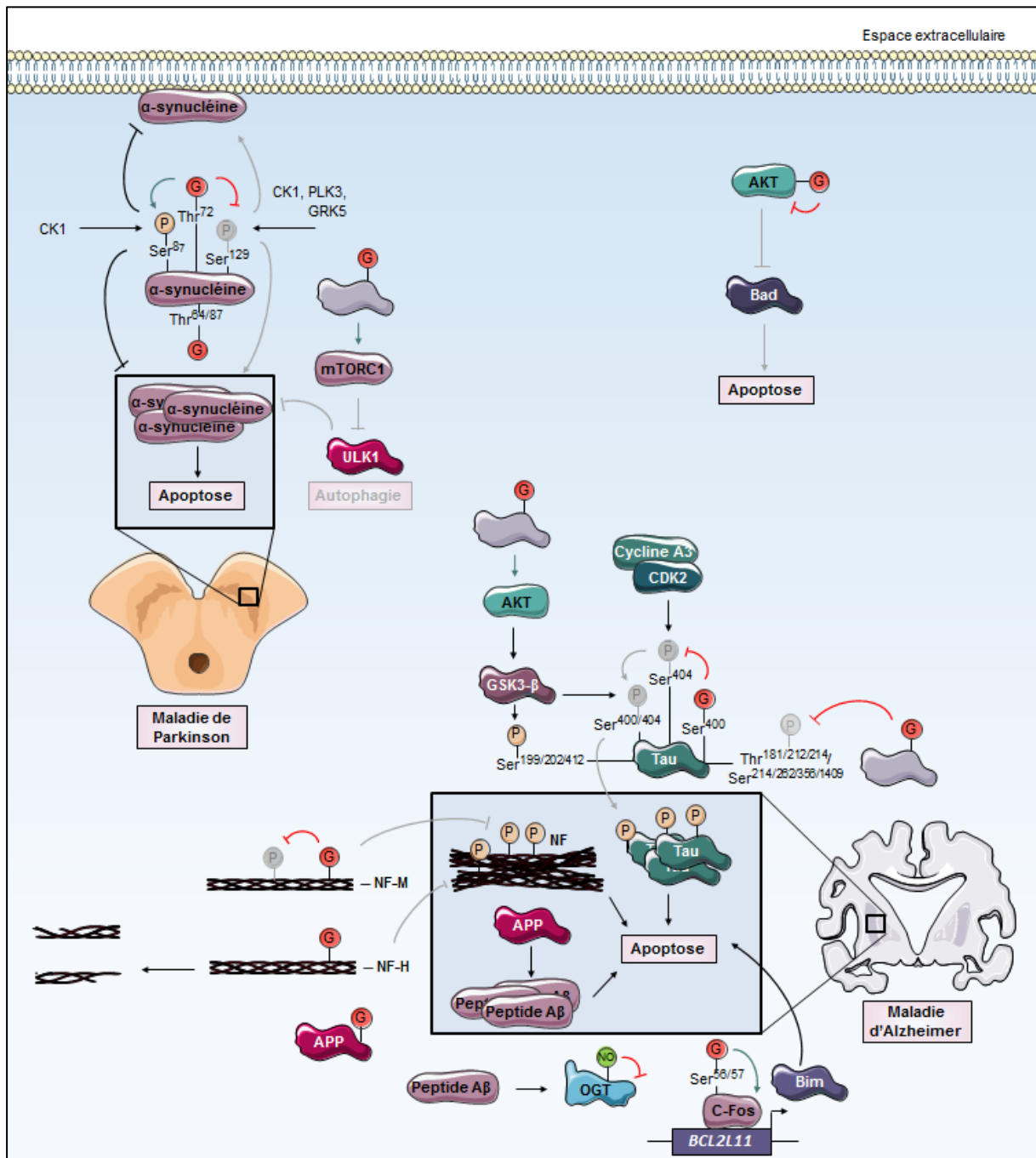


Figure 57 : Dérégulation de la O-GlcNAcylation dans les maladies neurodégénératives. De manière générale, la O-GlcNAcylation participe à la neuroprotection dans les maladies de Parkinson et d'Alzheimer en évitant l'accumulation d'agrégats protéiques. Elle peut néanmoins participer à la mort neuronale par apoptose.

Aβ : Amyloïde β ; **APP** : Amyloid Precursor Protein ; **Bad** : Bcl-2 associated agonist of cell death ; **Bcl-2** : B-cell lymphoma 2 ; **BCL2L11** : *BCL2-Like protein 11* ; **Bim** : Bcl-2 interacting mediator of cell death ; **CDK2** : Cyclin-Dependent Kinase 2 ; **CK1** : Casein Kinase 1 ; **G** : GlcNAc ; **GlcNAc** : N-Acétyle-D-Glucosamine ; **GRK5** : G protein-coupled Receptor Kinase 5 ; **GSK3-β** : Glycogene Synthase Kinase 3β ; **mTORC1** : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 ; **NF** : NeuroFilament ; **NO** : Nitric Oxide ; **O-GlcNAcylation** : O-N-Acetylglucosaminylation ; **OGT** : β-O-GlcNAcTransférase ; **P** : Phosphate ; **PLK3** : Polo-Like Kinase 3 ; **Ser** : Sérine ; **Tau** : Tubulin associated unit ; **Thr** : Thréonine ; **ULK1** : Unc-51 Like autophagy Activating Kinase 1.

Ainsi, le Yin-Yang entre ces deux MPT régule l'agrégation de ces protéines. Notamment la *O*-GlcNAcylation *in vitro* de la Ser⁴⁰⁰ de Tau réduit la phosphorylation de la Ser⁴⁰⁴ catalysée par la cycline A3/CDK2, interrompt le processus de phosphorylations séquentielles sur les résidus Ser⁴⁰⁰ et Ser³⁹⁶ induit par GSK3- β et diminue son agrégation sans altérer sa conformation (Smet-Nocca et al., 2011; Yuzwa et al., 2012a). Inversement, la phosphorylation des résidus Ser³⁹⁶ et Ser⁴⁰⁴ diminue la glycosylation de Tau sur la Ser⁴⁰⁰ (Smet-Nocca et al., 2011). En revanche, dans le cerveau murin, l'inhibition de l'OGA par le Thiamet-G diminue la phosphorylation de Tau sur les acides aminés Thr¹⁸¹, Thr²¹², Ser²¹⁴, Ser^{262/356}, Ser⁴⁰⁴ et Ser⁴⁰⁹ mais l'augmente sur les résidus Ser¹⁹⁹, Ser²⁰², Ser³⁹⁶ et Ser⁴²² possiblement par l'activation de GSK3- β *via* AKT (Yu et al., 2012). Le cerveau de patients atteints d'Alzheimer présente ainsi une accumulation de Tau et de NF-M sous forme hypo-*O*-GlcNAcyliée et hyper-phosphoryliée (Deng et al., 2008; Liu et al., 2009). De plus, dans les cellules de neuroblastome, le peptide A β induit la *S*-nitrosylation et l'inhibition de l'activité enzymatique de l'OGT pouvant contribuer à l'agrégation de Tau (Ryu et al., 2016). Ainsi, la présence du peptide A β accélérerait la neurotoxicité en affectant la *O*-GlcNAcylation (Figure 57). Ensemble, ces données montrent que la *O*-GlcNAcylation a un rôle neuroprotecteur dans la maladie d'Alzheimer. L'utilisation d'inhibiteurs de l'OGA capables de passer la barrière hémato-encéphalique et d'augmenter la *O*-GlcNAcylation des protéines neuronales est un outil thérapeutique prometteur pour traiter cette neuropathie. A ce jour, le traitement à long terme avec du Thiamet-G a diminué les lésions neurodégénératives dans le cerveau de différents modèles murins de tauopathies (Yuzwa et al., 2012a; Borghgraef et al., 2013; Graham et al., 2014; Yuzwa et al., 2014). Une donnée récente montre cependant qu'en réponse au peptide A β , la *O*-GlcNAcylation participerait à la mort neuronale en glycosylant c-Fos sur la Ser⁵⁶ et la Ser⁵⁷. Cette modification augmenterait la stabilité et l'activité transcriptionnelle de ce facteur de transcription sur *BCL2L11* pro-apoptotique dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y (Choi et al., 2019) (Figure 57).

8.3. Maladies cardiovasculaires

De manière intéressante, Medford et collaborateurs (2012) ont démontré qu'un régime alimentaire riche est associé à une augmentation de la *O*-GlcNAcylation des protéines dans le cœur de rat (Medford et al., 2012). Ainsi, en réponse à l'altération de la glycémie, la *O*-GlcNAcylation pourrait déréguler les mécanismes cellulaires et potentialiser les effets indésirables des désordres métaboliques (Figure 58).

L'infarctus du myocarde correspond à la mort des cellules musculaires cardiaques privées d'oxygène et de nutriments, et à l'apparition de problèmes de contraction du cœur. L'I/R (Ischémie/Reperfusion) correspond à la diminution puis la ré-augmentation de l'apport sanguin au niveau des organes. Le choc trauma-hémorragique correspond, quant à lui, à une perte importante de sang. Lorsque la circulation sanguine reprend, les cellules ischémisées présentent notamment une surcharge calcique, un stress oxydatif et une réaction inflammatoire qui conduisent à leur mort par apoptose.

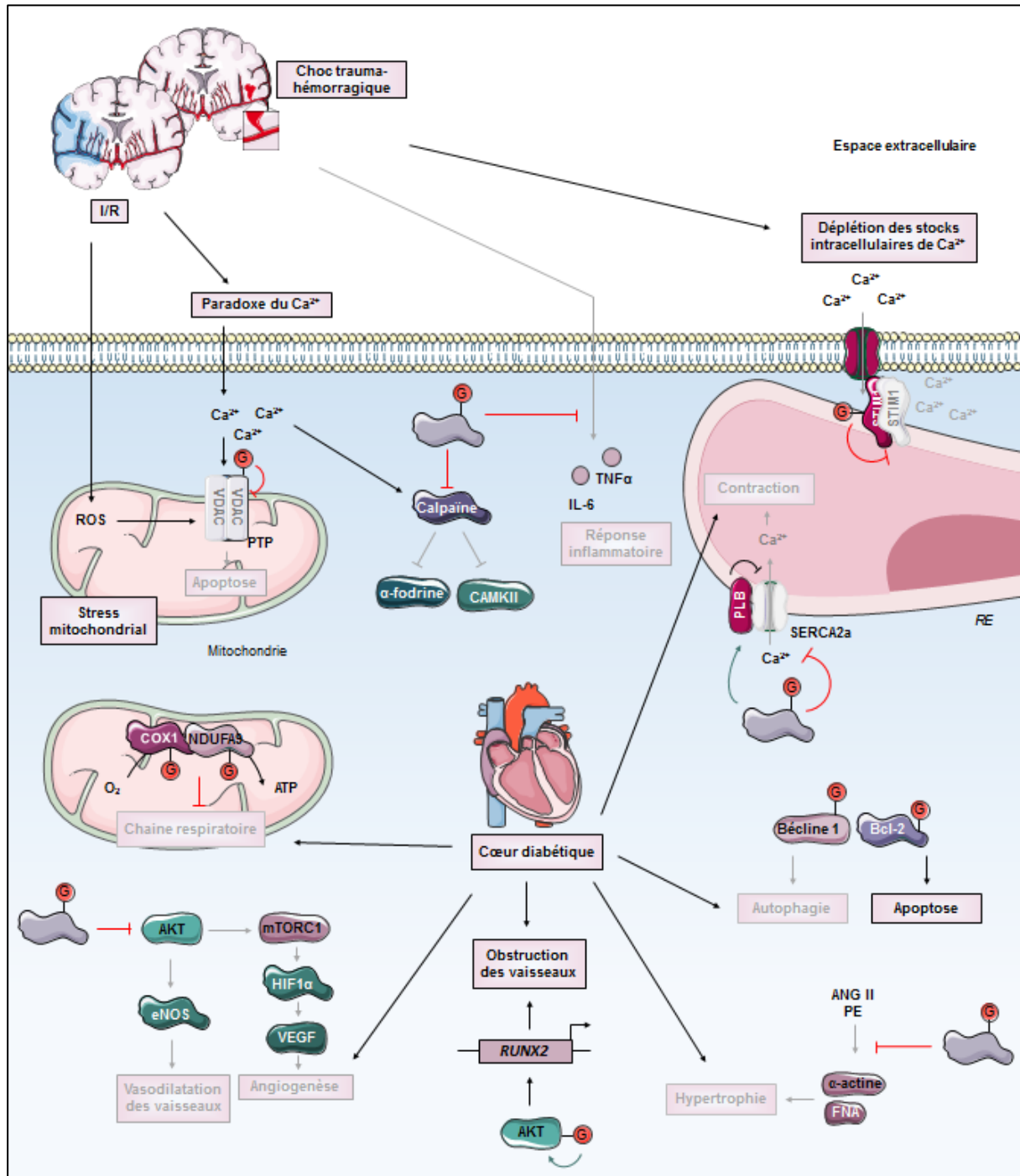


Figure 58 : Dérégulation de la O-GlcNAcylation dans les maladies cardiovasculaires. La O-GlcNAcylation a un rôle cardioprotecteur en réponse à l'I/R et au choc trauma-hémorragique. En revanche, elle participe aux complications cardiovasculaires associées au diabète.

ANG II : ANGIotensine II ; **ATP** : Adénosine TriPhosphate ; **Bcl-2** : B-cell lymphoma 2 ; **Ca²⁺** : Calcium (II) ; **CaMKII** : Calcium/CalModulin-dependent protein Kinase II ; **COX1** : Cyclo-Oxygénase 1 ; **eNOS** : endothelial Nitric Oxide Synthase ; **FNA** : Facteur Natriurétique Auriculaire ; **G** : N-Acetyl-D-Glucosamine ; **HIF1α** : Hypoxia-Inducible Factor 1α ; **I/R** : Ischémie/Reperfusion ; **IL-6** : InterLeukine-6 ; **mTORC1** : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1 ; **NDUFA9** : NAD Déshydrogenase Ubiquinone Fe-S protein A9 ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcetylGlucosaminylation ; **PE** : PhénylEphrine ; **PLB** : PhosphoLamBane ; **PTP** : Pore de Transition de Perméabilité ; **RE** : Réticulum Endoplasmique ; **ROS** : Reactive Oxygen Species ; **RUNX2** : RUNt related transcription factor 2 ; **SERCA2a** : Sarco/Endoplasmic Reticulm Ca²⁺-ATPase 2a ; **STIM1** : Stromal Interaction Molecule 1 ; **TNF** : Tumor Necrosis Factor ; **VDAC** : Voltage-Dependent Anion Channel ; **VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor.

La survie des cardiomyocytes et les fonctions de cœurs isolés de rat soumis à une I/R ou au paradoxe du calcium sont améliorées après pré-traitement avec la Gln, la GlcNH₂ ou l'inhibiteur d'OGA PUGNAc (Liu et al., 2006; Liu et al., 2007; Jones et al., 2008; Champattanachai et al., 2008). De même, la GlcNH₂ et le PUGNAc augmentent le recouvrement des fonctions cardiaques après un choc trauma-hémorragique (S. Yang et al., 2006; Zou et al., 2007).

Le maintien de l'homéostasie du Ca²⁺ est nécessaire à la fonction cardiaque normale dans lequel il régule le couplage excitation-contraction, l'hypertrophie et l'apoptose. Le paradoxe du calcium est retrouvé dans les tissus soumis à une I/R et correspond à une perte brève du niveau extracellulaire de Ca²⁺ suivie de sa restauration conduisant à une surcharge massive en Ca²⁺ dans les cardiomyocytes et à leur mort par apoptose. La O-GlcNAcylation atténue l'agrégation de **STIM1 (STromal Interaction Molecule 1)** et l'**ECC (Entrée Capacitative du Ca²⁺)** en réponse à la déplétion des stocks intracellulaires de Ca²⁺ des cardiomyocytes **NRVM (Neonatal Rat Ventricular Myocyte)** (Zhu-Mauldin et al., 2012). La O-GlcNAcylation diminue également la réponse au stress induite par le Ca²⁺ lors de la reperfusion cardiaque en inhibant la protéase calpaïne et en diminuant la protéolyse subséquente de l' α -fodrine et de CaMKII (Liu et al., 2007). Au cours des lésions d'I/R, la surcharge de Ca²⁺ et l'accumulation de ROS activent la voie apoptotique intrinsèque qui aboutit à la formation du pore PTP mitochondrial notamment composé du canal **VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel)**. La O-GlcNAcylation de VDAC permettrait le maintien du potentiel de la membrane mitochondriale et empêcherait la formation du pore PTP dans les cardiomyocytes soumis à une hypoxie-reperfusion *in vitro* et *in vivo* (Jones et al., 2008; Champattanachai et al., 2008; Ngoh et al., 2008). Enfin, la O-GlcNAcylation réduit les niveaux circulants d'IL-6 et de TNF α induits par la trauma-hémorragie chez le rat (S. Yang et al., 2006; Zou et al., 2007) (**Figure 58**).

De manière chronique, la O-GlcNAcylation peut participer aux complications cardiovasculaires associées au diabète en altérant les signalisations hypertrophique, mitochondriale et, les fonctions mitochondriale et contractile des cardiomyocytes (Hu et al., 2005; Hu et al., 2009; Marsh et al., 2011; Marsh et al., 2013). La glycosylation module également l'angiogenèse et l'obstruction des vaisseaux sanguins. Dans les cardiomyocytes de rats diabétiques, la O-GlcNAcylation diminue la signalisation hypertrophique induite par **ANG II (ANGiotensine II)** et **PE (PhénylEphrine)** en diminuant les niveaux de **FNA (Facteur Natriurétique Auriculaire)** et de l' α -actine sarcomérique (Marsh et al., 2011). Dans ces cellules, Bcl-2 et la bécline 1 sont O-GlcNAcylés et la glycosylation participerait à l'inhibition de l'autophagie induite par la bécline 1 en réponse à la déprivation en glucose et à l'initiation de l'apoptose (Marsh et al., 2013). D'autre part, l'augmentation de la O-GlcNAcylation dans les cardiomyocytes néonataux de rat diminue l'activité de la chaîne mitochondriale respiratoire en ciblant notamment COX1 et NDUFA9 (Hu et al., 2009) (**Figure 58**).

Enfin, la *O*-GlcNAcylation diminue également l'expression de la pompe **SERCA2a** (*Sarco/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase 2a*) et augmente celle de son inhibiteur **PLB** (**PhosphoLamBane**) dans les cardiomyocytes de rats diabétiques. Il en résulte une diminution des transitoires calciques, de la charge de Ca²⁺ dans le *réticulum* sarcoplasmique et de la fonction contractile (Hu et al., 2005). La *O*-GlcNAcylation réduit la vasodilatation des vaisseaux et l'angiogenèse *via* l'inhibition de AKT, de eNOS et du VEGF. Elle favorise également la calcification et l'obstruction des vaisseaux par l'activation de AKT et la surexpression du facteur de transcription ostéogénique *RUNX2* (pour revue : Very et al., 2018) (**Figure 58**).

En conclusion, comme il a été précédemment décrit pour les maladies neurodégénératives, la *O*-GlcNAcylation est le Dr. Jekyll ou Mr. Hyde en fonction de la condition physiologique considérée.

8.4. Cancer

8.4.1. Reprogrammation métabolique

Physiologiquement et en présence d'oxygène, les cellules non proliférantes différenciées métabolisent le glucose en pyruvate à travers la voie de la glycolyse puis en CO₂ et NADH,H⁺ *via* le cycle de Krebs. Le NADH,H⁺ alimente alors la phosphorylation oxydative mitochondriale afin de générer de l'énergie (36 molécules d'ATP par molécule de glucose). Dans ces conditions, la production d'ATP par conversion du pyruvate en lactate (2 molécules d'ATP par molécule de glucose) au cours de la glycolyse anaérobie reste minimale. Pendant leur transformation, les cellules cancéreuses, hautement prolifératives, opèrent une reprogrammation métabolique appelée effet Warburg. Celui-ci consiste en la glycolyse aérobie avec production d'une grande quantité de lactate indépendamment de la biodisponibilité en O₂ (Warburg, 1956). Néanmoins, en fonction des conditions environnementales, les cellules tumorales peuvent présenter une flexibilité métabolique et conserver leur activité mitochondriale (Obre and Rossignol, 2015).

En raison du rendement énergétique peu élevé de la glycolyse aérobie et afin de supporter leur prolifération accrue, les cellules cancéreuses surexpriment les transporteurs de glucose, et notamment GLUT1 (Carvalho et al., 2011), et augmentent par conséquent leur absorption de glucose d'un facteur 10 environ. En parallèle, elles consomment la Gln en grande quantité qui, comme le Glc, est une source de carbone qui contribue à la synthèse des trois classes majeures de macromolécules (acides nucléiques, lipides et protéines). Elle est également une source d'azote nécessaire à la synthèse des nucléotides et des acides aminés (DeBerardinis et al., 2008).

8.4.2. Augmentation de la biodisponibilité des substrats et dérégulations des GlycosylTransférases (GT)

La conversion du Glc en Fru-6-P par HK puis PGI est une étape commune à la glycolyse et à la voie HBP. Ainsi, la consommation excessive par les cellules cancéreuses du Glc et de la Gln augmente le flux de la voie HBP, et la production d'UDP-GlcNAc. L'UDP-GlcNAc peut être épimérisé afin de générer l'UDP-GalNAc ou subir d'autres modifications pour être métabolisé en **CMP-Neu5Ac** (Cytidine MonoPhosphate-Neu5Ac). L'UDP-GlcNAc, l'UDP-GalNAc et le CMP-Neu5Ac sont utilisés au niveau du RE et de l'appareil de Golgi afin de participer à l'élaboration des glycosylations complexes des protéines membranaires ou appartenant à la voie de sécrétion. Une augmentation de la biodisponibilité des nucléotides sucres donneurs, ainsi qu'une altération de l'expression et de l'activité des GT sont responsables d'une altération de la glycosylation.

Dans le CCR, les glycosylations anormales les plus fréquemment observées sont une augmentation du branchement et de la sialylation des *N*-glycanes, de la troncation des *O*-glycanes de type mucine, de la fucosylation et de la sialylation des antigènes de type Lewis ainsi que de la *O*-GlcNAcylation (**Figure 59**). La surexpression de **GnT-5** (β 1,6-N-acétylGlucosaminylTransférase V) et de **β 3Gnt** (β 1,3-N-acétylGlucosaminylTransférase) est responsable d'une augmentation des *N*-glycanes branchés avec, respectivement, le résidu GlcNAc et la chaîne **poly-LacNAc** (**poly-N-AcétylLactosamine**). Les antigènes **T** (Thomsen-Friedenreich) et **Tn** (Thomsen-nouvelle) sont des *O*-glycanes de type mucine tronqués qui résultent de la surexpression des enzymes **ppGalNAcT** (polypeptide **N-AcétylGalactosaminylTransférases**) de la première étape de la voie de biosynthèse et de la sous-expression des enzymes d'extension **C2GnT** (Core 2 β 1,6-N-acétylGlucosaminylTransférase), **C3GnT** (Core 3 β 1,3-N-acétylGlucosaminylTransférase) et **C4GnT** (Core 4 N-acétylGlucosaminylTransférase). L'activité accrue de l' **α 2FucT** (α 1,2-FucosylTransférase) participe à la synthèse des antigènes oncofoétaux **Le^b** (Lewis^b) et Le^y. Enfin, la surexpression des sialyltransférases telles que **ST6GalT-1** (α 2,6-SialylTransférase 1), **ST3GalT** (α 2,3-SialylTransférase) et **ST6GalNAcT-1** (α -GalNAc α 2,6-SialylTransférase 1) est impliquée dans la formation des *N*-glycanes sialylés en α 2,6, des antigènes **sTn** (sialyl-Tn), **sLe^a** (sialyl-Le^a, aussi appelé **CA 19-9**, Carbohydrate Antigen 19-9) et sLe^x. Enfin, la surexpression de l'OGT est corrélée à une augmentation de la *O*-GlcNAcylation globale des protéines intracellulaires (**Figure 59**).

Le CA-19-9 et l'**ACE** (Antigène CarcinoEmbryonnaire) sont des glycoprotéines sériques largement utilisées comme biomarqueurs pour surveiller et détecter la récurrence du CCR bien qu'ils présentent une faible spécificité et sensibilité au diagnostic initial (pour revue : [Very et al., 2017](#)).

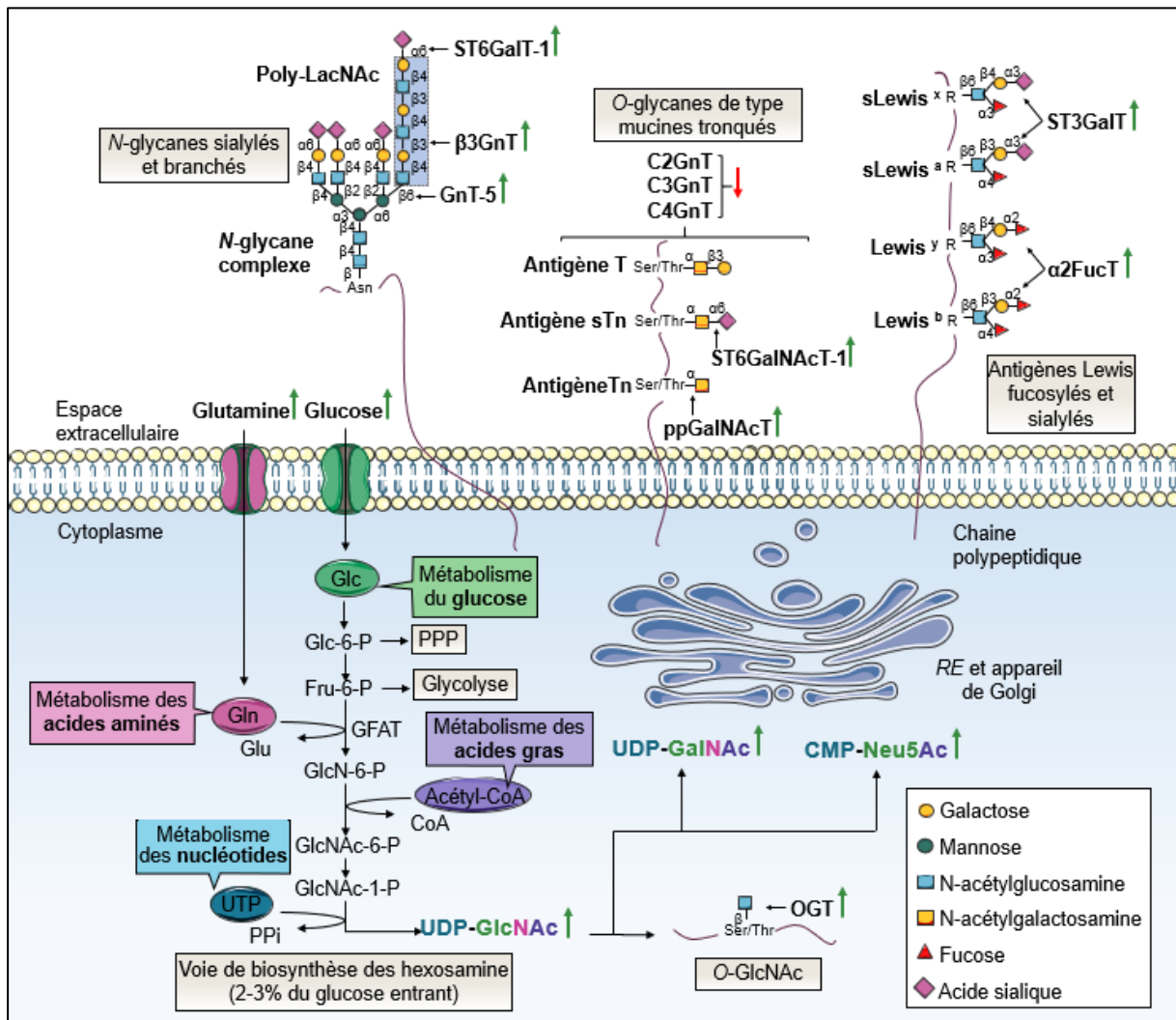


Figure 59 : Altérations spécifiques de la glycosylation dans le CCR. Les flèches vertes et rouges indiquent respectivement une augmentation et une diminution de la disponibilité des nutriments et des nucléotide-sucre, de l'expression ou de l'activité des glycosyltransférases dans le cancer colorectal. Figure adaptée de [Very et al., 2017](#).

α2FucT : α1,2-FucosylTransférase ; **β3GnT** : β1,3-N-acétylGlucosaminylTransférase ; **Asn** : Asparagine ; **C2GnT** : Core 2 β1,6-N-acétylGlucosaminylTransférase ; **C3GnT** : Core 3 β1,3-N-acétylGlucosaminylTransférase ; **C4GnT** : Core 4 N-acétylGlucosaminylTransférase ; **CCR** : Cancer ColoRectal ; **CMP-Neu5Ac** : Cytidine MonoPhosphate-N-AcétylNeuramate ; **CoA** : Coenzyme A ; **Fru-6-P** : Fructose-6-Phosphate ; **GFAT** : Glutamine:Fructose-6-phosphate AmidoTransférase ; **Glc-6-P** : Glucose-6-Phosphate ; **GlcN-6-P** : Glucosamine-6-Phosphate ; **GlcNAc-1-P** : N-Acétyl-Glucosamine-1-Phosphate ; **GlcNAc-6-P** : N-Acétyl-Glucosamine-6-Phosphate ; **Gln** : Glutamine ; **Glu** : Glutamate ; **GnT-5** : β1,6-N-acétylGlucosaminylTransférase 5 ; **O-GlcNAc** : β-O-N-Acétyl-D-Glucosamine ; **OGT** : O-GlcNAc Transférase ; **poly-LacNAc** : poly-N-AcétylLactosamine ; **ppGalNAcT** : polypeptide N-AcétylGalactosaminylTransférase ; **Ppi** : PyroPhosphate inorganique ; **PPP** : Pentose Phosphate Pathway ; **R** : Radical ; **RE** : Réticulum Endoplasmique ; **s** : sialyl ; **Ser** : Sérine ; **ST3GalT** : α 2,3-SialylTransférase ; **ST6GalNAcT-1** : α-GalNAc α2,6-SialylTransférase 1 ; **ST6GalT-1** : β-galactoside α2,6-SialylTransférase 1 ; **T** : Thomsen-Friedenreich ; **Thr** : Thréonine ; **Tn** : Thomsen-nouvelle ; **UDP-GalNAc** : Uridine DiPhosphate N-AcétylGalactosamine ; **UDP-GlcNAc** : Uridine DiPhosphate N-AcétylGlucosamine ; **UTP** : Uridine TriPhosphate.

Précédemment, notre équipe a montré que la *O*-GlcNAcylation pouvait participer à la glycosylation aberrante dans le CCR. En effet, le *knock-down* de l'*OGT* diminue l'expression des gènes codant l' α -mannosidase-2, la β -mannosidase, **ST8SIA-6** (α 2,8-SIALylTransférase 6), la ppGalNAcT-8 et **C2GnT-M** (**C2GnT** de type **Mucine**), toutes impliquées dans le métabolisme des glycosylations complexes. A l'inverse, le *KD* de l'*OGT* augmente l'expression de ST3GalT-2 dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 mais pas dans les cellules HT-29. Dans ces cellules HCT116, la diminution de la *O*-GlcNAcylation augmente faiblement la *O*-glycosylation ainsi que la sialylation terminale en α 2,3 (Biwi et al., 2019).

8.4.3. Augmentation de l'*OGT* et de la *O*-GlcNAcylation globale des protéines

Par des approches d'**IHC** (ImmunoHistoChimie) et d'immunoblotting, il a été observé une augmentation des niveaux d'*OGT* et de *O*-GlcNAcylation globale des protéines dans les tissus ou les cellules cancéreuses mammaires (Caldwell et al., 2010; Gu et al., 2010; Champattanachai et al., 2013), **LLC** (Leucémiques Lymphoïdes Chroniques) (Shi et al., 2010), pulmonaires (Mi et al., 2011), hépatiques (Zhu et al., 2012; Zhang et al., 2017), prostatiques (Lynch et al., 2012), endométriaux (Krześlak et al., 2012), pancréatiques (Ma et al., 2013), colorectaux (Mi et al., 2011; Olivier-Van Stichelen et al., 2014; Steenackers et al., 2016; Yu et al., 2019, p.5), laryngés (Starska et al., 2015) et vésicaux (Wang et al., 2018). **L'augmentation des niveaux d'*OGT* et de *O*-GlcNAcylation globale dans les cellules coliques cancéreuses HCT116 par rapport à celles non cancéreuses CCD 841 CoN a également été observée dans l'article (en page 321) :**

[Very N, Steenackers A, Dubuquoy C, Vermuse J, Dubuquoy L, Lefebvre Tand El Yazidi-Belkoura I. \(2018\). Cross regulation between mTOR signaling and O-GlcNAcylation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 50 \(3\) : 213-222.](#)

Il est notamment démontré une augmentation des niveaux des transcrits *GFPT1*, *UAP1* et *OGT* dans les tumeurs prostatiques par rapport aux tissus bénins (Itkonen et al., 2013). Luang et collaborateurs (2017) ont également observé une augmentation du niveau d'*OGT* et une diminution du niveau de *MGEA5* dans les tumeurs pulmonaires par rapport aux tissus normaux (Luanpitpong et al., 2017). Très récemment, des analyses transcriptomiques ont montré une augmentation de l'expression de l'*OGT*, *MGEA5*, *GFPT1*, *GNPNAT1*, *PGM3* et *UAP1* dans les tumeurs colorectales, mammaires et pulmonaires (Xu et al., 2019; Singh et al., 2020). D'autre part, comme décrit précédemment (cf. **3.1.4 page 119**), plusieurs mutations faux-sens de l'*OGT* ont été identifiées dans le cancer (**Figure 30**). Certaines d'entre elles pourraient participer à la régulation de la spécificité de substrat et à l'augmentation de l'activité GT de l'*OGT*. L'augmentation de l'expression de l'*OGT* pourrait également être associée à la suractivation des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et MAPK/ERK dans certains cancers (**Figure 31**).

La O-GlcNAcylation serait également associée à la progression tumorale épithéliale puisqu'il est observé une augmentation graduelle des niveaux d'OGT et de O-GlcNAcylation globale entre les tumeurs mammaires bénignes et malignes de grades I, II et III (Champattanachai et al., 2013; Trinca et al., 2018). De même, le niveau d'OGT est progressivement augmenté avec le grade des tumeurs laryngées, endométriales et colorectales (Krześlak et al., 2012; Starska et al., 2015; Xu et al., 2019). L'expression de l'OGT est également augmentée entre les tissus de prostate adjacents à la tumeur et les tumeurs primaires et métastatiques (Lynch et al., 2012). Dans ce sens, Gu et collaborateurs (2010) révèlent une augmentation de la glycosylation dans les tumeurs mammaires métastatiques par rapport aux tumeurs primaires associées (Gu et al., 2010). De même, les cellules cancéreuses coliques métastatiques SW620 présentent un niveau plus élevé de O-GlcNAcylation globale et un niveau plus faible d'OGA par rapport aux cellules primaires SW480 (Yehezkel et al., 2012). A l'inverse, le niveau de O-GlcNAcylation tend à diminuer avec le grade tumoral dans la leucémie CCL (Shi et al., 2010).

Etant donné l'implication de la O-GlcNAcylation dans la progression des tumeurs solides, l'élévation de l'expression des enzymes de la voie HBP et de la O-GlcNAcylation pourrait être un marqueur pronostic du cancer. De ce fait, un niveau intra-tumoral élevé de *GFPT1* prédit un mauvais pronostic du cancer de pancréas et du foie (Yang et al., 2016; L. Li et al., 2017). De manière intéressante, les niveaux des transcrits *OGT* et *MGEA5* dans les urines sont respectivement augmentés et diminués avec le grade du cancer de la vessie (Rozanski et al., 2012).

8.4.4. Impact de la O-GlcNAcylation sur les propriétés biologiques des cellules cancéreuses

Plusieurs études se sont focalisées sur la compréhension du rôle de l'hyper-O-GlcNAcylation dans la cancérogenèse, en particulier sur la modification de nombreux oncogènes et suppresseurs de tumeurs, et sur son effet sur les propriétés de croissance, d'adhésion, de migration et d'invasion des cellules cancéreuses. Notre équipe a ainsi montré, *in vitro*, que le *knock-down* de l'OGT diminue la croissance, l'adhésion et la migration des cellules coliques non cancéreuses CCD 841 CoN et cancéreuses HT-29 et HCT116 (Steenackers et al., 2016). Xu et collaborateurs (2019) ont récemment confirmé l'implication de la O-GlcNAcylation dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules HCT116 (Xu et al., 2019) (Figure 60).

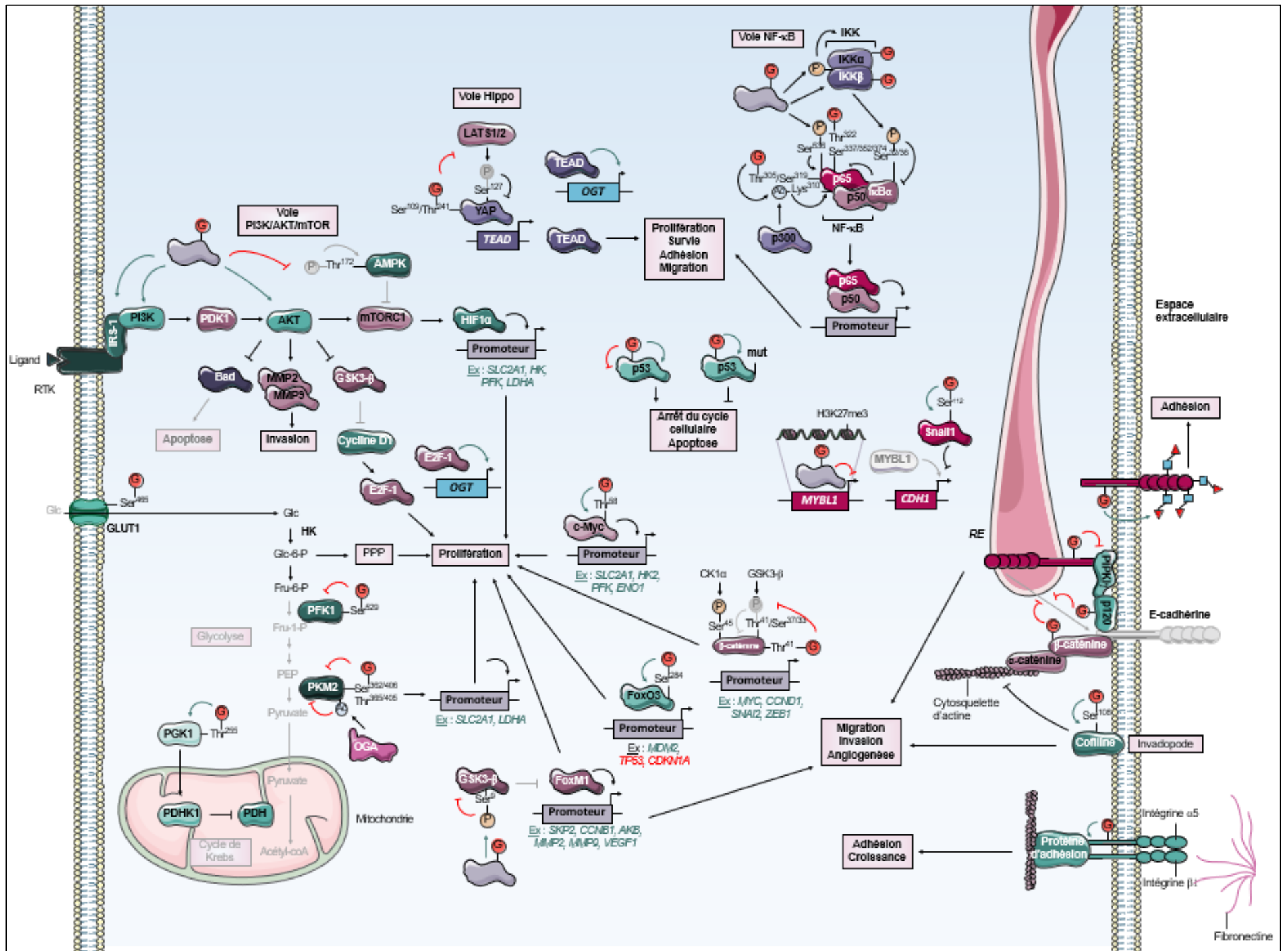


Figure 60 : Dérégulation de la O-GlcNAcylation dans le cancer. La dérégulation de la O-GlcNAcylation participe à la croissance, l'adhésion, la migration et l'invasion tumorales.

Ac: Acétyle; **Acétyl-CoA**: Acétyl-Coenzyme A; **AKB**: Aurora Kinase B; **AMPK**: Adenosine MonoPhosphate-activated protein Kinase; **Bad**: B-cell lymphoma 2 associated agonist of cell death; **CCN**: *CyCLiN*; **CDH1**: *CaDHérine 1*; **CDKN**: *Cyclin-Dependent Kinase INhibitor 1A*; **CK1 α** : Casein Kinase 1 α ; **E-cadhérine**: cadhérine Epithéliale; **ENO1**: *ENOlase 1*; **FoxO1**: Forkhead box; **Fru**: Fructose; **G**: GlcNAc; **Glc**: Glucose; **GlcNAc**: N-Acétyl-D-Glucosamine; **GLUT1**: GLUCose Transporter 1; **GSK3- β** : Glycogene Synthase Kinase 3 β ; **H3K27me3**: triméthylation de la Lysine²⁷ de l'Histone 3; **HIF1 α** : Hypoxia-Inducible Factor 1 α ; **HK**: HexoKinase; **I κ B α** : Inhibitory κ B α ; **IKK**: Inhibitory KappaB Kinase; **IRS-1**: Insulin Receptor Substrate 1; **kDa**: kiloDalton; **LATS**: LArge Tumor Suppressor kinase; **LDHA**: *Lactate DésHydrogénase A*; **Lys**: Lysine; **MDM2**: Mouse Double Minute 2; **MMP**: Matrix MetalloProteinase; **mTOR**: mammalian Target Of Rapamycin; **mTORC1**: mTOR Complex 1; **mut**: muté; **MYBL1**: V-Myb MYeloBlastosis viral oncogene homolog proto-oncogene Like 1; **NF- κ B**: Nuclear Factor κ B; **O-GlcNAcylation**: O-N-AcétylGlucosaminylation; **OGA**: β -O-GlcNAcAse; **OGT**: β -O-GlcNAcTransférase; **P**: Phosphate; **p120**: protéine de 120 kDa; **p300**: protéine de 300 kDa; **p50**: protéine de 50 kDa; **p53**: protéine de 53 kDa; **p65**: protéine de 65 kDa; **PDH**: Pyruvate DésHydrogénase; **PDHK1**: PDH Kinase 1; **PDK1**: Phosphoinositide-Dependent Kinase 1; **PEP**: PhosphoEnolPyruvate; **PFK**: PhosphoFructoKinase; **PGK1**: PhosphoGlycérate Kinase 1; **PI**: PhosphatidylInositol; **PI3K**: PI-3-Kinase; **PIPKI γ** : PIPHosphate Kinase type γ ; **PKM2**: Pyruvate Kinase M2; **PPP**: Pentose Phosphate Pathway; **RE**: *Réticulum Endoplasmique*; **RTK**: Récepteur Tyrosine Kinase; **Ser**: Sérine; **SKP2**: *Synthesis-phase Kinase-associated Protein 2*; **SLC2A1**: *SoLute Carrier 2A1*; **SNAI2**: *SNAIL 2*; **TEAD**: Transcriptional EnhAncer Domain; **Thr**: Thréonine; **TP53**: *Tumor P53*; **VEGF1**: *Vascular Endothelial Growth Factor 1*; **YAP**: Yes-Associated Protein; **ZEB1**: *Zinc finger E-box-Binding homeobox 1*.

8.4.4.1. Croissance

La O-GlcNAcylation participe à la dérégulation des enzymes glycolytiques, des facteurs de transcription c-Myc, p53, FoxO3, FoxM1, de YAP, de la β -caténine, de NF- κ B et de la voie PI3K/AKT/mTOR impliqués dans la croissance de plusieurs types de cancer dont le CCR (**Figure 60**).

Après son incorporation cellulaire par les transporteurs GLUT, le Glc est métabolisé par la glycolyse. Cette voie est régulée par trois enzymes principales qui catalysent des réactions irréversibles : HK, PFK et **PK** (**Pyruvate Kinase**) qui, respectivement, convertissent le Glc en Glc-6-P, le Fru-6-P en Fru-1,6-P et du **PEP** (**PhosphoEnolPyruvate**) en pyruvate. **PGK1** (**PhosphoGlycérate Kinase 1**) est la première enzyme de la glycolyse générant de l'ATP en convertissant le **1,3-BPG** (**1,3-BisPhosphoGlycérate**) en **3-PG** (**3-PhosphoGlycérate**). De manière intéressante, la O-GlcNAcylation a été identifiée sur la Ser⁴⁶⁵ de GLUT1 dans les érythrocytes (Wang et al., 2009) et pourrait participer à la régulation de l'absorption du Glc. En parallèle, la O-GlcNAcylation de PFK1, PKM2 et PGK1 participe à l'effet Warburg des cellules cancéreuses (**Figure 60**). En réponse à l'hypoxie, PFK1 est O-GlcNAcylée et inhibée sur la Ser⁵²⁹ dans les cellules cancéreuses pulmonaires H1299. Cette glycosylation redirige alors le flux du glucose vers la voie **PPP** (**Pentose Phosphate Pathway**) fournissant des équivalents réducteurs NADPH, H⁺ et des pentoses nécessaires à la synthèse des nucléotides. La mutation de ce site O-GlcNAcylé diminue la prolifération des cellules H1299 *in vitro* et *in vivo* après xénogreffe chez la souris (Yi et al., 2012, p.1). PKM2 est l'isoforme de PK produite par épissage alternatif et préférentiellement exprimée dans le cancer. La O-GlcNAcylation de PKM2 sur les acides aminés Ser³⁶², Thr³⁶⁵, Thr⁴⁰⁵ et Ser⁴⁰⁶ perturbe les interactions des sous-unités du tétramère PKM2 dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et du col de l'utérus HeLa. Il en résulte un désassemblage du tétramère, une activité enzymatique réduite de PK et une translocation nucléaire de PKM2 où elle stimule l'expression de GLUT1 et de la **LDHA** (**Lactate DésHydrogénase A**). La mutation de ces sites réduit l'effet Warburg et la prolifération cellulaire *in vitro* et *in vivo* (Y. Wang et al., 2017; Singh et al., 2020). L'OGA aurait également un rôle majeur dans la régulation de l'activité de PKM2 en fonction de la disponibilité en nutriments. Lorsque celle-ci est limitée, l'OGA déglycosyle et active PKM2 afin de favoriser le flux de carbone dans le cycle de Krebs et la survie des cellules cancéreuses. En revanche, en condition hyperglycémique, le « pseudo »-domaine HAT de l'OGA permet son association avec PKM2 et d'autres protéines lui conférant une activité lysine acétyltransférase. Ainsi, l'acétylation et l'inactivation de PKM2 permet d'augmenter la glycolyse aérobie et la prolifération cellulaire (Singh et al., 2020). Récemment, Nie et collaborateurs (2020) montrent que la O-GlcNAcylation de PGK1 sur le résidu Thr²⁵⁵ augmente l'activité de l'enzyme dans la glycolyse ainsi que sa translocation mitochondriale dans les cellules cancéreuses coliques HT-29. Au niveau mitochondrial, PGK1 phosphoryle la Thr³³⁸ et active **PDHK1** (**PDH (Pyruvate DésHydrogénase) Kinase 1**). PDHK1 active peut alors phosphoryler la Ser²⁹³ et inhiber PDH afin de réduire l'utilisation du pyruvate dans le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative mitochondriale. Ainsi, la mutation du site de glycosylation de PGK1 diminue l'effet Warburg et la croissance des cellules HT-29 *in vitro* et *in vivo* (Nie et al., 2020) (**Figure 60**).

L'expression aberrante du facteur de transcription proto-oncogène c-Myc est observée dans de nombreux cancer et notamment dans le CCR où elle est élevée dans environ 70-80% des cas (Gabay et al., 2014). En ciblant c-Myc sur la Thr⁵⁸ et en empêchant la liaison de l'ubiquitine ligase E3 **Fbw7** (**F-box/wD repeat-containing protein 7**), la *O*-GlcNAcylation augmente sa stabilité et son activité sur des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore le métabolisme (Kamemura et al., 2002; Luanpitpong et al., 2017; Lee et al., 2020). Notamment, c-Myc stimule la glycolyse en activant les gènes codant GLUT1, HK2, PFK et ENO1 (Miller et al., 2012). La *O*-GlcNAcylation de c-Myc est majoritairement retrouvée dans les cellules leucémiques HL60 sevrées et diminue après leur stimulation par le sérum (Kamemura et al., 2002). Récemment Lee et collaborateurs (2020) ont montré que l'inhibition pharmacologique de l'OGT par OSMI-1 réduit la *O*-GlcNAcylation de la Thr⁵⁸ et la stabilité de c-Myc, l'absorption du glucose et la prolifération des cellules leucémiques pré-B (Lee et al., 2020) (**Figure 60**).

Le gène suppresseur de tumeur *TP53* est l'un des gènes les plus communément mutés dans le cancer et, notamment, dans environ 50-60% des CCR (Cancer Genome Atlas Network, 2012) (**Figure 5**). Plusieurs mutations gain de fonction de *TP53* ont été identifiées et confèrent des activités anti-apoptotiques, pro-migratoires et pro-invasives (Oren and Rotter, 2010). L'effet biologique de la *O*-GlcNAcylation sur la stabilité du facteur de transcription p53 pourrait dépendre du statut mutationnel de *TP53*. Dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 avec *TP53* non muté, la *O*-GlcNAcylation de la Ser¹⁴⁹ diminue la phosphorylation sur la Thr¹⁵⁵ et l'interaction de p53 avec l'ubiquitine ligase E3 MDM2. L'augmentation de la *O*-GlcNAcylation par inhibition de l'OGA induit l'accumulation de p53 et la mort cellulaire (W.H. Yang et al., 2006). Il est supposé que dans les cellules cancéreuses présentant une mutation gain de fonction de *TP53*, la *O*-GlcNAcylation stimule l'activité oncogénique de p53. Dans les cellules cancéreuses pulmonaires NCI-H460 avec *TP53* non muté et traitées au cisplatine (**CDDP**, **Cis-DiamineDichloroPlatinum(II)**), la *O*-GlcNAcylation induit l'augmentation de l'ubiquitination et de la dégradation protéasomale de p53 (Luanpitpong et al., 2017). Ainsi, la *O*-GlcNAcylation pourrait avoir un effet différent sur la stabilité de p53 selon le site modifié, le type cellulaire et le traitement chimiothérapeutique (**Figure 60**).

Le facteur de transcription suppresseur de tumeur FoxO3 possède des activités anti-prolifératives et pro-apoptotiques. Ce suppresseur de tumeur est inhibé en aval de plusieurs voies oncogéniques telles que PI3K/AKT, ERK ou NF-κB et son expression est diminuée au cours de la cancérogenèse du CCR (Laissue, 2019). La *O*-GlcNAcylation de FoxO3 est plus élevée dans les tumeurs pancréatiques, hépatiques et stomacales par rapport aux tissus sains adjacents. Dans les cellules cancéreuses pancréatiques, la *O*-GlcNAcylation de la Ser²⁸⁴ au niveau du domaine de transactivation de FoxO3 induit l'augmentation de l'expression de *MDM2* et la diminution de celle de *TP53* et de *CDKN1A*. De plus, l'ubiquitine ligase E3 MDM2 cible et induit la dégradation de p53 et de la CKI p21^{Cip1} impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, la mutation de ce site de glycosylation induit l'arrêt des cellules cancéreuses pancréatiques PANC-1 en phase G₁ du cycle cellulaire (Shin et al., 2018) (**Figure 60**).

L'augmentation de l'expression du facteur de transcription proto-oncogène FoxM1 est observée dans une variété de cancers incluant le CCR (Liao et al., 2018). Le niveau d'expression de FoxM1 est notamment corrélé à la progression et la métastase du CCR (Liao et al., 2018; Laissue, 2019). Certaines cibles de FoxM1 sont essentielles aux transitions G₁/S et G₂/M du cycle cellulaire telles que **Skp2** (**S**-phase **k**inase-associated **p**rotein **2**), cycline B ou encore AKB. Skp2 est un membre du complexe multiprotéique E3 ubiquitine ligase **SCF** (**S**kp, **C**ullin, **F**-box) impliqué dans la dégradation de p27^{Kip1}. Caldwell et collaborateurs (2010) montrent notamment que le *knock-down* de l'*OGT* diminue la *O*-GlcNAcylation globale et la croissance des cellules cancéreuses mammaires MCF-10A-ErbB2 et MDA-MB-231 *in vitro* et *in vivo* en déstabilisant FoxM1. Ainsi, la réduction de l'*OGT* entraîne l'augmentation de l'expression de la CKI p27^{Kip1} et l'arrêt des cellules MCF-10A-ErbB2 en phase G₁ (Caldwell et al., 2010). Toutefois, aucun site de *O*-GlcNAcylation n'a été identifié sur FoxM1 et sa régulation par la glycosylation serait notamment sous le contrôle de GSK3-β. En effet, dans les cellules cancéreuses gastriques MNK45, la *O*-GlcNAcylation augmente la phosphorylation inhibitrice sur la Ser⁹ de GSK3-β. De ce fait, GSK3-β inactivée ne peut plus phosphoryler et induire la dégradation protéasomale de FoxM1 (Y. Inoue et al., 2018) (Figure 60).

La voie de signalisation Hippo fait intervenir la kinase LATS1/2 qui, activée, phosphoryle et inhibe YAP et **TAfaZzin (TAZ)**. En effet, la phosphorylation de YAP, notamment sur la Ser¹²⁷, induit sa localisation cytoplasmique et sa dégradation protéasomale par l'ubiquitine ligase E3 βTrCP. Lorsque la voie Hippo est inhibée, le complexe YAP/TAZ hypo-phosphorylé est actif et est transloqué dans le noyau. Il agit comme co-activateur transcriptionnel du facteur de transcription TEAD activant l'expression de gènes impliqués dans prolifération, la survie et la migration cellulaires (Meng et al., 2016). Ainsi, l'activation de l'oncogène YAP est essentielle à l'initiation et la croissance de la plupart des tumeurs solides. Le niveau élevé et la localisation nucléaire de YAP sont associés au mauvais pronostic du CCR (Zanconato et al., 2016). La *O*-GlcNAcylation de YAP sur les résidus Ser¹⁰⁹ et Thr²⁴¹ affecte sa liaison avec LATS1 et donc sa phosphorylation sur la Ser¹²⁷. Ainsi, la glycosylation de YAP augmente sa stabilité, stimule l'activité transcriptionnelle de TEAD et la tumorigenèse des cellules cancéreuses hépatiques BEL-7402 et SMMC-7721 et pancréatiques L3.6 (Zhang et al., 2017; Peng et al., 2017) (Figure 60).

Dans le CCR, 90% des tumeurs présentent une mutation d'un facteur régulateur clé de la voie Wnt, le plus souvent sur *APC* ou *CTNNB1*, résultant en l'activation de la voie (cf. 2.2.1 page 36) (Figures 5 et 6). Plus de 50% des cancers, et notamment plus de 80% des tumeurs colorectales, présentent une accumulation nucléaire du proto-oncogène β-caténine (White et al., 2012; Shang et al., 2017). La *O*-GlcNAcylation peut favoriser la prolifération des cellules cancéreuses en ciblant la β-caténine. En effet, la glycosylation stabilise la β-caténine et augmente son activité transcriptionnelle potentiellement sur des gènes prolifératifs telles que *MYC* ou *CCND1* (Olivier-Van Stichelen, Guinez, et al., 2012; Olivier-Van Stichelen et al., 2014; Harosh-Davidovich and Khalaila, 2018) (cf. 6.2.2 page 159) (Figure 60).

Aucune mutation activatrice de l'oncogène NF- κ B n'a été identifiée dans la plupart des cancers épithéliaux. Néanmoins, une activation constitutive de NF- κ B est associée à la progression tumorale et au mauvais pronostic du CCR (Staudt, 2010; Patel et al., 2018). La O-GlcNAcylation participe à la croissance des cellules cancéreuses pancréatiques MiaPaCa-2 en activant la voie anti-apoptotique NF- κ B (Ma et al., 2013) (cf. 7.5 page 175) (Figure 60).

La voie PI3K/AKT/mTOR régule le métabolisme, la synthèse protéique, la croissance, l'angiogenèse et l'autophagie cellulaires. Une suractivation de cette signalisation est reportée dans environ 40% des cancers incluant le CCR avec notamment, les mutations de *PIK3CA* et *PTEN* (Danielsen et al., 2015) (Figures 5 et 6). L'augmentation de la O-GlcNAcylation stimule la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR en augmentant l'expression et l'activité de IRS-1, PI3K et AKT, et en inhibant AMPK (cf. 7.5 page 175). mTOR favorise l'absorption du glucose et la glycolyse en stimulant l'expression du facteur de transcription *HIF1 α* et de ses gènes cibles codant GLUT, HK, PFK et LDHA. AKT promeut la prolifération des cellules cancéreuses en augmentant l'expression de la cycline D1, probablement par l'inhibition de GSK3- β . De plus, AKT possède une activité anti-apoptotique, notamment en ciblant Bad (pour revue : Very et al., 2018) (Figure 60).

8.4.4.2. Adhésion, migration et invasion

Mi et collaborateurs (2011) ont montré que la O-GlcNAcylation régule l'invasion de manière type cellulaire dépendante. En effet, le *knock-down* de l'*OGT* et l'inhibition pharmacologique de l'*OGA* diminue et augmente respectivement l'invasion des cellules cancéreuses pulmonaires A549 mais pas des cellules H1299 ni cellules cancéreuses coliques HT-29 (Mi et al., 2011). D'autres études ont révélé que la O-GlcNAcylation régule les potentiels d'adhésion, migratoire, invasif et angiogénique des cellules en modulant notamment la E-cadhérine, l'intégrine α 5, la cofiline et FoxM1 (Figure 60).

La sous-expression de la E-cadhérine membranaire est associée à certaines caractéristiques malignes, notamment la progression tumorale, la perte de différenciation, l'invasion et les métastases. Des études récentes ont identifié une association entre cette perte d'expression et le caractère invasif du CCR. Ce mécanisme est rarement attribué à la mutation du gène *CaDHérine 1* (*CDH1*) lui-même mais plutôt aux MPT (Christou et al., 2017) (Figure 60). Gu et collaborateurs (2010) montrent que la O-GlcNAcylation augmente, *in vitro*, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires et *in vivo* la formation de métastases pulmonaires. Cet effet résulterait de la modification de la β -caténine et de p120 et de la diminution subséquente de la localisation membranaire de la E-cadhérine impliquée dans l'adhésion cellulaire (Gu et al., 2010) (cf. 7.4 page 173) (Figures 49 et 60).

D'autre part, le répresseur transcriptionnel de *CDH1*, Snail1, est stabilisé par la *O*-GlcNAcylation. La glycosylation de la Ser¹¹² empêche la phosphorylation par GSK3- β et la liaison de l'ubiquitine ligase E3 β TrCP1. Ainsi, la migration *in vitro* et l'invasion *in vivo* des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 sont abolies après *knock-down* de l'*OGT* mais restaurées après celui de ***SNAI1 (SNAI1)*** (S.Y. Park et al., 2010). De même, l'inactivation de l'*OGT* augmente l'expression de *CDH1* et diminue la migration des cellules cancéreuses hépatiques HepG2 (Zhu et al., 2012). Récemment, Zhou et collaborateurs (2019) montrent que le *knock-down* de *GFPT2* diminue la *O*-GlcNAcylation globale et augmente l'expression de la E-cadhérine, et réduit la migration et l'invasion des cellules cancéreuses ovariennes SKOV3 et HEY. Le mécanisme moléculaire sous-jacent est la réduction de la localisation nucléaire et de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine sur *SNAI2* et ***ZEB1 (Zinc finger E-box-Binding homeobox 1)***, les répresseurs transcriptionnels de *CDH1* (Zhou et al., 2019). Récemment, notre équipe a démontré que le *knock-down* de l'*OGT* diminue la *O*-GlcNAcylation de la E-cadhérine et, augmente son expression et sa localisation membranaire dans les cellules cancéreuses HT-29. De manière intéressante, la diminution de la *O*-GlcNAcylation entraîne également une diminution de la *N*-glycosylation avec moins de résidus GlcNAc branchés en β 1,6 et d' α 1,6-fucosylation. Or, la *N*-glycosylation du domaine extracellulaire de la E-cadhérine régule ses propriétés adhésives (Biwi et al., 2019) (**Figure 60**).

Les intégrines sont des protéines transmembranaires qui permettent les interactions cellule/cellule et cellules/MEC. Notamment, l'intégrine α 5 s'associe avec l'intégrine β 1 pour former l'hétérodimère α 5 β 1 qui reconnaît ensuite spécifiquement la fibronectine de la MEC. L'intégrine α 5 est surexprimée aux niveaux transcriptionnel et protéique dans les cellules cancéreuses coliques et les tissus colorectaux par rapport aux tissus sains adjacents (Murillo et al., 2004; Yu et al., 2019, p.5). La *O*-GlcNAcylation de l'intégrine α 5 augmente son expression dans les cellules cancéreuses coliques RKO et SW620 (Yu et al., 2019). La surexpression de l'intégrine α 5 augmente la croissance des cellules RKO *in vitro* et la tumorigenèse *in vivo* après xénotransgreffe chez la souris. Au contraire, son inhibition diminue la croissance et l'adhésion cellulaires *in vitro* et *in vivo* (Murillo et al., 2004; Yu et al., 2019, p.5). La *O*-GlcNAcylation de l'intégrine α 5 serait donc un élément moteur de la progression du CCR (**Figure 60**).

La cofiline est une protéine qui intervient dans la déstabilisation et le renouvellement de l'actine filamenteuse. Dans les cellules invasives, la cofiline est enrichie et activée localement au niveau des lamellipodes et des invadopodes. Récemment, Mousavi et collaborateurs (2018) ont montré une expression plus élevée de ***CoFiline 1 (CFL1)*** dans le CCR (Mousavi et al., 2018). La *O*-GlcNAcylation de la cofiline sur le résidu Ser¹⁰⁸ facilite sa localisation au niveau des invadopodes des cellules cancéreuses mammaires de rat MTLn3. De ce fait, la mutation de ce site de glycosylation diminue la migration et l'invasion cellulaires (Huang et al., 2013) (**Figure 60**).

L'inactivation de l'OGT diminue l'invasion des cellules cancéreuses mammaires MCF-10A-ErbB2 et de prostate PC3-ML (Caldwell et al., 2010; Lynch et al., 2012). Elle inhibe également la formation de tubes à partir des cellules HUVEC et la formation de métastases osseuses après xénogreffe des cellules PC3-ML chez la souris (Lynch et al., 2012). En plus de réguler la croissance cellulaire, l'activation par *O*-GlcNAcylation du facteur de transcription FoxM1 stimule l'invasion et l'angiogenèse. En effet, certains des gènes cibles de FoxM1 sont *MMP2*, *MMP9* et *VEGFA* codant respectivement des protéases dégradant les composants de la MEC et un facteur pro-angiogénique (Caldwell et al., 2010; Lynch et al., 2012). De manière intéressante, la *O*-GlcNAcylation augmente également l'expression de *MMP1* et *MMP3*, et l'invasion des cellules cancéreuses hépatiques HepG2 (Zhu et al., 2012) (Figure 60).

L'augmentation de la *O*-GlcNAcylation après traitement au Thiamet-G favorise l'invasion des cellules cancéreuses gastriques AGS et SGC-7901 et thyroïdiennes 8305C de manière dépendante de l'activation de la voie PI3K/AKT. En effet, l'effet pro-invasif de la *O*-GlcNAcylation est inhibé par l'inhibition pharmacologique de PI3K ou diminution de la synthèse de AKT par siRNA (P. Zhang et al., 2015; Zhang and Chen, 2016). Ce mécanisme serait contrôlé par l'activation des MMP-2 et -9 par AKT (Manning and Cantley, 2007) (Figure 60).

8.4.4.3. Réponse aux thérapies anti-cancéreuses

A l'heure actuelle, très peu d'études ont analysé le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la réponse aux thérapies anti-cancéreuses. Des travaux très récents ont néanmoins mis en lumière l'implication de la *O*-GlcNAcylation dans la réponse des cellules cancéreuses à certaines hormonothérapies, thérapies ciblées et chimiothérapies incluant le tamoxifène, la thérapie TRAIL, le cisplatine (CDDP) et le **BTZ (BorTéZomib)** (Figure 61).

8.4.4.3.1. Voie AKT/B-box-Binding Protein 1 (XBP1) et agents chimiothérapeutiques

Les niveaux d'UDP-GlcNAc et de *O*-GlcNAcylation globale des protéines sont augmentés dans plusieurs lignées cancéreuses traitées avec des agents chimiothérapeutiques tels que l'antracycline **DOX**orubicine (**DOX**, Adriblastine®), l'IRI et le 5-FU. En comparaison avec leurs cellules parentales, les cellules cancéreuses résistantes à la DOX mammaires MCF-7/**ADR (Acquired DOX-Resistance)** et leucémiques HL-60/**ADR** présentent un niveau plus élevé de *O*-GlcNAcylation (Liu et al., 2018).

En réponse au traitement des cellules MCF-7/ADR et cancéreuses hépatiques SMMC-721 à la DOX ou au 5-FU, AKT est activée et augmente l'expression de **XBP1 (X-box-Binding Protein 1)**, un facteur de transcription régulant l'expression de la GFAT. Ainsi augmentée, la *O*-GlcNAcylation cible et diminue le clivage des caspase-9 initiatrice et caspase-3 effectrice et, active les protéines anti-apoptotiques NF- κ B et AKT. L'inhibition pharmacologique de l'OGT par OSMI-1 sensibilise alors les cellules MCF-7/ADR et SMMC-721 à la DOX, à la **CPT (CamPtoThécine)** et au 5-FU et les cellules primaires de **LMA (Leucémie Myéloïde Aigüe)** réfractaires ou en rechute à la DOX. Les auteurs suggèrent que la combinaison d'un inhibiteur de la *O*-GlcNAcylation avec la chimiothérapie pourrait être une nouvelle stratégie anti-cancéreuse (Liu et al., 2018) (Figure 61).

8.4.4.3.2. Tamoxifène

Le tamoxifène (Nolvadex®), est un antagoniste partiel du récepteur $E\alpha$ utilisé dans le traitement du cancer du sein hormono-dépendant.

Kanwal et collaborateurs (2013) ont montré que la *O*-GlcNAcylation induit une diminution de l'expression du gène codant le récepteur $E\alpha$ dans les cellules cancéreuses du sein hormono-sensibles MCF-7. Ce mécanisme indépendant de l'activation de la voie PI3K/AKT promeut alors la résistance de ces cellules au tamoxifène. Le ciblage de la *O*-GlcNAcylation pourrait être une approche thérapeutique intéressante pour sensibiliser les tumeurs mammaires résistantes aux anti-œstrogènes (Kanwal et al., 2013) (Figure 61).

8.4.4.3.3. Thérapie TRAIL

Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours pour tester l'efficacité de la thérapie TRAIL dans le cancer. Ainsi, TRAIL permuté circulairement (**Circularly Permutated TRAIL, CTP**), consistant en la fusion par un « linker » des séquences ¹³⁵Thr-Gly²⁸⁰ et ¹²²Val-Thr¹³⁵ de TRAIL afin de réorganiser l'ordre de ses acides aminés sans affecter sa conformation, est testé dans le myélome. Des anticorps ont été également développés : un anti-TRAIL-R (dulanermine) contre le CCR, le lymphome et le cancer du poumon non à petites cellules (**NSCLC, Non-Small-Cell Lung Carcinoma**), un anti-TRAIL-R1 (mapatumumab) contre plusieurs tumeurs solides incluant les cancers colorectaux, NSCLC, hépatiques et le lymphome non-hodgkinien ou encore un anti-TRAIL-R2 (tigatuzumab) contre les cancers colorectaux, pancréatiques, hépatiques et mammaires (Yuan et al., 2018).

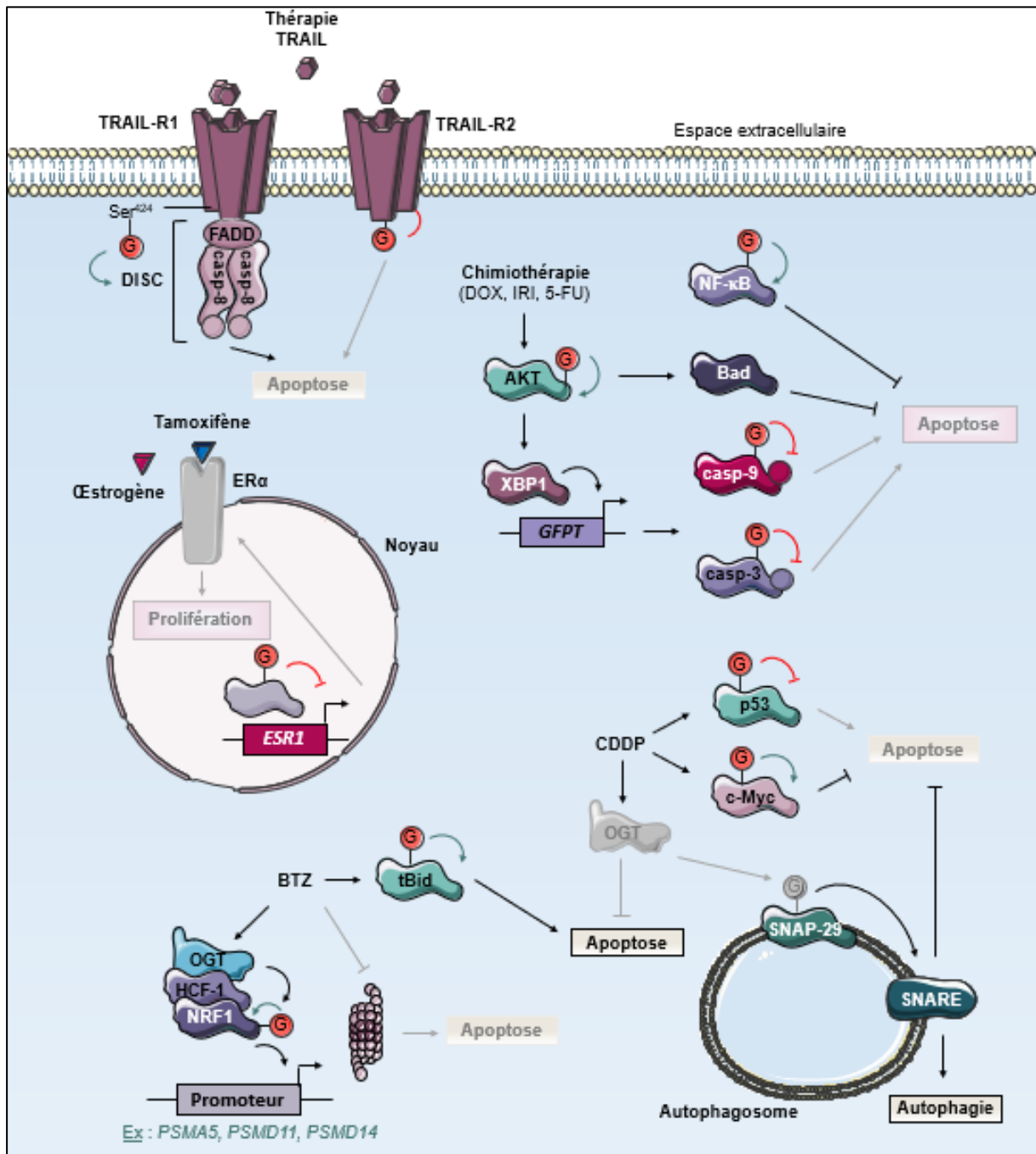


Figure 61 : Régulation de la réponse aux thérapies anti-cancéreuses par la O-GlcNAcylation. Le traitement chimiothérapeutique augmente le niveau de O-GlcNAcylation globale *via* XBP1/GFPT. Dépendamment du type cellulaire, la O-GlcNAcylation régule la réponse du cancer au tamoxifène, à la thérapie TRAIL, au BTZ, à la DOX, à l'IRI et au 5-FU.

5-FU : 5-FluoroUracile ; **Bad** : B-cell lymphoma 2 associated agonist of cell death ; **BTZ** : BorTéZomib ; **casp** : caspase ; **DISC** : Death-Inducing Signaling Complex ; **DOX** : DOXorubicine ; **ER α** : Estrogen Receptor α ; **ESR1** : *ES*trogen Receptor 1 ; **FADD** : Fas-Associated protein with Death Domain ; **G** : GlcNAc ; **GFPT** : *Gl*utamine :*Fr*uctose-6-*Ph*osphatase amido*Tr*ansférase ; **GlcNAc** : N-acétylGlucosamine ; **IRI** : IRInotécan ; **NF- κ B** : Nuclear Factor κ B ; **NRF** : Nuclear Respiratory Factor ; **O-GlcNAcylation** : *O-N*-AcétylGlucosaminylation ; **OGT** : β -*O*-GlcNAc*T*ransférase ; **p53** : protéine de 53 kilodaltons ; **PSM** : *ProtéaSoMe* ; **ROS** : Reactive Oxygen Species ; **Ser** : Sérine ; **SNAP-28** : *Sy*NAPtosomal-associated protein 28 ; **SNARE** : Soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein *R*Eceptor ; **tBid** : truncated *BH*3 interacting-domain death agonist ; **TET1** : Ten-Eleven Translocation 1 ; **TRAIL** : Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand ; **TRAIL-R** : TRAIL-Receptor ; **XBP1** : X-box-Binding Protein 1.

Le récepteur de mort TRAIL-R1 est *O*-GlcNAcylé sur la Ser⁴²⁴ au niveau du domaine **DD** (**D**eath **D**omain) qui régule l'apoptose et la nécrose en réponse à la liaison de son ligand TRAIL. En réponse à TRAIL, la *O*-GlcNAcylation de TRAIL-R1 permettrait la formation du complexe DISC, le clustering des récepteurs au niveau des radeaux lipidiques et l'induction de la mort cellulaire. De manière intéressante, plusieurs lignées cellulaires cancéreuses résistantes à TRAIL arborent une mutation sur la Ser⁴²⁴ de TRAIL-R1 et donc non *O*-GlcNAcylable. La mutation de la Ser⁴²⁴ pourrait alors être un marqueur diagnostique potentiel pour le test génétique des patients atteints de cancer et un marqueur diagnostique pour la réponse à la thérapie TRAIL (H. Lee et al., 2019) (**Figure 61**).

Dans les cellules cancéreuses pancréatiques MiaPaPc-2 et BxPC-3, la surexpression de l'*OGT* augmente la *O*-GlcNAcylation globale des protéines et inhibe l'apoptose induite par le tigatuzumab, un agoniste de TRAIL-R2. Au contraire, le *knock-down* de l'*OGT* resensibilise les cellules S2VP10 et PANC-1 résistantes au tigatuzumab *in vitro* et *in vivo* après xéno greffe chez la souris en augmentant la trimérisation de TRAIL-R2 et l'activation des signaux apoptotiques. TRAIL-R2 est la cible directe de la glycosylation et la régulation de son oligomérisation est indépendante de la protéine adaptatrice FADD. Ainsi, l'inhibition de la *O*-GlcNAcylation pourrait augmenter son efficacité (S.-Z. Yang et al., 2020). De plus, le niveau de *O*-GlcNAcylation globale ou de TRAIL-R2 *O*-GlcNAcylé pourrait être un biomarqueur de la sensibilité du cancer pancréatique à la thérapie TRAIL (**Figure 61**).

8.4.4.3.4. Cisplatine (Cis-DiamineDichloroPlatinum(II), CDDP)

Le CDDP est un agent alkylant utilisé dans le traitement des cancers de la vessie, de la tête et du cou, du poumon, de l'ovaire et du testicule.

Zhou et collaborateurs (2018) montrent que l'expression de l'*OGT* est significativement plus faible dans les tissus cancéreux ovariens chimiorésistants au CDDP par rapport aux tissus sensibles. D'autre part, le *knock-down* de l'*OGT* augmente la résistance au CDDP, mais pas au taxane paclitaxel, des cellules cancéreuses ovariennes A2780 et SKOV3 *in vitro* et *in vivo* après xéno greffe chez la souris. La diminution de l'expression de l'*OGT* diminue la glycosylation de **SNAP-29** (**S**yNAPtosomal-associated protein **29**) et favorise la formation du complexe **SNARE** (**S**oluble **N**-ethylmaleimide-sensitive-factor **A**ttachment protein **R**Eceptor) qui permet la fusion des autophagosomes et des lysosomes en autolysosomes. Cette augmentation du flux autophagique corrèle avec une diminution de l'apoptose (Zhou et al., 2018). Au contraire, Wang et collaborateurs (2018) montrent que l'inactivation de l'*OGT* augmente le flux autophagique et l'apoptose induite par le traitement au CDDP des cellules cancéreuses de vessie T24 et UMUC-3 *in vitro* et *in vivo* (Wang et al., 2018).

Aussi, l'apoptose induite par le CDDP est diminuée par inhibition de l'OGA dans plusieurs types cellulaires de cancer pulmonaire. Les *knock-down* de *MYC* et de *TP53* augmente et diminue respectivement la sensibilité au CDDP. Le mécanisme moléculaire sous-jacent fait intervenir la *O*-GlcNAcylation des deux produits de ces gènes, c-Myc et p53, dépendamment du contexte cellulaire. En effet, dans les cellules NCI-H460 où le CDDP induit fortement l'activation de p53, la glycosylation du suppresseur de tumeur augmente son ubiquitination et sa dégradation protéasomale. Il en résulte un gain de fonction oncogénique et anti-apoptotique. Dans les cellules NCI-H292, le CDDP induit faiblement l'activation de p53 et, la *O*-GlcNAcylation stabilise l'oncogène c-Myc et favorise la survie cellulaire. Ici aussi, le ciblage de cette MPT pourrait servir de stratégie thérapeutique pour traiter les cancers pulmonaires résistants au CDDP (Luanpitpong et al., 2017) (Figure 61).

8.4.4.3.5. BorTéZomib (BTZ)

Le BTZ (Velcade®) est un inhibiteur du protéasome 26S utilisé dans le traitement du lymphome du manteau (MCL) et du myélome multiple.

L'inhibition pharmacologique de l'OGA avec le **KCZ (KetoConaZole)** augmente la *O*-GlcNAcylation et la stabilité de la protéine pro-apoptotique tBid. Ce mécanisme augmente la sensibilité *ex vivo* de cellules primaires dérivées de patients et *in vivo* de cellules de lymphome MCL Jeko et Granta résistantes au BTZ. Cette étude suggère l'application clinique d'un inhibiteur de l'OGA tel que le KCZ dans la thérapie combinée contre les lymphomes MCL résistants et les autres tumeurs malignes dont le développement et l'apoptose dépendent de la dérégulation de tBid (Luanpitpong et al., 2018).

Sekine et collaborateurs (2018) montrent qu'il existe, *in vivo*, une corrélation positive entre les niveaux d'OGT et certaines sous-unités du protéasome dans les échantillons cliniques de tumeurs mammaires et colorectales. HCF-1 interagit avec l'OGT et NRF1, un facteur de transcription activateur de l'expression de certains gènes codant des sous-unités protéasomales. En réponse au traitement des cellules cancéreuses HeLa ou MDA-MB-231 avec les inhibiteurs pharmacologiques des sous-unités 19S et 20S du protéasome, b-AP15 et MG132 respectivement, la *O*-GlcNAcylation stabilise le facteur de transcription NRF1. La glycosylation bloque la phosphorylation de NRF1 sur les résidus Ser⁴⁴⁸ et Ser⁴⁵¹ et son interaction subséquente avec l'ubiquitine ligase E3 βTrCP. En parallèle, HCF-1 promeut la liaison de NRF1 au niveau des régions promotrices des gènes **PSMA5 (ProteaSome subunit Alpha type-5)**, **PSMD11** et **PSMD14** codant des sous-unités du protéasome. Ainsi, le *knock-down* de l'OGT augmente la sensibilité au BTZ des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et pancréatiques NCI-H460 *in vitro* et *in vivo* après xénotransgreffe chez la souris. Cette étude suggère que l'inhibition de l'OGT pourrait être une thérapie anticancéreuse prometteuse par suppression de l'activité de NRF1 et inhibition subséquente du protéasome (Sekine et al., 2018) (Figure 61).

8.4.5. Impact de la O-GlcNAcylation sur la réponse au 5-FU

Il existe une relation entre métabolisme du glucose et réponse au 5-FU. Alors que les pourcentages d'individus obèses et diabétiques progressent rapidement dans les pays industrialisés, les données épidémiologiques montrent que ces patients hyperglycémiques présentent un risque accru de récurrence du CCR après un traitement à la chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU. Ainsi, Meyerhardt et collaborateurs (2012) montrent que, plus la charge glycémique alimentaire est élevée, plus le risque de récurrence est élevé (Meyerhardt et al., 2012). Par rapport aux patients ayant un poids normal, les patients très obèses ($IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$) ont un risque de récurrence de 38% supérieur (Dignam et al., 2006). Enfin, les patients sans et avec un DT2 possèdent, respectivement, une survie sans récurrence (Disease-Free Survival, DFS) à 5 ans de 64% et 56% (Meyerhardt et al., 2003). Au contraire, une activité physique à effet hypoglycémiant réduit le risque de récurrence du CCR (Meyerhardt et al., 2006).

Plusieurs études ont corrélé l'expression de l'*OGT* à la sensibilité au 5-FU. Temmink et collaborateurs (2010) ont analysé l'expression génique des cellules cancéreuses coliques H630 résistantes au TFT, un analogue fluoré de thymidine qui fait partie de la chimiothérapie TAS-102 et qui partage la voie anabolique d'inhibition de la TS par le 5-FU. Les auteurs montrent que, par rapport aux cellules parentales, les résistantes sous-expriment les gènes *TK*, *SLC29A* et *OGT* (Temmink et al., 2010). Au contraire, une étude transcriptomique sur des tumeurs humaines **NCI-60** (National Cancer Institute 60) a révélé que l'expression de l'*OGT* est négativement corrélée à la sensibilité au FdUMP. En revanche, aucune corrélation n'est établie pour le FUDr ni pour le 5-FU (Gmeiner et al., 2010). Récemment, l'*OGT* a été identifié dans un cluster de gènes co-exprimés et associés à la résistance au 5-FU du CCR (Cao et al., 2018). Ce cluster contient également des gènes impliqués dans l'apoptose et la signalisation Fas (*CFLAR* (*CASP8* (*CASPase-8*) and *FADD-Like Apoptosis Regulator*)) dans la prolifération cellulaire (*CAPRIN2*), dans la réparation de l'ADN (*XPA* (*Xeroderma Pigmentosum, complementation group A*)), dans la régulation du cycle cellulaire (*DMTF1* (*cyclin D binding V-Myb* (*Myeloblastosis viral oncogene homolog*)-like *Transcription Factor 1*) et *SYCE2* (*SYnaptosomal Complex central Element protein 2*)), dans l'activation des cellules tueuses (*TYROBP* (*TYROSine kinase-Binding Protein*)), dans le métabolisme de la taurine (*CSAD* (*Cysteine Sulfinic Acid Decarboxylase*), dans la maturation de l'ARN (*RBM6* (*RNA-Binding protein Member 6*) et *CLK1* (*CDC Like Kinase 1*)), dans la régulation transcriptionnelle (*ZNF26* (*ZiNc Finger protein 26*), *ZNF33A*, *ZNF169*, *ZNF234* *ZNF333*, *ZNF493* et *ZNF638*)), et dans la réponse cellulaire aux stimuli chimiques (*TAS2R5* (*TASte 2 Receptor member 5*) et *LTB4R2* (*LeukoTriene B4 Receptor 2*)) (Cao et al., 2018).

La O-GlcNAcylation pourrait moduler la réponse au 5-FU en régulant la glycosylation complexe, le phénotype de CSC, la réparation des dommages à l'ADN, l'apoptose ou encore le métabolisme de la drogue.

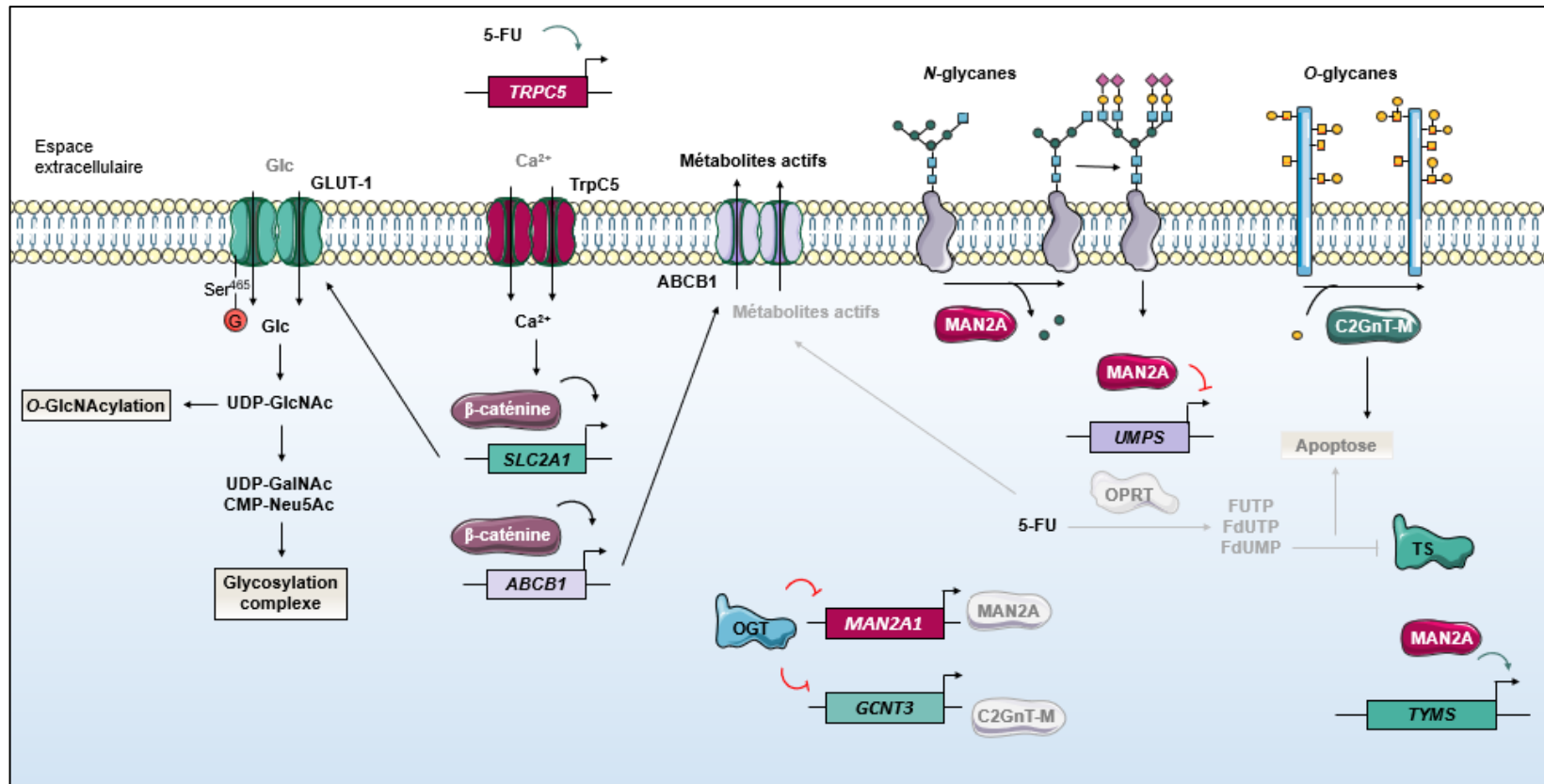


Figure 62 : Régulation de la réponse au 5-FU associée à la glycosylation complexe par la O-GlcNAcylation. La résistance au 5-FU peut avoir pour origine l'augmentation de l'influx de glucose *via* la surexpression de SLC2A1 codant GLUT-1, la diminution de l'effet cytotoxique du 5-FU par la O-glycosylation aberrante des mucines ou encore la diminution de l'anabolisme du 5-FU par la N-glycosylation aberrante.

5-FU : 5-FluoroUracile ; **ABCB1** : Adenosine TriPhosphate-Binding Cassette B1 ; **C2GnT-M** : Core 2 β 1,6-N-acétylGlucosaminylTransférase de type Mucine ; **Ca²⁺** : ions Calcium (II) ; **CMP-Neu5Ac** : CMP-N-AcétylNeuraminatate ; **CSC** : Cellule Souche Cancéreuse ; **FdUMP** : 5-FluorodésoxyUridine MonoPhosphate ; **FdUTP** : 5-FluorodésoxyUTP ; **FUTP** : 5-FluoroUTP ; **G** : GlcNAc ; **GalNAc** : N-AcétylGalactosamine ; **GCNT3** : GluCosaminyl (N-Acétyl) Transférase 3 ; **Glc** : Glucose ; **GlcNAc** : N-Acétyl-D-Glucosamine ; **GLUT** : GLUcose Transporter ; **MAN2A** : α -MANnosidase 2A ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétylGlucosaminylation ; **OGT** : β -O-GlcNAcTransférase ; **OPRT** : Orotate PhosphoRibosylTransférase ; **Ser** : Sérine ; **TrpC** : Transient Receptor Potential Channel ; **TS** : Thymidylate Synthase ; **TYMS** : ThYMidylate Synthase ; **UDP** : Uridine DiPhosphate ; **UMPS** : Uridine MonoPhosphate Synthase ; **UTP** : Uridine TriPhosphate.

8.4.5.1. Impact de la O-GlcNAcylation sur la glycosylation complexe

En plus d'avoir un rôle majeur dans le développement et la progression du CCR, certaines altérations de la glycosylation (*cf.* 8.4.2 page 200) ont été corrélées à la résistance aux thérapies anti-cancéreuses en interférant avec leur métabolisme, absorption et, effets anti-prolifératifs et anti-apoptotiques. **Ces mécanismes de résistance aux chimiothérapies (5-FU, OX et IRI) et aux thérapies ciblées (anti-VEGF et anti-EGFR) associés à la glycosylation aberrante du CCR ont été décrits dans la revue (en page 289) :**

[Very N, Lefebvre T, El Yazidi-Belkoura I. Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer \(2017\). *Oncotarget*. 9\(1\):1380-1402.](#)

In vitro, en condition hyperglycémique, les cellules cancéreuses coliques sont moins sensibles au 5-FU et présentent une prolifération accrue et une apoptose réduite (Ma et al., 2014). D'autre part, le 5-FU induit l'augmentation du niveau de GLUT1 dans les cellules cancéreuses coliques HT-29 et, les cellules résistantes au 5-FU surexpriment *SLC2A1* codant ce transporteur de glucose. La surexpression de ce dernier et l'inhibition pharmacologique du transporteur de glucose GLUT1 par le WZB117 diminue et augmente respectivement la sensibilité des cellules cancéreuses coliques au 5-FU (W. Liu et al., 2014). Récemment, Wang et collaborateurs ont montré que les cellules cancéreuses coliques HCT-8/5-FU résistantes au 5-FU surexpriment **TRPC5 (Transient Receptor Potential Channel 5)**. L'augmentation de la concentration intracellulaire en ion Ca^{2+} facilite la translocation nucléaire de la β -caténine et l'expression de *ABCB1* et *SLC2A1*. Le *knock-down* de *TRPC5* augmente la sensibilité au 5-FU des cellules HCT-8/5-FU. De plus, une expression intratumorale élevée de TrpC5 et GLUT1 dans le CCR est corrélée à l'échec de la chimiothérapie à base de 5-FU (T. Wang et al., 2015; T. Wang et al., 2017). En ciblant le transporteur de glucose GLUT1, notamment sur la Ser⁴⁶⁵ (Wang et al., 2009), la O-GlcNAcylation pourrait moduler la sensibilité au 5-FU (**Figure 62**).

D'autre part, l'inhibition pharmacologique par la swainsonine de l' α -mannosidase 2 impliquée dans la synthèse des *N*-glycanes complexes affecte l'expression des enzymes de la voie du 5-FU sans pour autant que le mécanisme moléculaire soit connu. La swainsonine augmente l'expression des gènes *TYMS* et *UMPS* et la sensibilité des cellules cancéreuses coliques murines Colon 26 résistantes au 5-FU. Dans les cellules parentales sensibles, elle augmente et diminue respectivement les niveaux de *TYMS* et *UMPS* sans affecter la sensibilité à la drogue. Ainsi, la présence de certains *N*-glycanes complexes pourrait participer à la résistance cellulaire en diminuant la conversion métabolique du 5-FU en métabolites actifs par l'OPRT (Hamaguchi et al., 2007) (**Figure 62**).

Le traitement au 5-FU induit l'augmentation de l'expression de **GCNT3 (N-AcetylGluCosaminylTransférase 3)** dans les cellules cancéreuses coliques SW-620 parentales mais pas dans les cellules résistantes au 5-FU. Or, *GCNT3* code pour l'enzyme d'extension des *O*-glycanes C2GnT-M dont la surexpression inhibe la progression tumorale et induit la mort cellulaire par apoptose.

Notre équipe a récemment montré que le *knock-down* de l'*OGT* augmente l'expression de **MAN2A1** (*α-MANnosidase class 2A member 1*) et de *GCNT3* dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 (Biwi et al., 2019). Par ce mécanisme, l'*OGT* pourrait réguler la sensibilité au 5-FU.

8.4.5.2. Impact de la O-GlcNAcylation sur la réparation des dommages à l'ADN

Hahne et collaborateurs (2013) ont mis en évidence la O-GlcNAcylation des protéines du système MMR (cf. 3.2.1 page 78), MSH2 et MSH6 du complexe MutSα et RPA1, dans les cellules HEK293 grâce à la stratégie TAS (Hahne et al., 2013). Ainsi, la O-GlcNAcylation pourrait réguler la reconnaissance et la réparation des dommages à l'ADN induits par le 5-FU (Figure 63).

8.4.5.3. Impact de la O-GlcNAcylation sur le phénotype CSC et la réponse au 5-FU

La O-GlcNAcylation peut participer à la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM), un processus qui générerait les CSC caractérisées par un plus faible taux de prolifération et une résistance aux chimiothérapies.

Ainsi, le *knock-down* de l'*OGT* et l'inhibition pharmacologique de l'*OGA* par le Thiamet-G réduit et augmente respectivement la population des CSC des cellules HT-29 (Guo et al., 2017). La glycosylation participerait notamment à la diminution de l'expression de la E-cadhérine membranaire en régulant la β-caténine, p120, Snail1, Snail2 ou encore ZEB1 (Gu et al., 2010; S.Y. Park et al., 2010; Zhu et al., 2012; Zhou et al., 2019) (cf. 8.4.4.2 page 209) (Figure 63). Dans les CSC coliques HT-29, les protéines O-GlcNAcylées et la marque épigénétique répressive H3K27me3 sont enrichies au niveau du promoteur *MYBL1*, un activateur transcriptionnel de *CDH1*. Le *knock-down* de l'*OGT* induit l'augmentation de l'expression de *MYBL1* et la réduction de la population de CSC *in vitro* et *in vivo* (Guo et al., 2017). D'autre part, Fuentes-García et collaborateurs (2019) ont récemment montré que l'inhibition pharmacologique de l'*OGT* avec l'*Ac₄-5S-GlcNAc* diminue la survie des cellules cancéreuses coliques primaires SW480 et métastatiques SW620. A l'inverse, l'inhibition de l'*OGT* ou le stress nutritionnel augmente l'apparition d'une sous-population présentant les marqueurs de CSC CD44⁺/CD133⁺ et un phénotype plus agressif. Or, plusieurs études ont montré que les cellules résistantes au 5-FU expriment les marqueurs de CSC CD133 et CD44 (cf. 3.1.2 page 75). Contrairement aux cellules SW620 CD44⁺/CD133⁺, les cellules SW480 CD44⁺/CD133⁺ possèdent un niveau plus élevé de O-GlcNAcylation globale des protéines par rapport aux cellules parentales. Ainsi, la O-GlcNAcylation régule le phénotype souche des cellules et pourrait impacter la réponse au 5-FU (Fuentes-García et al., 2019) (Figure 63).

Enfin, en régulant le cycle cellulaire et en ciblant notamment la cycline D1 (Masclef et al., 2019) (cf. 3.1.1 page 74), la O-GlcNAcylation pourrait également moduler la sensibilité au 5-FU (Figure 63).

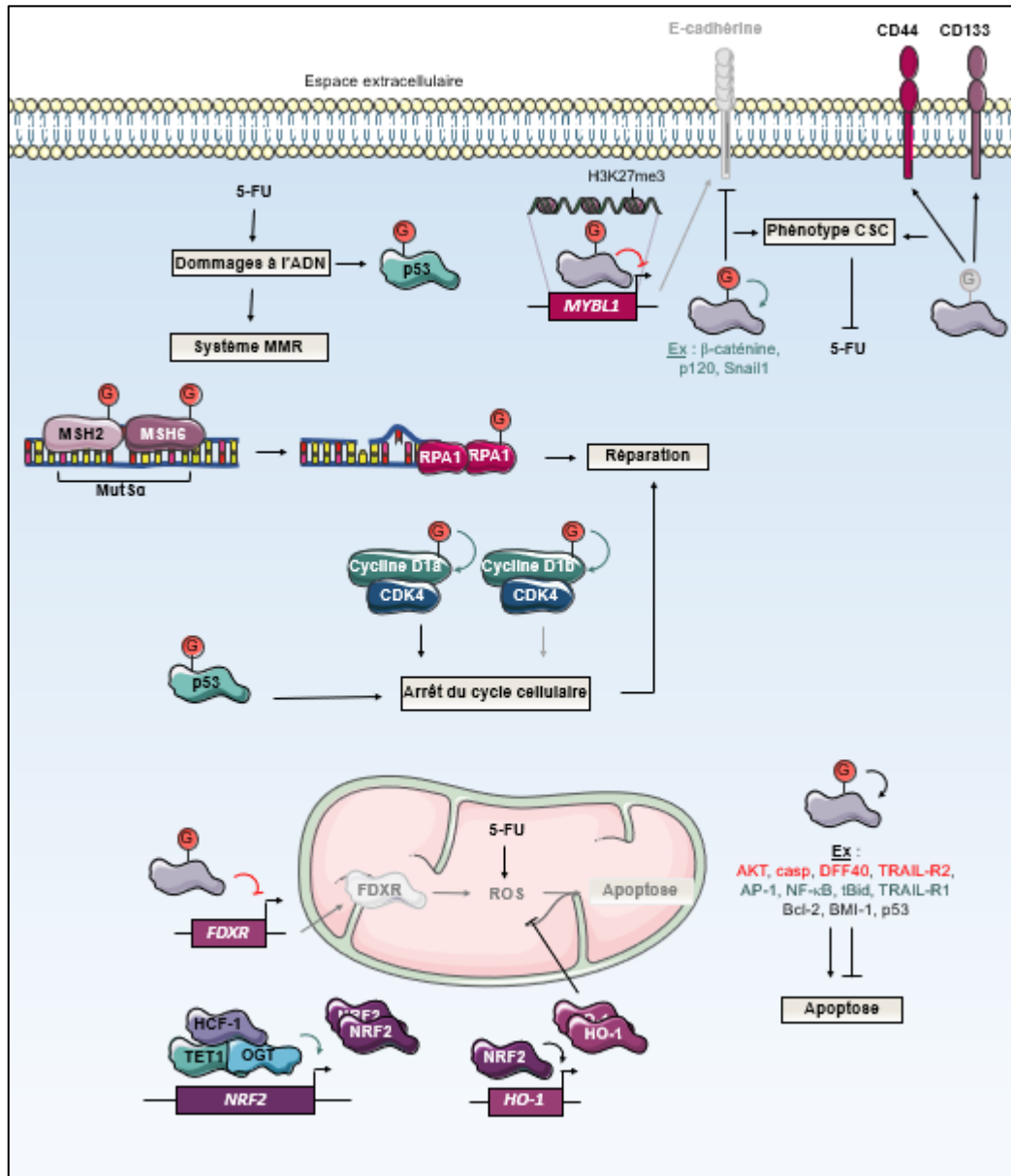


Figure 63 : Régulation de l'effet cytotoxique du 5-FU induit par la O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation aberrante pourrait être à l'origine de la résistance au 5-FU en induisant un défaut de reconnaissance et de réparation des dommages à l'ADN par le système MMR, un ralentissement du cycle cellulaire par le phénotype CSC, un arrêt du cycle cellulaire, une inhibition de la production de ROS et de l'apoptose. La O-GlcNAcylation peut avoir, à l'inverse, un effet pro-apoptotique.

5-FU : 5-FluoroUracile ; **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique ; **AP-1** : Activator Protein 1 ; **Bad** : Bcl-2 associated agonist of cell death ; **Bak** : Bcl-2 homologous antagonist killer ; **Bax** : Bcl-2-associated x ; **Bcl-2** : B-cell lymphoma 2 ; **BCL2L** : *BCL2-Like protein* ; **BMI-1** : B-cell-specific Moloney murine leukemia virus Insertion site 1 ; **casp** : caspase ; **CD** : Cluster de Différenciation ; **CDK4** : Cyclin-Dependent Kinase 4 ; **CSC** : Cellule Souche Cancéreuse ; **DFF40** : Deoxyribonucleic acid Fragmentation Factor 40 ; **E-cadhérine** : cadhérine Epithéliale ; **FASLG** : *FAS LiGand* ; **FDXR** : FerréDoXine Réductase ; **G** : N-acétylGlucosamine ; **H3K27me3** : triméthylation de la Lysine²⁷ de l'Histone 3 ; **HCF-1** : Host Cell Factor 1 ; **HO-1** : Heme Oxygénase 1 ; **kDa** : kiloDalton ; **MMR** : *MisMatch Repair* ; **MSH** : MutS Homolog ; **mut** : muté ; **MutSa** : MutatorSa ; **MYBL1** : V-Myb MYeloBlastosis viral oncogene homolog proto-oncogene Like 1 ; **NF-κB** : Nuclear Factor κB ; **NRF2** : Nuclear Respiratory Factor 2 ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétylGlucosaminylation ; **OGT** : β-O-N-acétylGlucosamineTransférase ; **p120** : protéine de 120 kDa ; **p53** : protéine de 53 kDa ; **ROS** : Reactive Oxygen Species ; **RPA1** : Replication Protein A1 ; **Ser** : Sérine ; **tBid** : truncated BH3 interacting-domain death agonist ; **TET1** : Ten-Eleven Translocation 1 ; **TRAIL-R** : Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand -Receptor.

8.4.5.4. Impact de la O-GlcNAcylation sur l'apoptose et la réponse au 5-FU

Comme précédemment décrit, la O-GlcNAcylation pourrait réguler l'apoptose induite par le 5-FU en modifiant différentes protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques (cf. 3.3 page 81 et 7.7 page 181) (Figure 52).

En comparaison aux cellules parentales, les cellules cancéreuses coliques **SNUC5 Résistantes au 5-FU (SNUC5/5-FUR)** subissent un stress oxydatif dû à l'accumulation de ROS intracellulaires induite par l'agent chimiothérapeutique et surexpriment TET1. L'OGT est également surexprimée dans cette lignée et interagit fortement avec TET1 qui la recrute au niveau du promoteur de NRF2, un facteur de transcription régulant l'expression des enzymes antioxydantes telles que **HO-1 (Heme Oxygénase 1)**. L'OGT O-GlcNAcyle alors HCF-1 du complexe SET1/COMPASS et induit l'activation transcriptionnelle de NRF2 puis de HO-1. Ainsi, les *knock-down* de NRF2 ou HO-1 augmentent la sensibilité au 5-FU des cellules SNUC5/5-FUR *in vitro* et *in vivo* (xénogreffe chez la souris). De manière intéressante, l'expression de NRF2 est également augmentée dans les cellules SNUC5 résistantes à l'oxaliplatine et des cellules cancéreuses ovariennes résistantes au CDDP (Kang et al., 2014; Kang et al., 2016). L'inhibition de l'OGT pourrait ainsi potentialiser l'activité cytotoxique des chimiothérapies en diminuant l'expression de NRF2 et de HO-1.

De manière intéressante, la surexpression de l'OGA dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y diminue l'expression de FDXR impliqué dans la mort cellulaire induite par le 5-FU (Tan et al., 2014) (cf. 3.2.2 page 64 et 3.3.3 page 82) (Figure 63).

8.4.5.5. Impact de la O-GlcNAcylation sur la voie du 5-FU

Plusieurs enzymes de la voie du 5-FU (cf. 2 page 54) et impliquées dans la réponse à la drogue (cf. 1 page 68) sont la cible directe de la O-GlcNAcylation (Figure 64).

La O-GlcNAcylation pourrait impacter l'anabolisme du 5-FU. Ainsi, le transporteur à influx SLC29A1 est O-GlcNAcylé sur la Ser⁶³ dans les érythrocytes humains (Wang et al., 2009). La TP est également O-GlcNAcylée et ce, uniquement dans les tumeurs mammaires comparées aux tissus sains adjacents (Champattanachai et al., 2013). La TK est O-GlcNAcylée dans le virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus, KSHV) et la surexpression de l'OGT inhibe la réplication et la propagation du virus dans les cellules HEK293 (Jochmann et al., 2013). La TK a été plus récemment identifiée comme étant O-GlcNAcylée dans les cellules HEK293 (Hahne et al., 2013). De plus, la délétion de l'OGT augmente la phosphorylation de la Ser¹² de TK1 dans les fibroblastes murins MEF (Zhong et al., 2015). Enfin, la cible principale du 5-FU, la TS, est également O-GlcNAcylée dans les cellules de drosophile (*Drosophila melanogaster*) S2 (Sprung et al., 2005) et dans les cellules humaines HEK293 (Hahne et al., 2013). La glycosylation sur la Ser³⁴⁷ déstabilise CK2 α , une kinase qui par phosphorylation de la Ser¹²⁴ inhibe la TS (Fraczyk et al., 2010). Plus indirectement, la O-GlcNAcylation régule également la cycline D et les facteurs de transcription Sp1 et E2F-1 qui modulent l'expression d'une myriade de gènes impliqués dans la synthèse des désoxynucléotides telles que DHFR, RR, TK et TS (Figure 64).

Le catabolisme du 5-FU pourrait également être impacté par la *O*-GlcNAcylation. En effet, l'expression du gène *DPYD* codant la DPD est augmentée dans les cellules de neuroblastome SH-SY5Y traitées avec le Thiamet-G, un inhibiteur pharmacologique de l'OGA (Tan et al., 2017). L'expression du transporteur à efflux *ABCB1* est aussi augmentée dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et SUM159 en condition hyperglycémique et la *O*-GlcNAcylation stabilise ses facteurs de transcription **GLIoma-associated oncogene family zinc finger 1 (GLI1)** et **GLI2** (Das et al., 2019) (**Figure 64**).

Néanmoins, aucune étude n'a étudié le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation de ces protéines de la voie du 5-FU ni dans la réponse du CCR à cette drogue.

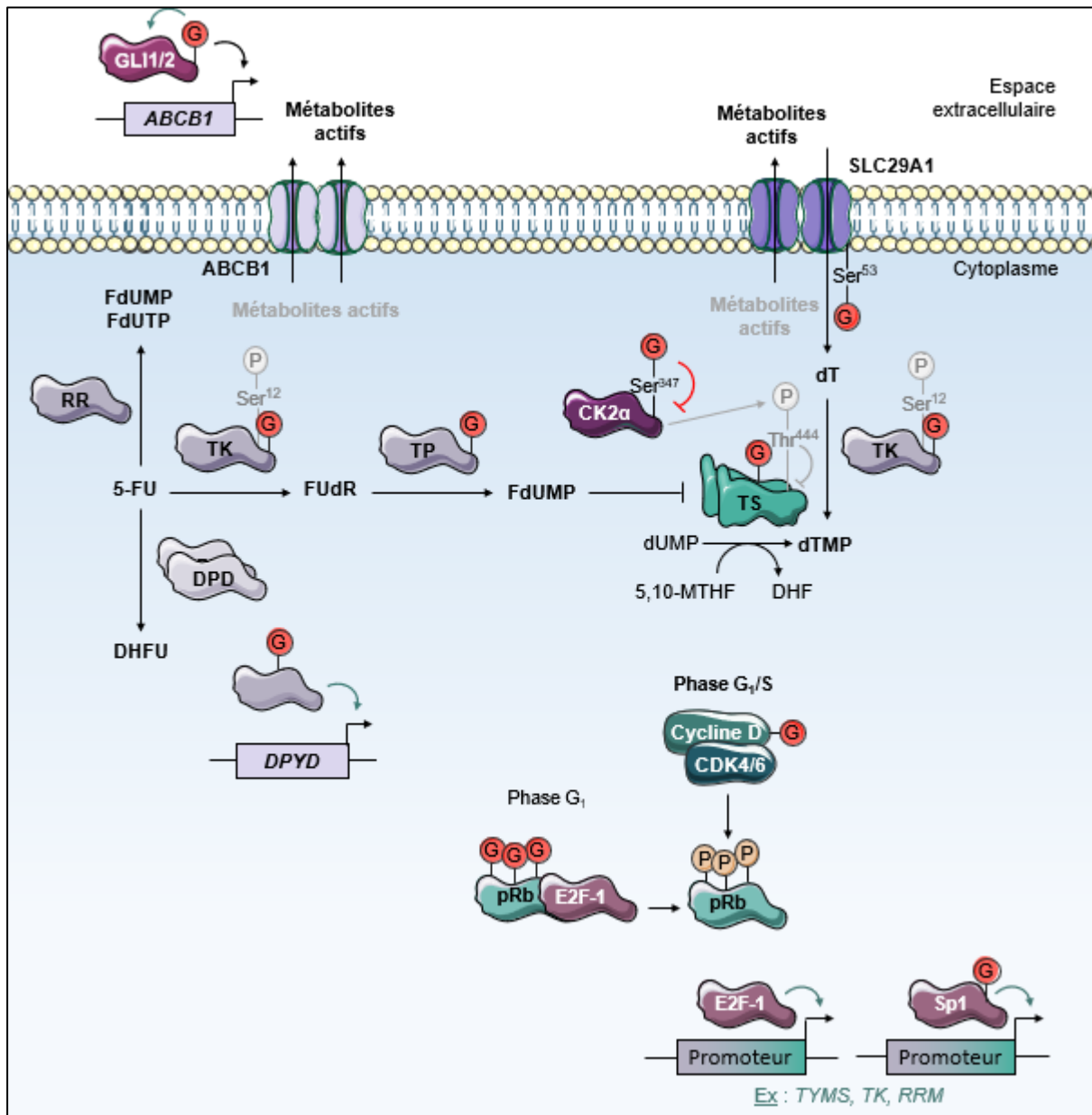


Figure 64 : Régulation de la voie du 5-FU par la O-GlcNAcylation. La O-GlcNAcylation aberrante pourrait réguler la réponse au 5-FU de manière directe en ciblant SLC29A1, la TK, la TP et la TS ou de manière indirecte en inhibant CK2 α , en augmentant l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription GLI1/2, E2F-1 et Sp1 et l'expression de la TS.

5,10-MTHF : 5,10-MéthylèneTrétraHydroFolate ; **5-FU** : 5-FluoroUracile ; **ABCB1** : Adenosine TriPhosphate-Binding Cassette B1 ; **CDK** : Cyclin-Dependent Kinase ; **CK2 α** : Casein Kinase 2 α ; **DHF** : DiHydroFolate ; **DHFU** : 5,6-DiHydro-5-FluoroUracile ; **DPD** : DihydroPyrimidine Déshydrogénase ; **DPYD** : DihydroPYrimidine Déshydrogénase ; **dT** : Thymidine ; **dTMP** : désoxyThymidine MonoPhosphate ; **dUMP** : désoxyUridine MonoPhosphate ; **FdUMP** : 5-FluorodUMP ; **FdUTP** : 5-FluorodésoxyUridine TriPhosphate ; **FUdR** : FluoroUracile désoxyRibose ; **G₁** : Gap 1 phase ; **G** : N-acétylGlucosamine ; **GLI** : GLIoma-associated oncogene family zinc finger ; **O-GlcNAcylation** : O-N-AcétylGlucosaminylation ; **P** : Phosphate ; **pRb** : protéine du RétinoBlastome ; **RR** : Ribonucléotide Réductase ; **RRM** : Ribonucléoside-diphosphate Réductase ; **S** : Synthesis phase ; **Ser** : Sérine ; **SLC29A1** : SoLute Carrier 29A1 ; **Sp1** : Specificity protein 1 ; **Thr** : Thréonine ; **TK** : Thymidine Kinase ; **TP** : Thymidine Phosphorylase ; **TYMS** : THYMidylate Synthase.

II. PROJET DE THESE

Partie I :

Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur
la Thymidylate Synthase et
la réponse du cancer colorectal
au 5-fluorouracile

Partie I

Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la Thymidylate Synthase et la réponse du cancer colorectal au 5-fluorouracile

1. Contexte de l'étude

Le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la cancérogenèse et la progression tumorale fait l'objet d'une recherche internationale très dynamique. A l'inverse, le rôle de cette glycosylation dans la réponse aux thérapies anti-cancéreuses est très peu investigué. Néanmoins, il a été récemment montré que l'hyper-*O*-GlcNAcylation des protéines régule la réponse du cancer à certaines drogues anti-cancéreuses telles que le tamoxifène, la thérapie TRAIL, le cisplatine, le bortézomib ou encore le 5-FU ([cf. 8.4.4.3 page 211](#)). Le 5-FU étant la chimiothérapie de référence du CCR et la TS sa cible principale, nous nous sommes intéressés à l'étude du « *cross-talk* » entre *O*-GlcNAcylation et réponse au 5-FU dans ce cancer. Notre hypothèse de travail a été qu'en ciblant la TS, la *O*-GlcNAcylation pouvait impacter la réponse du CCR à cette drogue.

Les objectifs de cette étude étaient de :

1. **Etudier la corrélation entre *O*-GlcNAcylation, TS et réponse au 5-FU *in vivo***
2. **Déterminer l'effet du 5-FU sur l'expression de l'OGT et le niveau de *O*-GlcNAcylation globale *in vitro***
3. **Déterminer l'impact de la *O*-GlcNAcylation sur les propriétés de la TS et la réponse au 5-FU *in vitro***

Ce travail a fait l'objet d'un article original soumis pour publication et intégré en [page 253](#) :

[Very N, Hardivillé S, Decourcelle A, Thévenet J, Djouina M, Page A, Vergoten G, Schulz C, Kerr-Conte J, Lefebvre T, Dehennaut V, El Yazidi-Belkoura I. *O*-GlcNAcylation of Thymidylate Synthase: a 5-FU sensitization mechanism in colorectal cancer \(2021\). *Molecular Cancer*.](#)

Les résultats principaux de l'étude sont décrits brièvement dans le paragraphe suivant.

2. Résultats

2.1. La O-GlcNAcylation sensibilise à l'effet cytotoxique du 5-FU *in vivo*

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet *in vivo* de la O-GlcNAcylation sur la progression du CCR et sa réponse au 5-FU dans un modèle murin de CCR humain. Des tumeurs colorectales ont été induites ou non chez des souris C57BL/6 par injection du carcinogène **AOM (AzOxyMéthane)** et administration de l'agent inflammatoire DSS (**Dextran Sulfate de Sodium**). Après apparition des tumeurs, les souris ont été traitées ou non par diffusion continue de 5-FU seul et/ou combiné à l'inhibiteur pharmacologique de l'OGA, Thiamet-G (**Fig. S1A**). La dose de 5-FU utilisée (12,5 mg/kg/j) correspond à une dose standard administrée en continue par intra-veineuse chez l'homme (370-2300 mg/m²/j) ([Remick et al., 1990](#)). Par **WB (Western Blot)** et analyse IHC des tissus colorectaux non traités au 5-FU/Thiamet G, nous montrons que, par rapport aux tissus sains, les tumeurs colorectales présentent une hyper-O-GlcNAcylation des protéines qui est accompagnée d'une augmentation du niveau de TS (**Fig. S1B et S1C**).

Dans les tumeurs colorectales, nous montrons que l'élévation de la O-GlcNAcylation par le Thiamet-G coïncide également avec une augmentation du niveau de TS (**Fig. 1A et 1B**). Le 5-FU, quant à lui, diminue la O-GlcNAcylation globale (**Fig. 1A et 1B**). Enfin, nous observons que les niveaux de O-GlcNAcylation et de TS sont plus élevés dans la condition de co-traitement par rapport à la condition de traitement avec le 5-FU seul (**Fig. 1A et 1B**). Les effets biologiques de ces traitements sur la progression tumorale ont été examinés par endoscopie des côlons-rectums. Le Thiamet-G ainsi que le 5-FU seuls diminuent la progression tumorale en termes de nombre et de grade des tumeurs et leur co-administration a un effet synergique (**Fig. 1C à 1F**). Enfin, nous avons analysé l'expression des gènes *TYMS* et *OGT* à partir de données de puces à ADN (GSE104645) de patients avec un CCR métastatique répondeurs ou non à une chimiothérapie à base de 5-FU (**Fig. S2**). Alors que l'expression de *TYMS* ne corrèle pas avec la réponse à la thérapie dans cette cohorte d'une cinquantaine de patients, l'expression de *OGT* est, quant à elle, significativement plus élevée dans les tumeurs de patients répondeurs (**Fig. 1G**).

Ensemble, ces données *in vivo* révèlent un « cross-talk » entre O-GlcNAcylation et voie du 5-FU et suggèrent que la O-GlcNAcylation sensibilise à l'effet cytotoxique du 5-FU dans le CCR.

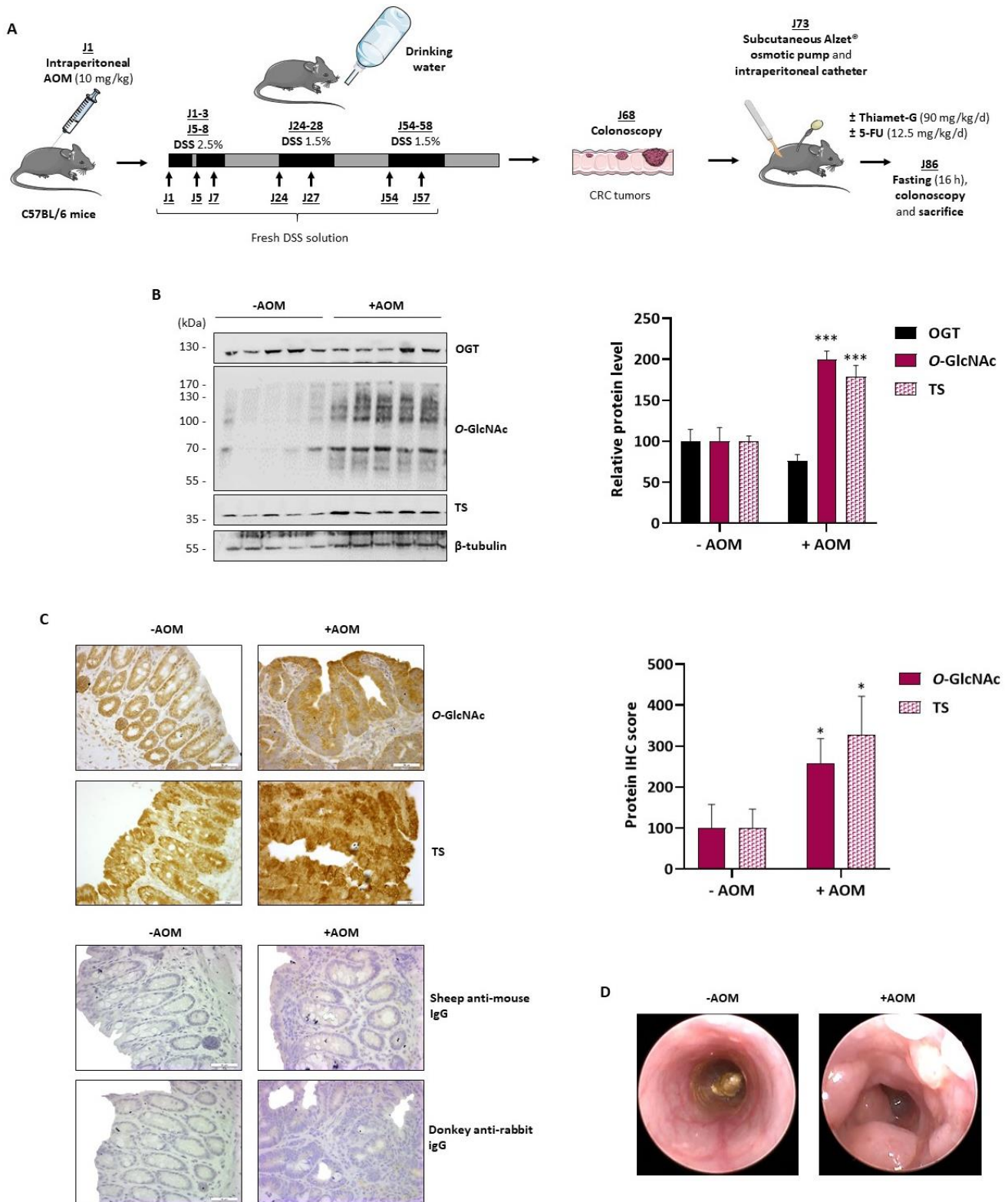


Figure S1. La carcinogénèse induite par l'AOM/DSS augmente les niveaux de O-GlcNAcylation et de TS dans le CCR.

(A-D) Les tumeurs colorectales murines ont été induites par AOM/DSS (+ AOM, 10 souris par groupe) puis traitées en continu ou non avec du Thiamet G (90 mg/kg/j) et/ou du 5-FU (12,5 mg/kg/j) pendant 13 j. Cinq souris contrôles (-AOM) n'ont pas été traitées à l'AOM/DSS mais ont été traitées avec le véhicule seul. Les souris ont été mises à jeun pendant 16 h puis une coloscopie a été réalisée avant le sacrifice. (A) Représentation schématique du protocole d'induction du CCR et des traitements pharmacologiques. (B-C) Les analyses ont été effectuées sur les souris -AOM (5 souris) et les souris +AOM (6 souris) traitées avec le véhicule seul. Les analyses statistiques ont été réalisées par un t-test Student. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. (B) Les protéines d'intérêt sont détectées par WB puis quantifiées par densitométrie ($n \geq 5$). (C) IHC des protéines d'intérêt sur coupes de tissus colorectaux et quantification du score IHC dans les cellules épithéliales ($n = 3$). (D) Images endoscopiques des côlons.

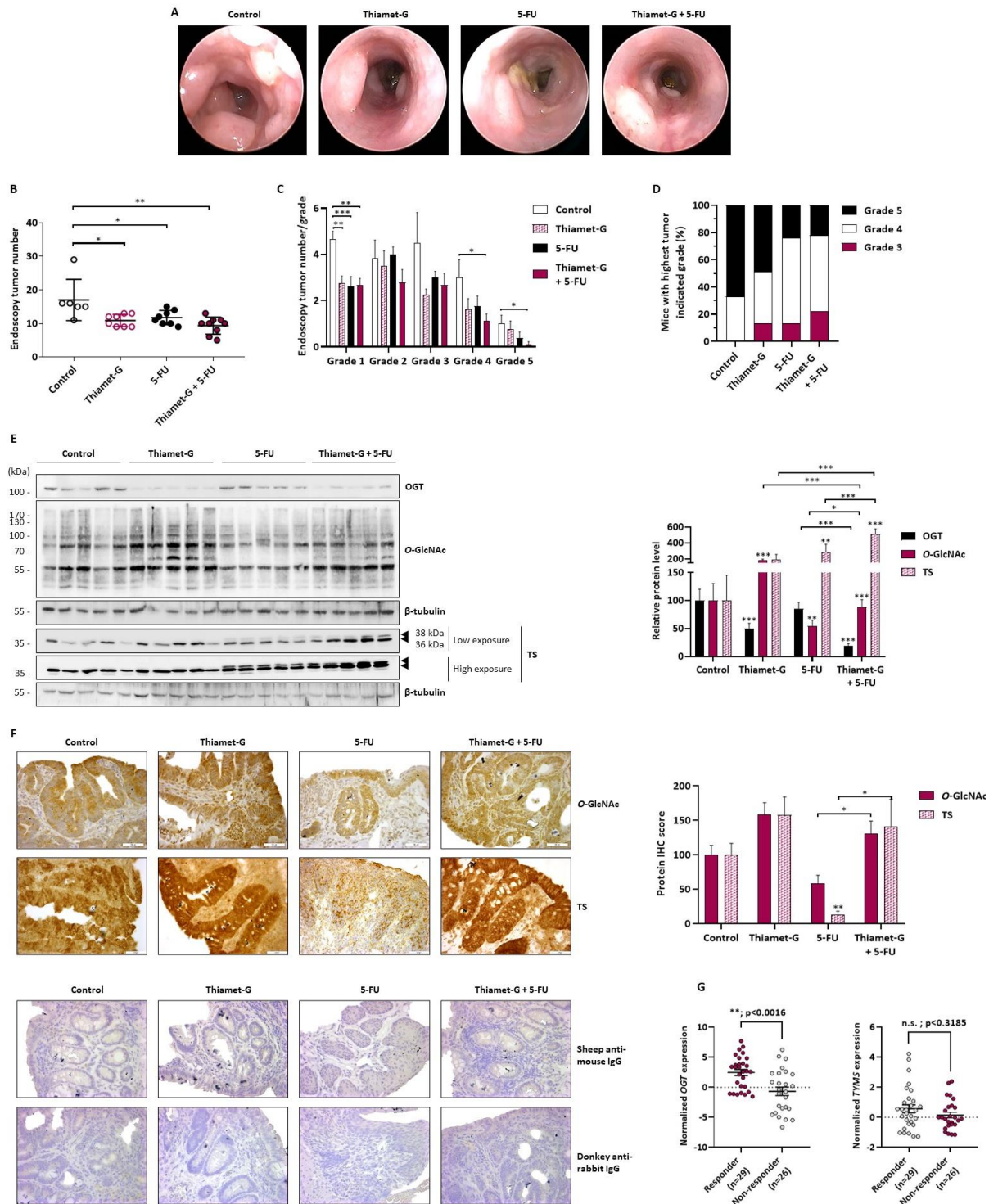


Figure 1. La O-GlcNAcylation sensibilise le CCR au 5-FU *in vivo*.

(A-F) 10 souris C57BL/6 par groupe de traitement ont été incluses dans l'expérience. Les tumeurs colorectales murines ont été induites par AOM/DSS puis traitées en continu ou non avec du Thiamet G (90 mg/kg/j) et/ou du 5-FU (12,5 mg/kg/j) pendant 13 j. Une coloscopie a été réalisée avant le sacrifice. En raison d'une certaine mortalité, le nombre de souris analysées n'est pas équivalent entre les différents groupes de souris (6 pour la condition contrôle, 8 pour les conditions Thiamet-G et le 5-FU seuls et 9 pour la condition de co-traitement Thiamet-G et 5-FU). (A-E) Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (A) Images endoscopiques des tumeurs colorectales induites. (B) Quantification par endoscopie du nombre de tumeurs ($n \geq 6$). (C) Quantification par endoscopie des tumeurs par grade ($n \geq 6$). (D) Pourcentage de souris ayant pour plus haut grade le grade indiqué. (E) Les protéines d'intérêt sont détectées par WB puis quantifiées par densitométrie ($n \geq 6$). (F) IHC des protéines d'intérêt sur coupes de tumeurs colorectales et quantification du score IHC dans les cellules épithéliales ($n \geq 3$). (G) Comparaison des niveaux d'expression de l'OGT et de TYMS à partir de données transcriptomiques de patients métastatiques CCR traités par chimiothérapie à base de 5-FU répondeurs ou non au traitement (données de puces à ADN GSE104645, $n=55$). L'analyse statistique a été réalisée par un Mann-Whitney test. ** $p < 0,01$.

		Responder n=29	No responder n=26
Age	Median	63.9	63.4
	Range	51-77	32-83
Gender	Male	69% (n=20)	62% (n=16)
	Female	31% (n=9)	38% (n=10)
Stage at diagnosis	I	3% (n=1)	0% (n=0)
	II	7% (n=2)	8% (n=2)
	III	24% (n=7)	35% (n=9)
	IV	66% (n=19)	58% (n=15)
Primary site	Colon	52% (n=15)	46% (n=12)
	Rectum	48% (n=14)	54% (n=14)
Adjuvant chemotherapy	Yes	31% (n=9)	31% (n=8)
	No	69% (n=20)	69% (n=18)
1st-line chemotherapy regimens	FOLFOX	86% (n=25)	81% (n=21)
	FOLFIRI	14% (n=4)	19% (n=5)
Best response of 1st-line chemotherapy	Progressive disease	-	23% (n=6)
	Stable disease	-	77% (n=20)
	Partial response	97% (n=28)	
	Complete response	3% (n=1)	

Figure S2. Caractéristiques cliniques de la cohorte de patients CCR métastatiques GSE104645.

L'âge, le sexe, le stade au diagnostic, le site de la tumeur primaire, la chimiothérapie adjuvante, le régime chimiothérapeutique de 1^{ère} ligne et la meilleure réponse à la chimiothérapie de 1^{ère} ligne sont indiqués.

2.2. Le 5-FU diminue la O-GlcNAcylation cellulaire *in vitro*

Dans le but de déchiffrer la relation entre O-GlcNAcylation, TS et réponse du CCR au 5-FU, nous avons mené une étude comparative *in vitro* de cellules coliques fœtales non cancéreuses CCD 841 CoN et cancéreuses issues d'un adénocarcinome primaire HT-29. Nous avons tout d'abord montré par WB que les cellules HT29 présentent des niveaux plus importants d'OGT, de O-GlcNAcylation globale et de TS comparées aux cellules CCD 841 CoN (**Fig. 2A**). Nous avons ensuite établi la concentration optimale de 5-FU à utiliser. Nous montrons par un test MTS que les cellules HT-29 hautement prolifératives sont plus sensibles à la cytotoxicité du 5-FU (IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) de 9,84 μ M) que les cellules CCD 841 CoN (21,79 μ M) (**Fig. 2B et S3A**). Pour la suite de l'étude, nous avons décidé de traiter les cellules avec la concentration de 6 μ M proche de l' IC_{50} des cellules HT-29 et en accord avec la pharmacocinétique du 5-FU chez l'homme ([van Groeningen et al., 1988](#); [Remick et al., 1990](#)). A cette dose, le 5-FU induit un arrêt significatif des cellules HT-29 en phase S à partir de 24 h et leur mort par apoptose à partir de 72 h (**Fig. S3B**).

Dans un second temps, nous avons étudié par WB l'effet cinétique du 5-FU sur les niveaux d'OGT et de O-GlcNAcylation globale. Dès 24 h, lorsqu'il est incorporé dans la cellule, converti en FdUMP et complexé à la TS (**Fig. S3C**), le 5-FU induit une diminution progressive du niveau de O-GlcNAcylation des protéines dans les cellules CCD 841 CoN et HT-29 (**Fig. 2C**). De manière intéressante, la réduction du niveau de O-GlcNAcylation est corrélée à une diminution de l'OGT aux niveaux protéique et transcriptionnel (**Fig. 2C et 2D**).

Ensemble, ces résultats indiquent que le 5-FU affecte la O-GlcNAcylation des protéines en diminuant l'expression de l'OGT dans les cellules coliques non-cancéreuses et cancéreuses.

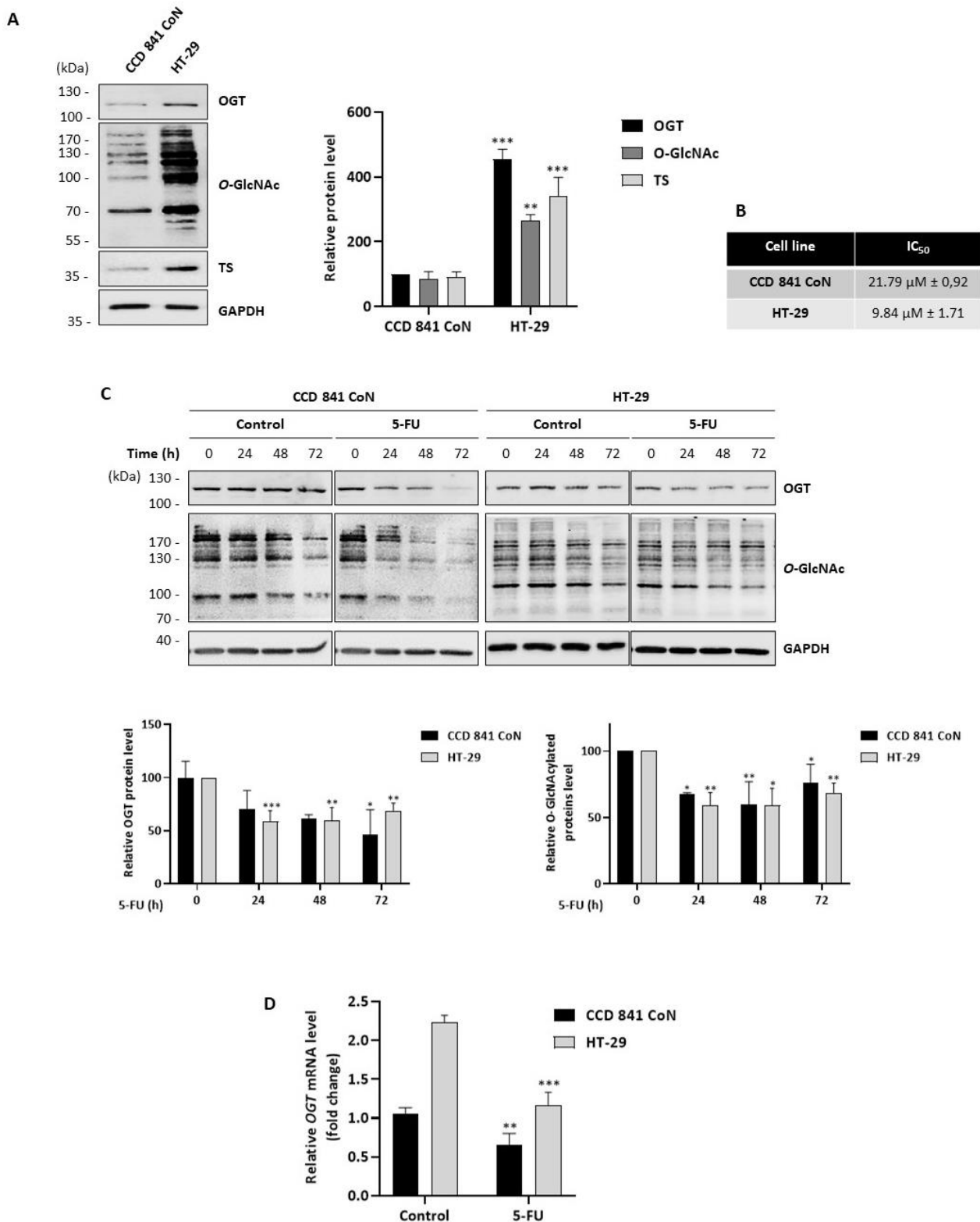


Figure 2. Le 5-FU diminue la O-GlcNAcylation globale dans les cellules coliques non cancéreuses et cancéreuses.

Les expériences ont été menées en milieu HG (High Glc, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 25 mM). (A) Les cellules ont été cultivées pendant 48 h puis les protéines d'intérêt sont détectées par WB et quantifiées par densitométrie. L'analyse statistique a été réalisée par un t-test Student (n=3). **p<0,01 ; ***p<0,001. (B) Les cellules ont été traitées avec des doses croissantes de 5-FU (de 0 à 20 μ M) pendant 48 h puis les valeurs d'IC₅₀ déterminées par test MTS. (C) Les cellules ont été traitées ou non avec du 5-FU (6 μ M) pendant 0, 24 h, 48 h ou 72 h puis les protéines d'intérêt sont détectées par WB et quantifiées par densitométrie. L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA (n=3). *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001. (D) Les cellules ont été traitées ou non avec du 5-FU (6 μ M) pendant 72 h puis les transcrits *OGT* analysés par qRT-PCR et quantifiés par un rapport à *HPRT*. L'analyse statistique a été réalisée par un t-test Student (n=3). **p<0,01 ; ***p<0,001.

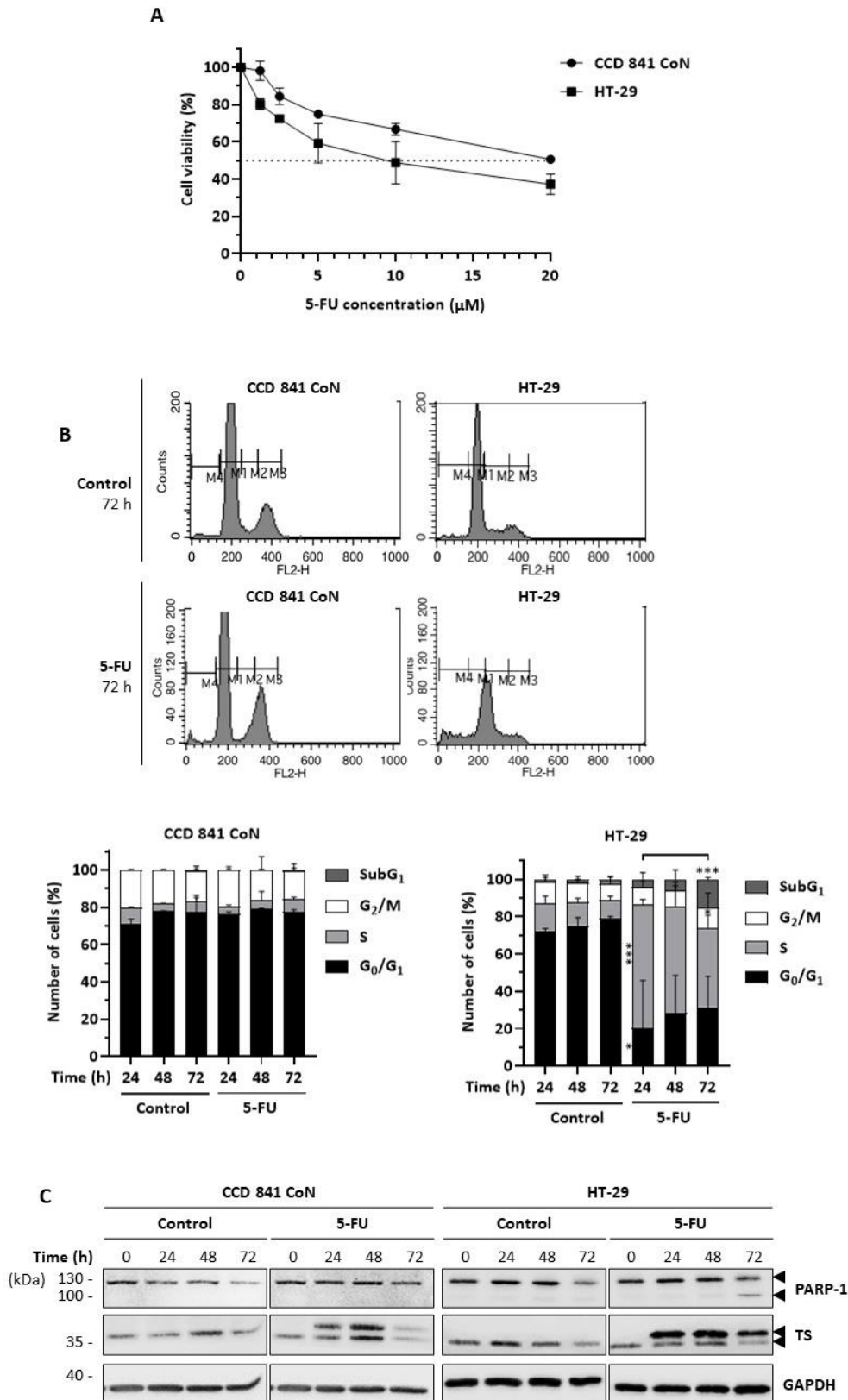


Figure S3. Le 5-FU inhibe la croissance des cellules cancéreuses par blocage du cycle cellulaire et induction de l'apoptose.

Les expériences ont été menées en milieu HG. (A) Les cellules ont été traitées avec des doses croissantes de 5-FU de 0 à 20 µM pendant 48 h puis le taux de survie au 5-FU est mesuré par test MTS (n=3). (B-C) Les cellules ont été traitées ou non avec du 5-FU (6 µM) pendant 0, 24 h, 48 h ou 72 h. (B) La distribution des cellules dans le cycle cellulaire est analysée et quantifiée par cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium. L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA (n=2). ***p<0,001. (C) Les protéines TS et PARP-1 sont détectées par WB afin de vérifier la formation du complexe TS/5,10-MTHF/FdUMP et l'induction de l'apoptose respectivement.

2.3. La O-GlcNAcylation impacte la TS et la réponse au 5-FU

2.3.1. L'invalidation de l'OGT diminue la sensibilité des cellules cancéreuses au 5-FU par diminution du taux de TS

Réciproquement, nous avons étudié l'impact de la O-GlcNAcylation sur la sensibilité à la cytotoxicité du 5-FU par analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux et du clivage de **PARP-1** (Poly(Adénosine Diphosphate-Ribose) Polymérase 1) en WB. Le 5-FU n'induit pas l'apoptose des cellules CCD 841 CoN, et la diminution des niveaux d'OGT et de O-GlcNAcylation globale par des siRNA dirigés contre l'OGT (*siOGT*) n'affecte pas la répartition de ces cellules dans le cycle. En revanche, dans les cellules HT-29, le *siOGT* augmente l'arrêt en phase S et diminue l'apoptose induits par le 5-FU (**Fig. 3A et 3C**). De manière intéressante, le *knock-down* de l'OGT réduit également le taux et l'activité enzymatique totale de la TS dans les cellules CCD 841 CoN non traitées au 5-FU et dans les cellules HT-29 indépendamment du traitement au 5-FU (**Fig. 3A et 3B**). L'analyse par **qRT-PCR** (quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) des transcrits de la TS dans les cellules CCD 841 CoN et HT-29 traitées ou non au 5-FU montre que la O-GlcNAcylation ne régule pas la TS de manière indirecte au niveau transcriptionnel (**Fig. 3D**). L'invalidation de l'OGT n'a pas non plus d'effet sur la localisation subcellulaire ni sur l'activité enzymatique spécifique de la TS dans les deux lignées cellulaires (**Fig. S4A et S4B**). Enfin, la surexpression exogène du gène *TYMS* diminue la sensibilité au 5-FU des cellules HT-29. La diminution de la sensibilité au 5-FU induite par le *siOGT* est restaurée par surexpression de *TYMS* (**Fig. 3E et 3F**).

Ensemble, ces résultats montrent que l'invalidation de l'OGT rend moins sensibles les cellules cancéreuses coliques au 5-FU par diminution du taux de TS et suggèrent que cette dernière est directement régulée par O-GlcNAcylation.

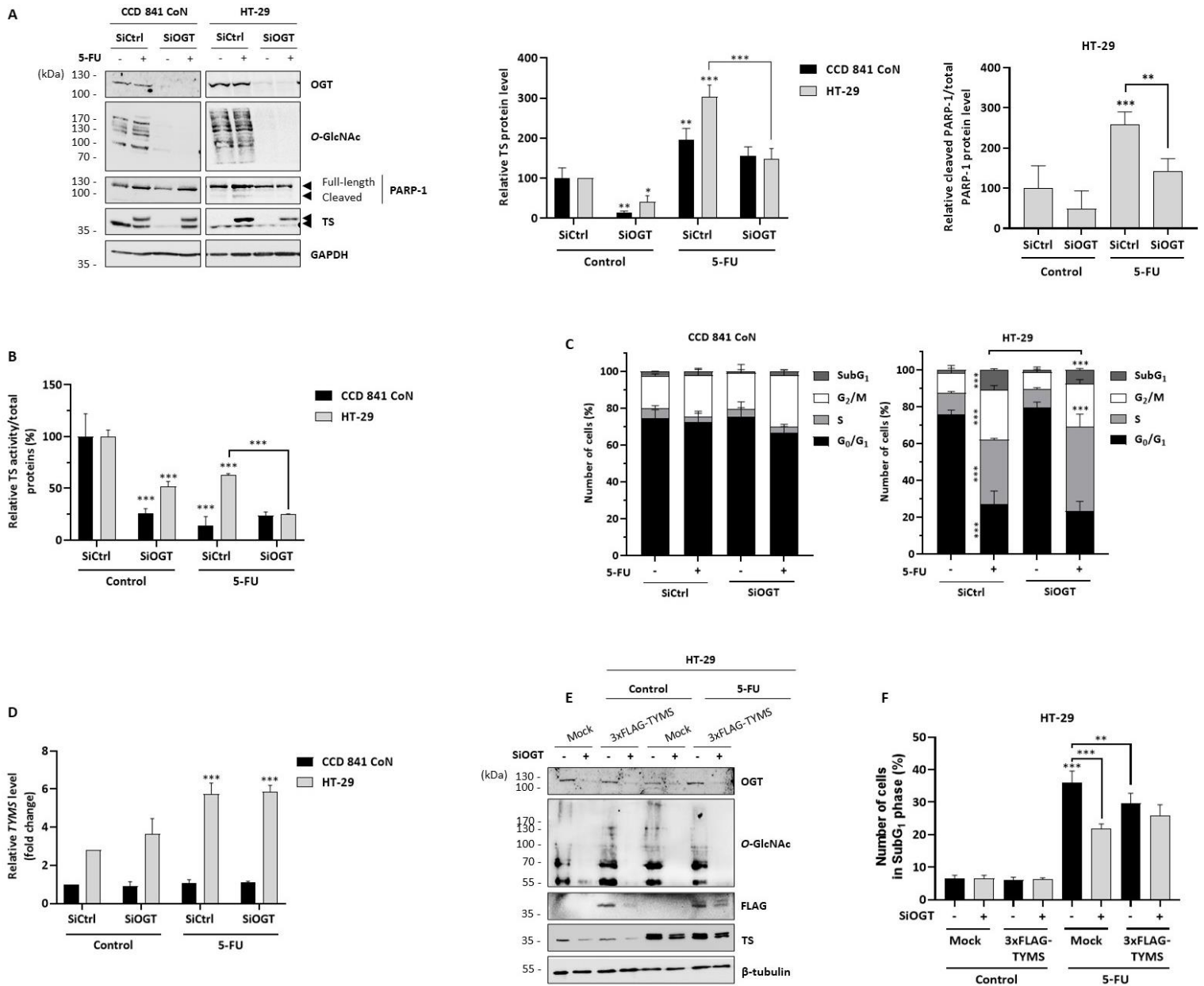


Figure 3. Le knock-down de l'OGT diminue la sensibilité des cellules cancéreuses au 5-FU par diminution du niveau de TS.

Les transfections ont été réalisées avec 10 nM de siRNA et le traitement au 5-FU à une concentration de 6 μM dans du milieu HG. (A-C) Les cellules ont été transfectées avec des siRNA contrôles ou dirigés contre l'OGT (SiCtrl ou siOGT) puis, après 24 h, co-traitées ou non avec du 5-FU pendant 72 h. Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001. (A) Les protéines d'intérêt sont détectées par WB et quantifiées par densitométrie (n=3). (B) L'activité enzymatique totale de la TS est mesurée dans les lysats cellulaires (n=3). (C) La distribution des cellules dans le cycle cellulaire est analysée et quantifiée par cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium (n=4). (D) Les transcrits *TYMS* ont été analysés par qRT-PCR et quantifiés par un rapport à *HPRT* (n=3). (E-F) Les cellules ont été transfectées avec des SiCtrl ou SiOGT, co-transfectées après 24h avec un vecteur pcDNA3.1 vide ou exprimant la TS-FLAG (pcDNA3.1-3xFLAG-TYMS, 1 μg) et traitées ou non avec du 5-FU pendant 72 h. (E) Les protéines d'intérêt sont détectées par WB. (F) Le pourcentage de cellules en phase SubG₁ est déterminé par cytométrie en flux après incorporation d'iodure de propidium (n=4).

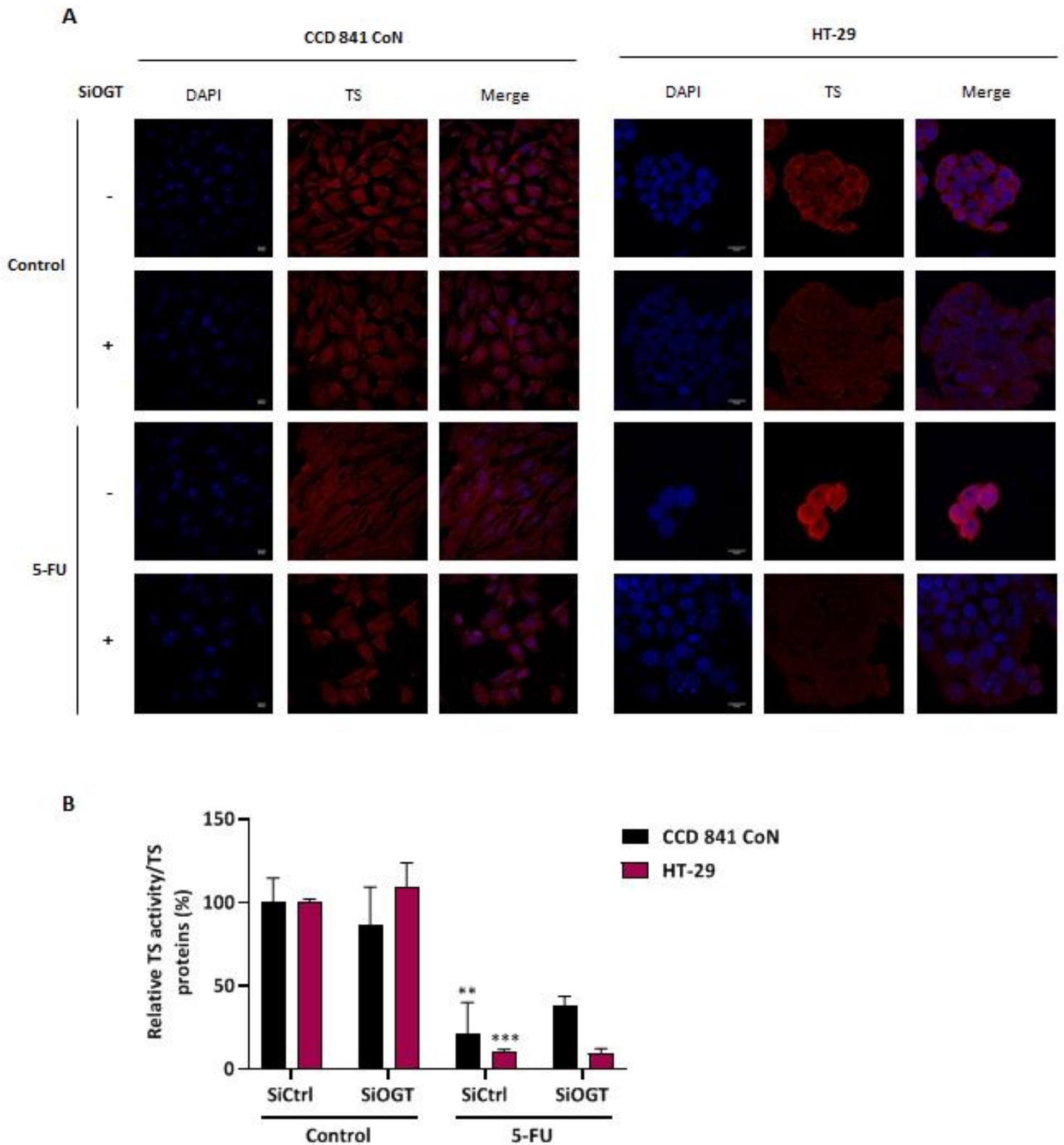


Figure S4. Effet de la *O*-GlcNAcylation sur la localisation subcellulaire et l'activité enzymatique de la TS.

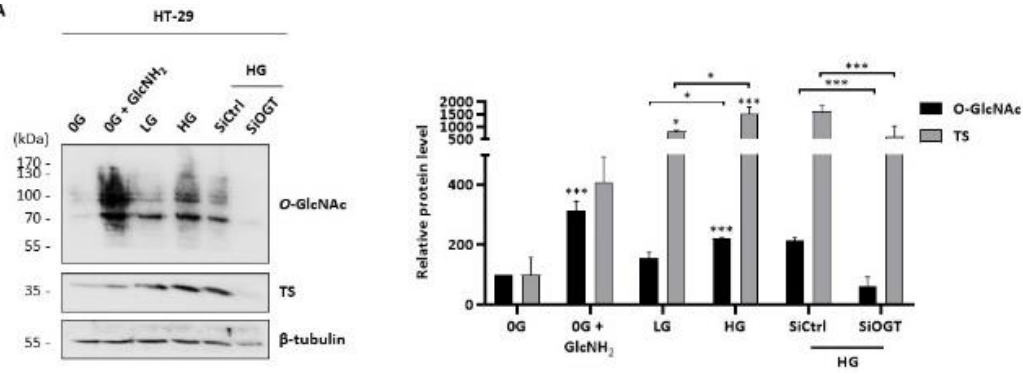
Les cellules ont été transfectées avec des siRNA contrôles ou dirigés contre l'*OGT* (SiCtrl ou SiOGT, 10 nM) puis, après 24 h, co-traitées ou non avec du 5-FU (6 μ M) pendant 72 h dans du milieu HG. **(A)** La localisation et le niveau de la protéine TS sont suivis par immunocytochimie de la TS. Les noyaux sont marqués au DAPI. **(B)** L'activité enzymatique spécifique de la TS est mesurée dans les lysats cellulaires. L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA (n=3). **p<0,01 ; ***p<0,001.

2.3.2. La TS est modifiée et régulée par O-GlcNAcylation

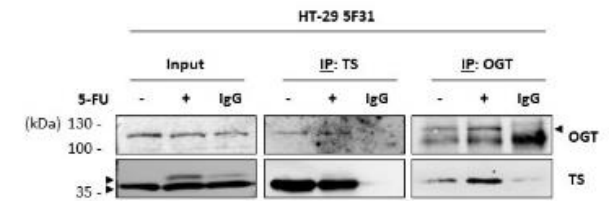
Les résultats précédents nous ont conduits à analyser la régulation de la TS par la O-GlcNAcylation. Nous avons, soit modifié la composition et la teneur en sucres du milieu de culture en incubant les cellules en présence de GlcNH₂ et de différentes concentrations en Glc, soit invalidé l'OGT par *siRNA*, puis analysé les niveaux de O-GlcNAcylation et de TS par WB. Nous montrons que les précurseurs de l'UDP-GlcNAc, Glc et GlcNH₂, augmentent la O-GlcNAcylation globale et le niveau de TS dans les cellules HT-29. L'invalidation de l'OGT par *siRNA* induit une baisse drastique du taux de TS précisant que la O-GlcNAcylation est à l'origine de la régulation de la TS dans ces cellules et suggérant que la TS est O-GlcNAcylée (**Fig. 4A**). La O-GlcNAcylation de la TS a été analysée par différentes stratégies. Dans les cellules HT-29 5F31 exprimant naturellement un taux élevé de TS, nous avons montré par **co-IP (co-ImmunoPrécipitations)** réverses de la TS et de l'OGT que ces deux protéines interagissent physiquement entre elles indépendamment du traitement au 5-FU (**Fig. 4B**). Par IP de la TS, nous montrons qu'elle est O-GlcNAcylée en présence ou non de 5-FU dans les cellules HT-29. En revanche, malgré un effet drastique sur le niveau protéique total de TS, cette MPT observée sur la TS immunoprécipitée n'est que faiblement diminuée après *knock-down* de l'OGT (**Fig. 4C**). L'utilisation d'une stratégie d'analyse de la stœchiométrie de la O-GlcNAcylation par chimie-click couplée au marquage PEG montre, en WB, que la O-GlcNAcylation de la TS est plus abondante et hétérogène dans les cellules cancéreuses HT-29 que dans les cellules non cancéreuses CCD 841 CoN. La TS serait en isoforme mono-O-GlcNAcylée dans les cellules CCD 841 CoN et, mono- et tétra-O-GlcNAcylées dans les cellules HT-29. De manière intéressante, après traitement au 5-FU, l'OGT glycosyle préférentiellement l'isoforme de TS majoritairement retrouvée dans ces cellules, à savoir la TS complexée au FdUMP (**Fig. 4D**). Enfin, la spectrométrie de masse en mode HCD (**H**igher-energy **C**ollisional **D**issociation)-MS/MS a permis d'identifier deux sites O-GlcNAcylés sur la TS, la Thr²⁵¹ et la Thr³⁰⁶ à partir de lysats protéiques de cellules HT-29 et HT-29 5F31 (**Fig. 4E**). Nous avons également identifié une phosphorylation sur le résidu Thr³⁰⁶ (**Fig. S5**).

Ces résultats montrent que la TS est O-GlcNAcylée et qu'elle l'est différemment entre cellules cancéreuses ou non.

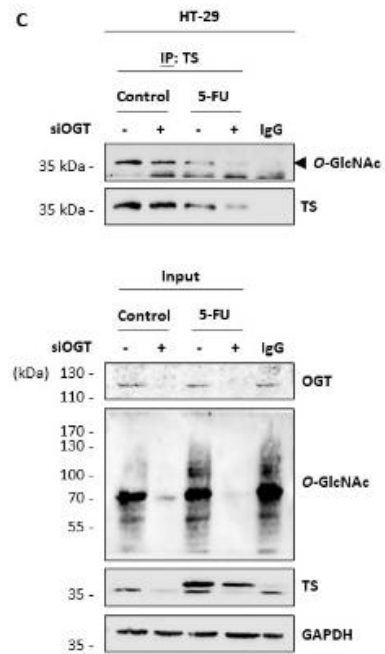
A



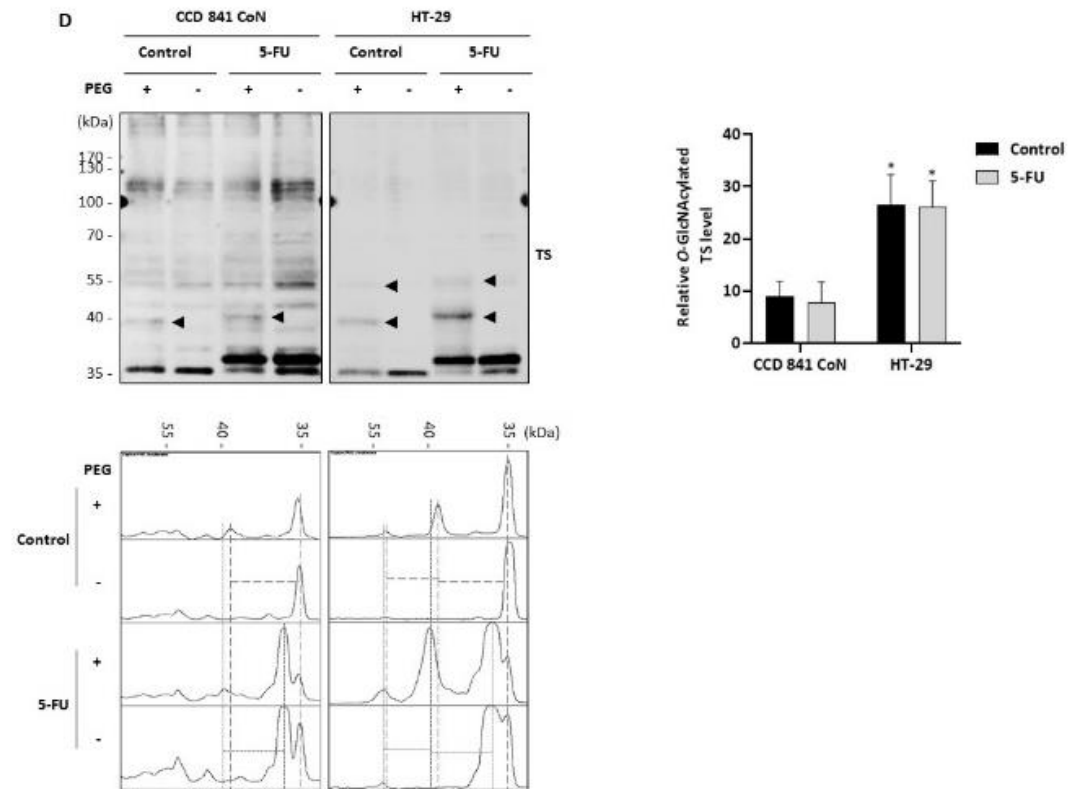
B



C



D



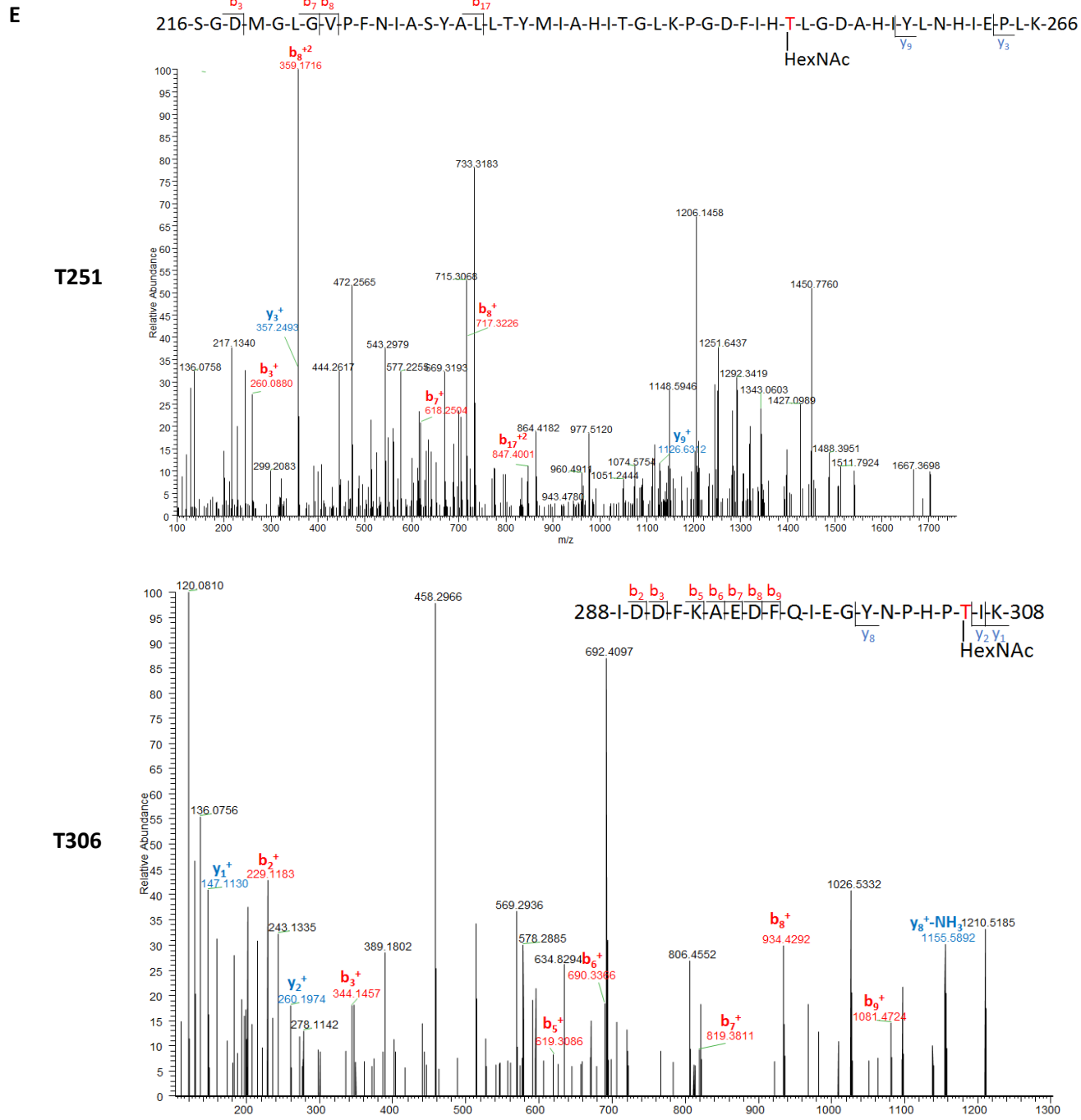


Figure 4. L'OGT interagit avec et O-GlcNAcyle la TS.

(A-E) Les transfections ont été réalisées avec 10 nM de siRNA et le traitement de 5-FU avec une concentration de 6 μ M dans du milieu HG. (A) L'impact du Glc, de la GlcNH₂ et de la O-GlcNAcylation globale sur le niveau de TS a été analysé en présence de différentes concentrations de Glc, de GlcNH₂ et de siRNA dirigés contre l'OGT (siOGT). Soit les cellules ont été cultivées dans du milieu LG (Low Glc, DMEM 5 mM) pendant 60 h puis dans du milieu WG (Without Glucose, DMEM) supplémenté ou non avec de la GlcNH₂ (5 mM) ou en milieu LG ou en milieu HG pendant 12 h. Soit les cellules ont été transfectées dans du milieu LG avec des SiCtrl ou SiOGT puis cultivées, après 24 h, dans du milieu HG pendant 48 h. Les protéines d'intérêt sont détectées par WB et quantifiées par densitométrie (n=3). (B) Les cellules ont été traitées ou non avec du 5-FU pendant 48 h puis l'interaction OGT/TS a été analysée par co-IP OGT ou TS et les protéines détectées par WB. (C) Les cellules ont été transfectées avec des SiCtrl ou SiOGT puis, après 24 h, co-traitées ou non avec du 5-FU pendant 72 h. La O-GlcNAcylation de la TS a été analysée après IP TS et détection des protéines O-GlcNAcylées par WB (anticorps RL2). (D) Les cellules ont été traitées ou non avec du 5-FU pendant 48 h. Par chimie-click combinée au marquage PEG, la stœchiométrie de la O-GlcNAcylation de la TS a été analysée. Les isoformes O-GlcNAcylées de la TS sont détectées par WB et quantifiées par densitométrie (n=2). (E) Les cellules HT-29 et HT-29R ont été traitées avec du Thiamet G (2 μ M) pendant 48 h. Spectres HCD-MS/MS des peptides couvrant les sites Thr²⁵¹ et Thr³⁰⁶ O-GlcNAcylés de la TS. Les analyses statistiques ont été réalisées par ANOVA *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Modification Position in Protein	Peptide Sequence	Modifications	# PSMs	Peptide Position in Protein	# Missed Cleavages	Change	m/z [Da]	MH+ [Da]	Theo. MH+ [Da]	Confidence Byonic	Byonic Score	Byonic Delta Mod Score	Confidence Sequest HT	Xcorr Sequest HT
S114	[K].IWDANGsRDFLDSLGFSTR.[E]	S7(Phospho)	4	108-126	1	3	746.33881	2237.0019	2337.00229	High	625	171.1	High	4.15
T170	[K].tNPDDRRIMcAWNPR.[D]	T1(Phospho); C11(Carbamidomethyl)	2	170-185	2	3	698.97766	2094.9184	2094.93614	High	143.1	128	High	3.06
T234/T241/T251	[R].SGDMGLGVFPNIASYALLTYMIAHITG LKPGDFIHtLGDAHIYLNHIEPLK.[I]	T19/T26/T36(HexNAc)	1	216-266	1	5	1148.5953	5738.9474	5737.9436	High	609.7	0	-	-
T306	[K].IDDFKAEDFQIEGYNPHPtIK.[M]	T19(Phospho)	4	288-308	1	3	853.06232	2557.1724	2557.16466	High	293	225.2	High	3.3
T306	[K].IDDFKAEDFQIEGYNPHPtIK.[M]	T19(HexNAc)	1	288-308	1	4	670.82941	2680.2958	2680.2777	High	433.4	373.4	Medium	1.87

Figure S5. Modifications post-traductionnelles identifiées sur la TS.

Les cellules HT-29 et HT-29 5F31 ont été traitées avec du Thiamet G (2 µM) pendant 48 h dans du milieu HG. Tableau récapitulatif des MPT identifiées par HCD-MS/MS.

2.3.3. La O-GlcNAcylation stabilise la TS en la protégeant de la dégradation protéasomale

La TS étant O-GlcNAcylée et le *knock-down* de l'*OGT* réduisant le niveau de TS dans les cellules HT-29, nous avons étudié la possibilité que la O-GlcNAcylation de la TS régule sa stabilité. Pour ce faire, nous avons utilisé trois mutants de substitution d'une TS taguée FLAG, la Thr²⁵¹ et la Thr³⁰⁶ en Ala (T251A et T306A) empêchant à la fois la O-GlcNAcylation et la phosphorylation de la TS sur ces sites et la substitution de la Thr³⁰⁶ en Asp (T306D) mimant la phosphorylation. Dans les cellules HT-29, les mutations du site Thr³⁰⁶ (T306A et T306D) n'ont pas d'effet sur le niveau de TS. En revanche, la mutation T251A induit une diminution du niveau de TS. De manière intéressante et au contraire du double mutant T251A-T306D, la double mutation T251A-T306A diminue fortement le taux de TS (**Fig. 5A**). Des expériences de co-traitement avec le cycloheximide et le Thiamet-G, inhibiteurs de la traduction et de l'*OGA* respectivement, montrent que l'élévation de la O-GlcNAcylation globale augmente la durée de vie de la TS dans les cellules HT-29 (**Fig. 5B**). D'autre part, l'inhibition du protéasome par le MG132 dans les cellules HT-29 dont l'*OGT* est invalidée ou exprimant les mutant TS sur les résidus Thr²⁵¹ et/ou Thr³⁰⁶ a permis de montrer que la O-GlcNAcylation de la TS sur ces sites stabilise l'enzyme en la protégeant de la dégradation protéasomale (**Fig. 5C**). Le profil d'ubiquitination de la TS n'est pas modifié après invalidation de l'*OGT*, ce qui montre que la O-GlcNAcylation ne stabilise pas la TS par un mécanisme Yin-Yang avec l'ubiquitination (**Fig. 5D**). En dernier lieu, afin d'évaluer l'effet des MPT sur la stabilité de la TS, nous avons modélisé la TS humaine complète (**Fig. 6A**) et calculé les énergies potentielles empiriques de stabilisation (ΔE) (**Fig. 6B**). Nous montrons que la stabilité de la TS est légèrement augmentée par la O-GlcNAcylation sur la Thr³⁰⁶ mais fortement et de manière similaire par la phosphorylation sur la Thr³⁰⁶ ou la O-GlcNAcylation sur la Thr²⁵¹. Conformément aux données expérimentales (**Fig. 5A**), la présence simultanée d'une O-GlcNAcylation sur la Thr²⁵¹ et d'une O-GlcNAcylation ou d'une phosphorylation sur la Thr³⁰⁶ augmente encore plus cette stabilité (**Fig. 6B**). Cette stabilisation a notamment pour origine la création d'interactions ioniques fortes, de liaisons de Van der Waals ou de liaisons hydrogènes entre les acides aminés de la TS et le groupement phosphate ou O-GlcNAc sur les résidus Thr²⁵¹ ou Thr³⁰⁶ (**Fig. 6C**). De manière intéressante, la dimérisation de la TS pourrait également être stabilisée par la O-GlcNAcylation puisque le groupement O-GlcNAc sur la Thr²⁵¹ du monomère A interagit par des liaisons hydrogènes et π - σ avec des acides aminés situés au niveau de l'interface dimérique du monomère B (sur les résidus Gly⁶⁰, Met⁶¹, Gln⁶², Thr²⁵¹, Leu²⁵² et Tyr²¹³ respectivement) (**Fig. 6C**).

L'ensemble de ces résultats montrent que la O-GlcNAcylation des résidus Thr²⁵¹ et Thr³⁰⁶ contrôle la stabilité et la dégradation protéasomale de la TS indépendamment de la voie de l'ubiquitine dans les cellules cancéreuses coliques HT-29.

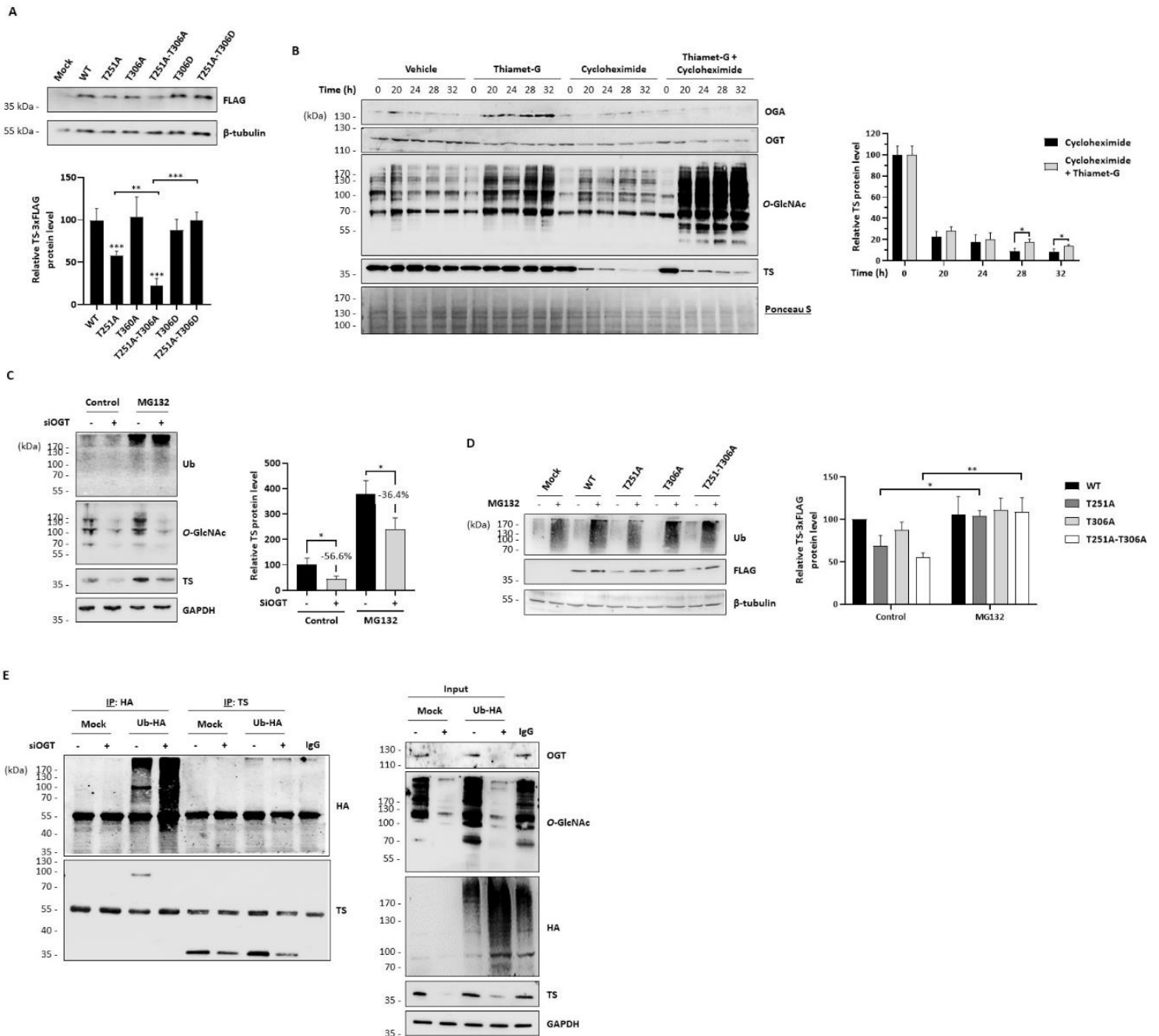


Figure 5. La O-GlcNAcylation sur les Thr²⁵¹ et Thr³⁰⁶ augmente la stabilité de la TS en la protégeant de la dégradation protéasomale indépendamment de l'ubiquitination.

Les expériences ont été menées en milieu HG et les protéines d'intérêt détectées par WB puis quantifiées par densitométrie. **(A)** Les cellules ont été transfectées avec un vecteur pcDNA3.1 vide ou, exprimant la TS-FLAG (pcDNA3.1-3xFLAG-TYMS) sauvage ou présentant la mutation indiquée (1 µg) pendant 48 h. L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA (n=4). *p<0,05. **(B)** Les cellules ont été traitées avec du Thiamet-G (2 µM) et/ou du cycloheximide (90 µg/mL) pendant 0, 24 h, 28 h ou 32 h. L'analyse statistique a été réalisée par un t-test Student (n=3). *p<0,05. **(C)** Les cellules ont été transfectées avec des SiCtrl ou SiOGT (10 nM) puis, après 84 h, traitées ou non avec du MG132 (10 µM) pendant 12 h. L'analyse statistique a été réalisée par un t-test Student (n=3). *p<0,05. **(D)** Les cellules ont été transfectées avec un vecteur pcDNA3.1 vide ou exprimant la TS-FLAG (pcDNA3.1-3xFLAG-TYMS) sauvage ou présentant la mutation indiquée (1 µg) puis, après 36 h, traitées ou non avec du MG132 (10 µM) pendant 12 h. L'analyse statistique a été réalisée par ANOVA (n=3). *p<0,05 ; **p<0,01. **(E)** Les cellules ont été transfectées avec un vecteur pcDNA3.1 vide ou un vecteur pcDNA3.1-Ub-HA (1 µg) et des SiCtrl ou SiOGT (10 nM). Après 76h, les cellules sont traitées pendant 12 h avec du MG132 (10 µM) puis une IP TS ou HA a été réalisée.

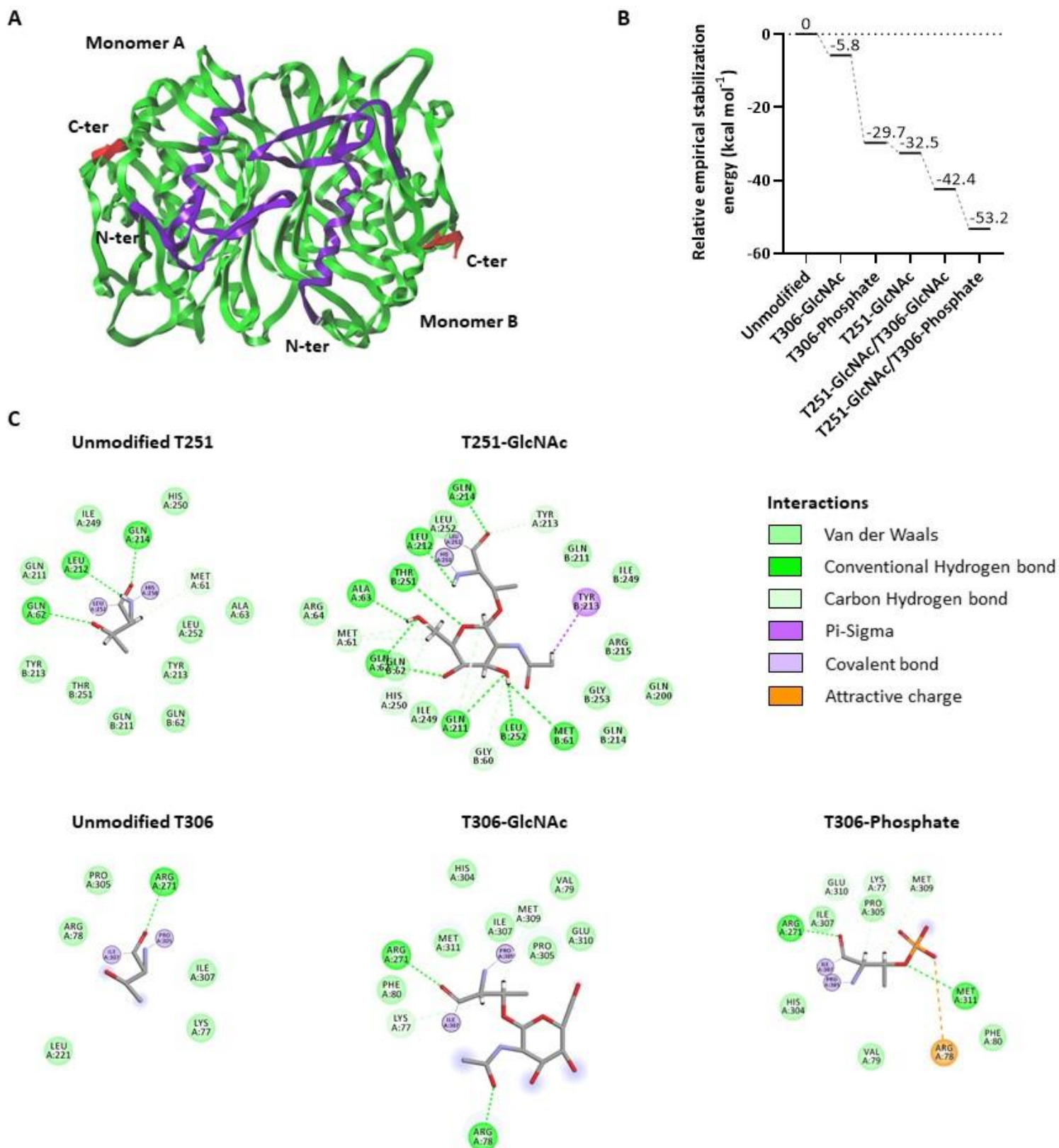


Figure 6. La *O*-GlcNAcylation sur les Thr²⁵¹ et Thr³⁰⁶ stabilise le dimère TS en formant de nouvelles interactions intra- et inter-monomères.

(A) Modélisation 3D de la structure humaine du dimère TS. La structure cristalline du dimère TS (en vert, PDB : IHZW) a été complétée avec les séquences reconstituées M1-G29 (en violet) et I307-V313 (en rouge). (B) Energies potentielles empiriques de stabilisation du dimère TS dont le monomère A est modifié sur les résidus Thr²⁵¹ et Thr³⁰⁶ par rapport au dimère de TS dont le monomère A n'est pas modifié. (C) Vue 2D des types d'interaction entre les groupements *O*-GlcNAc ou phosphate sur les résidus Thr²⁵¹ et Thr³⁰⁶ du monomère A de la TS avec les acides aminés environnants des monomères A et B de la TS.

3. Discussion

Dans cette étude, nous avons analysé la relation entre le senseur de l'état nutritionnel cellulaire, la *O*-GlcNAcylation, la TS cible principale du 5-FU et la réponse du CCR à cette chimiothérapie de référence. **Nous montrons que les taux de *O*-GlcNAcylation, d'OGT et de TS sont plus élevés au niveaux transcriptionnel et protéique dans les cellules coliques cancéreuses HT-29 par rapport aux cellules non cancéreuses CCD 841 CoN. De même, la *O*-GlcNAcylation et la TS sont augmentées dans les tumeurs colorectales murines induites par le carcinogène AOM/DSS par rapport aux tissus sains.** La TS est une enzyme clé dans la synthèse *de novo* du dTMP, un précurseur essentiel pour la synthèse de l'ADN. Du fait de son activité oncogénique, l'expression et l'activité de la TS sont augmentées dans le CCR (*cf.* 2.2 page 101). Une autre caractéristique du cancer est la reprogrammation métabolique consistant en l'augmentation de la glycolyse afin de soutenir la prolifération cellulaire (Hanahan and Weinberg, 2011). Ainsi, l'augmentation du métabolisme glucidique associée à une surexpression de l'OGT et à une hyper-*O*-GlcNAcylation des protéines, notamment des oncoprotéines, a été décrite dans les cancers (*cf.* 8.4.3 page 202) dont le CCR (Mi et al., 2011; Olivier-Van Stichelen et al., 2014; Steenackers et al., 2016; Yu et al., 2019). Plus particulièrement, notre équipe a montré que la *O*-GlcNAcylation participerait à la tumorigenèse du CCR par glycosylation et stabilisation de l'oncoprotéine β -caténine sur la Thr⁴¹ (Olivier-Van Stichelen, Guinez, et al., 2012; Olivier-Van Stichelen et al., 2014). Nos travaux analysent pour la première fois la *O*-GlcNAcylation de l'oncoprotéine TS et son rôle dans la réponse du CCR au 5-FU. **Nous montrons que le Glc, la GlcNH₂ et la *O*-GlcNAcylation globale augmentent la quantité de TS et que la *O*-GlcNAcylation de la TS est augmentée dans les cellules cancéreuses comparées aux cellules non cancéreuses.**

Nous avons analysé l'impact de la modulation de cette MPT sur la sensibilité à cette drogue *in vitro* et *in vivo*. **Ainsi, l'élévation de la *O*-GlcNAcylation par inhibition de l'OGA, augmente le niveau de TS et sensibilise à l'effet cytotoxique du 5-FU dans les tumeurs colorectales murines. A l'inverse et comme attendu, le *knock-down* de l'OGT diminue les niveaux de *O*-GlcNAcylation et de TS, et inhibe l'apoptose induite par le 5-FU dans les cellules cancéreuses coliques HT-29. De plus, la diminution de la sensibilité au 5-FU induite par le *knock-down* de l'OGT est restaurée après surexpression du gène *TYMS*. Ce résultat suggère que la cytotoxicité du 5-FU est directement dépendante de la quantité de TS, qui est elle-même régulée par la *O*-GlcNAcylation. De manière intéressante, les cellules non cancéreuses sous-exprimant la TS ou les cellules cancéreuses surexprimant la TS sont résistantes au 5-FU.** Les SNP induisant une surexpression de la TS sont des biomarqueurs prédictifs de résistance du CCR au 5-FU déjà utilisés en clinique (Palmirotta et al., 2018). Nous suggérons que l'activité cytotoxique du 5-FU nécessite une quantité optimale de TS. La *O*-GlcNAcylation de la TS pourrait également augmenter l'affinité de l'enzyme pour le métabolite actif FdUMP et augmenter l'inhibition de la TS. Enfin, la pertinence de nos résultats en physiopathologie humaine est étayée par l'analyse transcriptomique (données de puces à ADN

GSE104645) sur une cohorte de patients atteints de CCR métastatiques traités par chimiothérapie à base de 5-FU. **Dans la cohorte GSE104645, la résistance à la chimiothérapie ne serait pas corrélée à une augmentation de l'expression de *TYMS* mais à une réduction de celle de l'*OGT*. Ensemble, nos travaux montrent que la *O*-GlcNAcylation sensibilise le CCR au 5-FU *in vitro* et *in vivo* par augmentation du niveau de la cible principale de la drogue, la TS. A noter que le Thiamet-G administré seul réduit également la progression du CCR *in vivo*.** Ce résultat est en contradiction avec les travaux de Yang et collaborateurs (2015) montrant que, chez la souris, l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation globale par hétérozygotie du gène *MGEA5* codant l'*OGA* augmente la susceptibilité à la colite induite par l'AOM/DSS ainsi que l'incidence des tumeurs colorectales. Dans ces souris, la *O*-GlcNAcylation élevée stimule l'activation de la signalisation NF- κ B et aggrave l'inflammation (cf. 7.5 page 175). Les principales différences entre nos deux études résident dans le modèle d'étude choisi et la stratégie de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation. En effet, les souris avec le fond génétique *MGEA5*^{+/-} présentent une hyper-*O*-GlcNAcylation constitutive qui, similairement au DSS, augmente l'inflammation et favorise la tumorigenèse induite par l'AOM (Y.R. Yang, Kim, et al., 2015). Dans notre travail, l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation est induite par l'administration continue de Thiamet-G pendant 13 jours et après l'apparition des tumeurs colorectales (grades 1 à 5). De ce fait, nous observons l'effet de la *O*-GlcNAcylation sur la progression tumorale et non sur la tumorigenèse comme dans la précédente étude de Yang et collaborateurs de 2014 (Yang et al., 2014). En effet, ces derniers révèlent que l'hétérozygotie *MGEA5*^{+/-} diminue la tumorigenèse et améliore la survie indépendamment de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine dans un modèle murin *APC*^{min/+} de CCR sporadiques (Yang et al., 2014). **Ces résultats *in vivo* montrent que l'homéostasie de la *O*-GlcNAcylation contrôle la progression tumorale.**

Nous montrons également que le 5-FU affecte la *O*-GlcNAcylation globale dans les cellules et tissus colorectaux. *In vitro*, ce mécanisme est dû à une diminution des niveaux transcriptionnel et protéique de l'*OGT*. *In vivo*, le mécanisme sous-jacent semble être différent puisque, dans le modèle murin de CCR, le niveau d'*OGT* n'est pas affecté par le 5-FU. Dans ces tissus tumoraux et comparés aux tissus sains, l'hyper-*O*-GlcNAcylation des protéines n'est pas due à augmentation du niveau d'*OGT*. Ce résultat suggère qu'une activité accrue de l'*OGT* pourrait être responsable de cette élévation de la *O*-GlcNAcylation. En ce sens, le 5-FU pourrait affecter non pas le niveau protéique de l'*OGT* mais son activité enzymatique *in vivo*. De plus, l'activité de l'*OGT* est inhibée par des concentrations élevées d'UDP, d'UTP et d'UDP-GlcNAc (Haltiwanger et al., 1992). Ainsi, les métabolites du 5-FU pourraient inhiber l'*OGT* en générant des dérivés fluorés de ces composés d'uridine (Pederson et al., 1994). **Ensemble, ces résultats montrent qu'il existe un « *cross-talk* » entre *O*-GlcNAcylation et voie du 5-FU *in vitro* et *in vivo*.**

Pour aller plus loin, nous avons investigué le mécanisme moléculaire par lequel la *O*-GlcNAcylation régule la TS. **Nous montrons que l'OGT interagit avec et *O*-GlcNAcyle la TS. Par spectrométrie de masse, nous avons identifié le site Thr²⁵¹ comme étant *O*-GlcNAcylé et le site Thr³⁰⁶ comme étant *O*-GlcNAcylé et phosphorylé. Nous mettons en évidence que la *O*-GlcNAcylation stabilise la TS en la protégeant de la dégradation protéasomale d'une manière indépendante de la voie de l'ubiquitine.** La phosphorylation de la TS sur la Thr³⁰⁶ avait déjà été identifiée mais son rôle n'avait pas été étudié (Frączyk et al., 2015). Des études sur de nombreuses protéines ont révélé un dialogue entre la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation sur un même résidu ou sur un résidu voisin (cf. 6.1 page 154). Ce mécanisme Yin-Yang est notamment impliqué dans la régulation de la stabilité des protéines (cf. 6.2.2 page 159). La dégradation de la TS par le protéasome 26S est assurée, non pas par un signal d'ubiquitination, mais par la conformation tridimensionnelle d'une région flexible désordonnée appelée « dégron ». Celle-ci recouvre les 45 premiers acides aminés à l'extrémité N-ter et est constituée de deux sous-domaines : une région intrinsèquement désordonnée IDR et une hélice α amphipathique hA (Melo et al., 2011). Le dégron régulerait la capacité de l'enzyme à reconnaître et/ou entrer dans la chambre protéasomale (cf. 2.1.3.3 page 95). Le résidu Thr³⁰⁶ est quant à lui localisé dans une séquence dégron cryptique C-ter comprenant les résidus ²⁷⁶Phe-Val³¹³. Cette séquence serait active lorsque le dégron N-ter est bloqué ou inhibé, par la présence, dans la TS, de grandes délétions ou certaines substitutions. Ainsi, isolée du reste de la protéine, la séquence ²⁷⁶Phe-Val³¹³ possède une activité dégron plus élevée que le dégron N-ter. Cette activité est augmentée par la présence des séquences IDR et hA du dégron N-ter (Barbour et al., 2013). De plus, la dégradation de la TS, rendue hyperstable par mutation au niveau du dégron N-ter, est d'autant plus inhibée par un blocage de l'extrémité C-ter (Melo et al., 2010). Fait intéressant, la séquence ³⁰⁵Pro-Thr-Ile³⁰⁷ contenant la Thr³⁰⁶ est similaire au motif tripeptidique ³⁷⁵Pro-Thr-Leu³⁷⁷ (Acquaviva et al., 2001) dictant la dégradation ubiquitine-indépendante du facteur de transcription c-Fos (Bossis et al., 2003). La dégradation de c-Fos est contrôlée au cours du cycle cellulaire par les activités de son dégron C-ter situé entre les résidus ³⁶⁰Lys-Leu³⁸⁰ et contenant le tripeptide ³⁷⁵Pro-Thr-Leu³⁷⁷, et de son dégron N-ter constitué des 50 premiers acides aminés (Ferrara et al., 2003). **Nous montrons que la présence seule de la *O*-GlcNAcylation ou de la phosphorylation sur la Thr³⁰⁶ n'est pas suffisante pour réguler la stabilité de la TS.** Ce résultat est en accord avec les travaux de Peña et collaborateurs (2006) montrant que la délétion des acides aminés ³⁰⁵Pro-Thr-Ile³⁰⁷ n'affecte pas la stabilité de la TS (Peña et al., 2006). La Thr²⁵¹ est un résidu clé situé dans le 6^{ème} feuillet β à l'interface dimérique et est impliqué dans la dimérisation de la TS (Chanama et al., 2017). Pendant la phase S, les homodimères TS adoptent une conformation active conduisant à l'induction de l'expression et à la stabilité de la TS par des mécanismes traductionnels et post-traductionnels (cf. 2.1 page 91). A ce jour, aucune MPT n'avait été identifiée sur la Thr²⁵¹ de la TS. **Nous sommes donc les premiers à montrer la *O*-GlcNAcylation de la TS sur la Thr²⁵¹ et son rôle dans sa protection de la dégradation protéasomale. La *O*-GlcNAcylation de la Thr²⁵¹ pourrait stabiliser la TS en modifiant sa conformation tridimensionnelle.** En ce sens, Pozzi

et collaborateurs (2019) ont récemment montré que la substitution de la Gln⁶² par une Arg (Q62R), un autre acide aminé clé à l'interface dimérique, induit une légère ouverture du dimère et l'adoption constitutive de la conformation active de la TS. De manière intéressante, le mutant Q62R est moins stable que la TS sauvage après l'ajout du substrat d'UMP (Pozzi, Lopresti, et al., 2019). **Enfin, nous montrons que la dégradation de la TS induite par l'absence de O-GlcNAcylation de la Thr²⁵¹ peut être régulée par le statut de O-GlcNAcylation/phosphorylation de la Thr³⁰⁶. Ainsi, cette dégradation est inhibée lorsque la Thr³⁰⁶ est phosphorylée mais augmentée lorsqu'elle ne porte ni phosphorylation ni O-GlcNAcylation.** De manière générale, la phosphorylation et la O-GlcNAcylation ont des effets opposés lorsqu'elles ciblent le même résidu (cf. 6.1 page 154). Nous pouvons donc supposer que la O-GlcNAcylation de la Thr³⁰⁶ du dégron C-ter favorise la dégradation protéasomale de la TS lorsque le site Thr²⁵¹ à l'interface dimérique n'est pas O-GlcNAcylé. Ce mécanisme de régulation moléculaire serait ainsi semblable à celui de c-Fos dont l'activité du dégron cryptique est régulée par la conformation tridimensionnelle, possiblement par le processus d'hétérodimérisation, et celle du dégron principal par la phosphorylation (Ferrara et al., 2003). **En revanche, nos calculs d'énergie potentielle empirique de stabilisation indiquent que la O-GlcNAcylation et la phosphorylation de la Thr³⁰⁶ augmente toutes deux la stabilité de la TS lorsqu'elle est O-GlcNAcylée sur la Thr²⁵¹ et ce, par la création de nouvelles interactions intra- et inter-monomères.** Les travaux de Wang et collaborateurs (2012) ont montré que la substitution des résidus O-GlcNAcylables Thr³⁰⁵ et Thr³¹² de AKT par une Tyr mime l'encombrement stérique de la O-GlcNAcylation et diminue la phosphorylation du site adjacent Thr³⁰⁸ (Wang et al., 2012). Cette stratégie a été récemment utilisée afin de mimer la O-GlcNAcylation sur les Ser³²² et Ser³²³ du facteur d'initiation de la traduction eIF4A1 (Li et al., 2019). Elle pourrait donc être utilisée pour différencier le rôle de la O-GlcNAcylation et de la phosphorylation de la Thr³⁰⁶ sur la stabilité de la TS. **Nous montrons que le knock-down de l'OGT induit une perte très modérée de la O-GlcNAcylation de la TS mais a un effet drastique sur son niveau protéique.** Récemment, Qin et collaborateurs (2017) ont révélé que tous les événements de O-GlcNAcylation ne sont pas réversibles mais qu'un sous-ensemble de protéines O-GlcNAcylées présente une déglycosylation minimale des résidus O-GlcNAcylés ou de la dégradation du squelette protéique. La stabilité de ces protéines O-GlcNAcylées est plus sensible à l'inhibition de la O-GlcNAcylation par rapport aux populations de protéines dont la O-GlcNAcylation est plus dynamique (Qin et al., 2017). **Ainsi, la O-GlcNAcylation de la TS semble être une modification post-traductionnelle très abondante et stable ayant un rôle crucial dans la stabilité de l'enzyme cible du 5-FU.**

III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ensemble, nos travaux montrent qu'il existe un « *cross-talk* » entre *O*-GlcNAcylation et voie du 5-FU. La *O*-GlcNAcylation, senseur de l'état nutritionnel cellulaire, augmente ainsi la stabilité de la cible du 5-FU, la TS. *O*-GlcNAcylation mise en évidence dans les lignées cellulaires sur les résidus Thr²⁵¹ et Thr³⁰⁶. Cette MPT sensibilise alors à l'effet cytotoxique du 5-FU *in vitro* et *in vivo* dans le CCR. Ces travaux pourraient être confortés par une étude protéomique sur des biopsies de tumeurs colorectales humaines afin de corrélérer la *O*-GlcNAcylation, le niveau protéique de TS et la réponse au 5-FU. Ainsi, notre équipe a mis en place une collaboration avec le Pr. Farid El Hadji du COL (Centre Oscar Lambret) de Lille afin d'obtenir des lames histologiques de tumeurs issues de patients CCR répondeurs ou non à la chimiothérapie à base de 5-FU. Sur ces lames, les niveaux protéiques d'OGT, de *O*-GlcNAcylation et de TS pourront être analysés par immunohistochimie en parallèle des niveaux transcriptionnels d'OGT et de TS par RNAscope (RiboNucleic Acid scope).

L'effet bénéfique de la *O*-GlcNAcylation dans la réponse aux thérapies anti-cancéreuses a été très récemment décrit pour le cisplatine dans le cancer de l'ovaire (Zhou et al., 2018), le bortézomib dans le lymphome à cellules du manteau (Luanpitpong et al., 2018) et pour la thérapie TRAIL dans divers cancers (H. Lee et al., 2019). De Queiroz et collaborateurs (2016) montrent dans des cellules cancéreuses ovariennes que la dérégulation de l'homéostasie de la *O*-GlcNAcylation stabilise p53 et stimule sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle sur les gènes cibles p21^{Cip1} et BAX respectivement impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Ainsi, *in vitro*, l'inhibition de l'OGA par le Thiamet-G a un effet synergique sur l'activité anti-cancéreuse du cisplatine en activant la signalisation de p53 et en induisant l'arrêt du cycle cellulaire. Les auteurs suggèrent l'utilisation d'un inhibiteur de l'OGA en thérapie adjuvante pour augmenter la sensibilité à l'agent chimiothérapeutique (de Queiroz et al., 2016). Le Thiamet-G est l'inhibiteur de l'OGA le plus largement utilisé *in vitro* et *in vivo* en raison de sa stabilité, sa sélectivité, sa biodisponibilité orale et sa capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (Yuzwa et al., 2008). De plus, une élévation chronique de la *O*-GlcNAcylation par un traitement prolongé avec du Thiamet-G (plus de 5 mois) n'est pas toxique *in vivo* chez la souris (Yuzwa et al., 2012b). Par ailleurs, aux Etats Unis d'autres inhibiteurs sélectifs de l'OGA, le MK-8719 (Selnick et al., 2019) et l'ASN120290, ont récemment obtenu de la FDA (Food and Drug Administration) le statut de médicament orphelin (ODD, Ophan Drug Designation) dans le traitement de la tauopathie PSP (Paralysie Supranucléaire Progressive) en 2016 et 2018 respectivement. Actuellement utilisés en essais cliniques de phase I, ils montrent des résultats prometteurs (H.E. Lee et al., 2019). D'autre part, la supplémentation en Gln ou en GlcNH₂, deux précurseurs de l'UDP-GlcNAc dans la voie HBP, est utilisée en clinique pour traiter les maladies inflammatoires ou renforcer la fonction cardiaque post-opératoire (Ferron et al., 2019, p.201). Néanmoins et malgré les bénéfices cliniques apportés par leur administration, l'utilisation de la Gln et la GlcNH₂ n'est pas spécifique à la voie HBP et le lien entre ces bénéfices et l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation reste à démontrer. **Les résultats de notre étude proposent une nouvelle stratégie thérapeutique combinant le 5-FU à un inhibiteur de l'OGA associé à une alimentation adaptée telle que la supplémentation en Gln ou GlcNH₂ afin d'améliorer la réponse chimiothérapeutique dans le CCR.**

Des données épidémiologiques révèlent un effet néfaste des désordres métaboliques sur la réponse du CCR au 5-FU (cf. 8.4.5 page 216). Ainsi, l'hyperglycémie diminue la sensibilité au 5-FU de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses coliques par augmentation de la réplication de l'ADN et diminution de l'apoptose (Ma et al., 2014). Cheng et collaborateurs (2014) montrent également qu'une glycémie élevée rend les cellules cancéreuses pancréatiques AsPC-1 et Panc-1 moins sensibles au 5-FU par activation de la voie de signalisation mitogène PI3K/AKT. Cette résistance est alors réversée par traitement au 2-DG, un analogue de glucose qui induit une déplétion de l'ATP cellulaire et une inhibition de la glycosylation des protéines résultant, *in fine*, à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort cellulaire (Cheng et al., 2014). Plusieurs études ont montré l'implication de la suractivation de la voie PI3K/AKT/mTOR dans le mécanisme de résistance au 5-FU du CCR et suggèrent l'inhibition de cette voie comme stratégie thérapeutique pour augmenter l'efficacité de la drogue (Liu et al., 2015; Kim et al., 2018; Li et al., 2020). Ainsi, le 5-FU et l'inhibition pharmacologique de mTOR ont un effet anti-prolifératif synergique *in vitro* et *in vivo* dans les cancers gastriques (Zhang et al., 2018) et hépatiques (Matsuzaki et al., 2009). Il est à noter que l'inhibition de mTOR induit une diminution de l'expression de *TYMS* et *DPYD* dans les cellules cancéreuses gastriques cirrhotiques OCUM-2M et OCUM-8 (Zhang et al., 2018). De manière intéressante, les désordres métaboliques peuvent également être à l'origine d'une hyper-*O*-GlcNAcylation aberrante des protéines (cf. 8.1 page 191). Ces protéines incluent différents oncogènes, suppresseurs de tumeur mais également acteurs de voies de signalisation dont ceux de la voie PI3K/AKT/mTOR (cf. 7.5 page 175 et 8.4.4.1 page 206). **Nous avons pu mettre en évidence que la *O*-GlcNAcylation participe à la suractivation de mTOR dans le côlon *in vitro* et *in vivo* dans les contextes de dérégulations métaboliques associées à l'obésité et au CCR (en page 333).** L'hyper-*O*-GlcNAcylation des protéines pourrait alors diminuer la sensibilité du CCR au 5-FU en stimulant notamment l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR. La stratégie thérapeutique proposée de combinaison du 5-FU avec un inhibiteur de l'OGA qui a pour but d'augmenter la *O*-GlcNAcylation globale des protéines dont celle de la TS afin de la stabiliser, pourrait donc être limitée par l'effet de l'hyper-*O*-GlcNAcylation d'autres protéines sur le développement tumoral. Cette limitation pourrait être levée par l'utilisation, non pas d'un inhibiteur de l'activité enzymatique de l'OGA, mais d'un inhibiteur spécifique de l'interaction de l'OGA avec la TS qui serait synthétisé sur la base d'études structurales.

Cette étude ouvre le champ à l'investigation du rôle de la *O*-GlcNAcylation sur d'autres enzymes de la voie du 5-FU et son impact sur la réponse à la drogue. En effet, cette MPT a déjà été identifiée sur les enzymes anaboliques du 5-FU TP (Champattanachai et al., 2013) et TK (Hahne et al., 2013; Jochmann et al., 2013). Des expériences préliminaires dans l'équipe ont permis de confirmer la *O*-GlcNAcylation de la TS mais également de la TP et la TK dans la lignée cancéreuse colique métastatique LoVo (*TP53* muté et phénotype MSI). Il serait ainsi intéressant d'étudier le rôle de ces MPT sur les protéines cibles et déterminer l'impact de la modulation de la *O*-GlcNAcylation globale sur l'effet cytotoxique du 5-FU.

Ces résultats pourront être confrontés à ceux obtenus sur la lignée cancéreuse colique primaire HT-29 (*TP53* sauvage et phénotype MSS). Cette analyse comparative permettrait de mettre en évidence l'importance du grade cancéreux, de la mutation de *TP53* et du statut MSI sur l'impact de la *O*-GlcNAcylation dans la réponse au 5-FU. La mutation de *TP53* et le phénotype MSI sont corrélés à une diminution de la réponse du CCR au 5-FU *in vitro* (O'Connor et al., 1997; Carethers et al., 1999; Bunz et al., 1999) et *in vivo* (Ribic et al., 2003; Carethers et al., 2004; Ahmed et al., 2008; Kandioler et al., 2015). L'utilisation de lignées cellulaires résistantes au 5-FU permettrait de compléter l'analyse comparative. Enfin, et pour aller encore plus loin, il serait intéressant de déterminer si la *O*-GlcNAcylation régule les protéines de la voie catabolique du 5-FU et la détoxification de la drogue. Un intérêt particulier pourrait être porté sur la DPD et le transporteur à efflux ABCB1 puisque leur expression et leur activité sont corrélées à la résistance du CCR au 5-FU *in vitro* (Beck et al., 1994; Takebe et al., 2001; Schaefer et al., 2006; Tan, 2019) et *in vivo* (Salonga et al., 2000; Isshi et al., 2002; Kornmann et al., 2003; Tokunaga et al., 2005; Ciaparrone et al., 2006; Jensen et al., 2006; Yanagisawa et al., 2007; De Iudibus et al., 2008; De Mattia et al., 2013). Des études récentes ont mis en évidence une régulation indirecte par la *O*-GlcNAcylation de l'expression de *DPYD* et *ABCB1* dans des lignées cancéreuses mammaires et de neuroblastome (Tan et al., 2017; Das et al., 2019) sans déterminer son impact sur la réponse au 5-FU. Enfin, le 5-FU étant rarement administré seul (cf. 3.2 page 44), il sera nécessaire de déterminer l'effet de la *O*-GlcNAcylation sur la TS et la réponse au 5-FU lorsque la drogue est associée à d'autres chimiothérapies et thérapies ciblées. Il a notamment été montré que Top1, cible de l'agent chimiothérapeutique irinotécan, est *O*-GlcNAcylée *in vitro* et *in vivo*, et que cette glycosylation augmente son activité de relaxation de l'ADN (Noach et al., 2007). Or, il existe une corrélation positive entre l'activité de Top1 et la sensibilité à l'irinotécan (Jansen et al., 1997). Ainsi, la *O*-GlcNAcylation pourrait augmenter la réponse du CCR à l'irinotécan. D'autre part, l'expression des enzymes **ERCC1** (Excision Repair Cross-Complementation group 1) et **XRCC1** (X-ray Repair Cross Complementing 1) impliquées dans la réparation des adduits de l'ADN est augmentée dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et SUM159 en condition hyperglycémique *via* l'augmentation, par *O*-GlcNAcylation, de l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription GLI1 et GLI2 (Das et al., 2019). Dans un contexte de désordre métabolique telle que l'hyperglycémie, la *O*-GlcNAcylation pourrait diminuer la réponse du CCR à l'agent alkylant oxaliplatine en stimulant la réparation des dommages à l'ADN.

La « protéomique clinique » est une approche en plein essor qui vise à étudier l'ensemble du protéome afin de donner une information diagnostique, pronostique ou encore de suivi thérapeutique des pathologies humaines. Or, le protéome est une entité dynamique puisque les protéines peuvent être modifiées et régulées, notamment par des MPT. L'analyse différentielle, dans des tumeurs de différents grades et des tissus sains, de la *O*-GlcNAcylation et de la phosphorylation sur certaines protéines cibles clé pourrait donc être utilisée comme biomarqueur du cancer.

Publication soumise

O-GlcNAcylation of Thymidylate Synthase: a 5-FU sensitization mechanism in colorectal cancer

Ninon Very¹, Stéphan Hardivillé¹, Amélie Decourcelle², Julien Thévenet³, Madjid Djouina⁴, Adeline Page⁵, Gérard Vergoten⁴, Céline Schulz¹, Julie Kerr-Conte³, Tony Lefebvre¹, Vanessa Dehennaut² and Ikram El Yazidi-Belkoura^{1*}.

¹ Université de Lille, CNRS, UMR8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000, Lille, France.

² Université de Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000, Lille, France.

³ Université de Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur Lille, U1190 - EGID, F-59000 Lille, France.

⁴ Université de Lille, Inserm, CHU Lille, U1286 - INFINITE - Institute for Translational Research In Inflammation, F-59000 Lille, France.

⁵ Protein Science Facility, SFR BioSciences, CNRS UMS3444, INSERM US8, UCBL, ENS de Lyon, 69007 Lyon, France.

* **Correspondence** : ikram.el-yazidi@univ-lille.fr

ABSTRACT

Background: Alteration of *O*-GlcNAcylation, a nuclear and cytoplasmic dynamic post-translational modification, is associated with carcinogenesis and cancer progression. However, its role in the response of anti-cancer therapies is poorly investigated. The gold standard treatment for colorectal cancer (CRC), 5-fluorouracil (5-FU), mainly targets Thymidylate Synthase (TS). *O*-GlcNAcylation has been identified on TS but not further investigated yet. We hypothesized that *O*-GlcNAcylation interfered with CRC sensitivity to 5-FU by regulating TS.

Methods: We used a mouse model of human CRC treated with 5-FU and/or Thiamet-G to enhance *O*-GlcNAcylation. CRC progression was analyzed by assessing the number and grade of tumors by colonoscopy. Immunoblotting and immunohistochemistry were performed to monitor OGT, *O*-GlcNAc and TS expression in colon tissues. *In vitro* experiments were conducted in non-cancerous and cancer colon cells after 5-FU treatment and/or *OGT* knockdown. Cell cycle and apoptosis were measured by flow cytometry. Expression/stability and activity of TS were determined by immunoblots, RT-qPCR and in a tritium-release assay. High resolution HCD mass spectrometry, mutagenesis and structural studies were employed to map *O*-GlcNAcylated sites and to decipher their role on TS stability.

Results: *In vivo*, we found that 5-FU decreased O-GlcNAcylation and, reciprocally, that elevation of O-GlcNAcylation was associated with an increase in TS levels. Combined treatment had a synergistic inhibitory effect on tumor progression. *In vitro*, we showed that 5-FU impacts O-GlcNAcylation by decreasing OGT expression. Reciprocally, OGT knockdown decreased sensitivity of cancer cells to 5-FU by reducing TS levels. We identified T251 and T306 as OGT targets and we deciphered the underlying molecular mechanism highlighting the role of these O-GlcNAcylated residues in the proteasomal degradation of TS.

Conclusions: We revealed a cross-talk between O-GlcNAcylation and 5-FU metabolism *in vitro* and *in vivo*. Notably, we found that O-GlcNAcylation sensitizes CRC to 5-FU by stabilizing TS. Taken together, our data proposes that combining 5-FU-based chemotherapy with an OGA inhibitor could be a new way to enhance CRC response to 5-FU.

Keywords: O-GlcNAcylation, OGT, Thymidylate Synthase, 5-fluorouracil, colorectal cancer, chemosensitivity

BACKGROUND

Thymidylate Synthase (TS) is a key ubiquitous enzyme involved in the *de novo* biosynthesis of 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate (dTMP) and dihydrofolate (DHF) from 2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (dUMP) and 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-MTHF). dTMP is an essential precursor for DNA synthesis and repair. TS expression and activity are largely increased in cancer to support high cell proliferation rate, hence its inhibition is widely used in pharmaceutical therapeutic strategies of several cancers including colorectal cancer (CRC) [1,2]. 5-fluorouracil (5-FU) is the gold standard treatment for CRC, the third most commonly diagnosed and the second most deadly cancer worldwide (1,8 million new cases and 17,000 deaths in 2018) [3]. In cells, 5-FU is converted into the active metabolite

5-fluoro-2'-deoxyuridine monophosphate (FdUMP), which forms a stable inactive complex with TS and 5,10-MTHF. This inhibition induces an accumulation of dUTP and a depletion of 2'-deoxythymidine-5'-triphosphate (dTTP) which cause DNA damage and cell cycle arrest. *De novo* or acquired resistance to 5-FU chemotherapy regimens remains a major challenge in the management of CRC and clinical outcome remains poor in patients with advanced cancers. High TS expression levels and single nucleotide polymorphism in TS *gene* (*TYMS*) are clinical predictive biomarkers of 5-FU-based chemotherapy resistance in CRC [4]. Post-translational modifications (PTMs) regulate enzymatic activity, nuclear translocation and degradation of TS. TS is phosphorylated [5,6], SUMOylated [7], N^α-acetylated [8], ubiquitinated

[8] and *O*-GlcNAcylated [9,10]. However, the role of these PTMs in the 5-FU response is still unknown. *O*-GlcNAcylation is a dynamic PTM finely tuned by two unique antagonistic enzymes: *O*-GlcNAc transferase (OGT) and *O*-GlcNAcase (OGA) that respectively transfers and hydrolyzes the *O*-GlcNAc moiety on serine and threonine residues of proteins in response to cell nutrient state. This PTM regulates protein-protein interaction, stability, enzymatic activity and subcellular localization of nuclear, cytoplasmic and mitochondrial proteins, hence a plethora of fundamental cellular mechanisms [11]. Alteration of *O*-GlcNAcylation has been reported in many cancers and several studies have pointed out its involvement in the etiology and progression of the disease [12]. Recent emerging research has demonstrated that *O*-GlcNAcylation could also regulate the response of cancerous cells to therapeutic drugs such as tamoxifen [13], Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) therapy [14,15], cisplatin [16–18], bortezomib [19,20] and 5-FU [21]. Herein, we report multiple lines of *in vitro* and *in vivo* data supporting the *O*-GlcNAcylation sensitizing effect in 5-FU response in CRC, including the novel finding that this PTM at Thr²⁵¹ and Thr³⁰⁶ serves to stabilize TS.

METHODS

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Cell lines

CCD 841 CoN and HT-29, purchased from American Type Culture Collection (ATCC, USA), and HT-29 5F31 [22] cell lines were cultured respectively in Eagle's minimum essential medium (EMEM) with 5 mM glucose, McCoy's 5A and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 25 mM glucose (Lonza) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Dutscher) and 2 mM L-glutamine at 37°C and 5% CO₂ in a humid incubator. In all experiments except for **Fig. 4A**, cells were seeded or transfected in their respective medium and then, 24 h later, grown in DMEM with 25 mM glucose (High Glucose, HG). For **Fig. 4A**, cells were grown in DMEM without glucose (OG) (Gibco) or DMEM with 5 mM glucose (Low Glucose, LG) (Lonza).

Animal models

Animal care and procedures were carried out according to the French guidelines for the care of experimental animals. Forty-five C57BL/6J OlaHsd wild-type age-matched (8 weeks) male mice (Envigo Harlan) were housed in groups of 10 per cage using a 12 h light/12 h dark cycle and provided with water and standard diet (SAFE) *ab libitum*. Forty mice were injected intraperitoneally with 10 mg/kg azoxymethane (AOM, Sigma-Aldrich) and 5 mice received an injection of a vehicle (NaCl 0.9%) (untreated, healthy controls). The AOM-injected

mice were given 3 cycles of Dextran Sulfate Sodium (DSS, MP Biomedicals™) according to the protocol previously described [23] with the following modifications: DSS 2.5% for 7 days in week 1, DSS 1.5% for 5 days in week 3 and DSS 1.5% for 5 days in week 8. CRC induction was monitored under anesthesia (4% isoflurane, Isoflo-Zoetis) and colonoscopies were performed at day 68 using a high-resolution Karl Storz colonoscope (1.9 mm outer diameter; Tuttlingen, Germany). At day 73, AOM-injected and control mice were randomized in 4 groups: vehicle (NaCl 0.9%), 5-FU (12.5 mg/kg/day) (Sigma-Aldrich), Thiamet-G (90 mg/kg/day) and 5-FU + Thiamet G. Mice were anesthetized with isoflurane and ALZET® osmotic pumps were subcutaneously implanted with a connected ALZET® intraperitoneal catheter (Charles River) for continuous drug delivery at 0.5 µL/h for 13 days. At day 86, tumor numbers and grade were assessed by colonoscopy according to the method described in [24]. Mice were subsequently sacrificed. Colon tissues were dissected, flash-frozen and stored at -80°C or fixed in 10% buffered formalin for further paraffin embedment.

METHOD DETAILS

Plasmids

Vector pcDNA3.1-TYMS-3xFLAG was generated using gel purified EcoRV/XhoI digested pcDNA3.1 plasmid, synthetic codon optimized human TYMS-3xFLAG sequence (GeneArt High-Q Strings,

ThermoFisher Scientific) and NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England BioLabs) following the manufacturer's instructions. Codon optimized 3xFLAG-tagged TYMS mutants were generated using Phusion® High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs), adequate primers (**Table S1**) and pcDNA3.1-TYMS-3xFLAG as a template. Samples were then digested for 1 h at 37°C with 1 unit of DpnI and 1 µl was used for transformation in XL10-Gold Ultracompetent Cells (Agilent Technologies). Correct sequence of all constructs was confirmed by Sanger sequencing.

Transfection

Cells were transfected with siRNA using Lipofectamine™ RNAiMAX or plasmids using Lipofectamine™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Cell growth assay

Cells were seeded in a 96-well microplate 24 h prior treatment with increasing concentrations of 5-FU (from 0 to 20 µM) for 48 h. Cell viability was analyzed using CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) following the manufacturer's instructions and measuring absorbance at 490 nm.

Cell cycle analysis

Cells were harvested using trypsin/EDTA, washed twice with Phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 70% ethanol at -20°C overnight. Cells were

then washed twice with PBS and incubated for 1 h at 37°C with 10 ng/mL RNase A (Sigma-Aldrich) and 500 µg/mL propidium iodide (Sigma-Aldrich). DNA content was evaluated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis on FACScalibur (BD Biosciences) using CellQuest software (Becton Dickinson).

SDS-PAGE and Western Blot

Cells were lysed in radioimmunoprecipitation (RIPA)-modified lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1%, NaDoc 0.25%, Triton X-100 1%, pH 7.4) complemented with protease and phosphatase inhibitors (50 mM NaF, 100 µM Na₃O₄V) and 1X of SIGMAFAST™ Protease Inhibitor Tablet (Sigma-Aldrich)). Colon tissues and tumors were homogenized using Lysing Matrix S Beads (MP Biomedicals™) in FASTPREP homogenizer (MP Biomedicals™) at 6 m/s for 2 cycles of 40 s in RIPA-modified lysis buffer. Proteins were harvested, separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. These membranes were then blocked with 5% nonfat milk (except for ubiquitin blotting with 5% BSA), incubated with a primary antibody in a blocking solution anti-ubiquitin, 1:1,000 (Enzo); anti-*O*-GlcNAc, 1:4,000 (Novusbio); anti-OGT (Ti-14), 1:2,000; anti-FLAG, 1:1,000 (Sigma-Aldrich); anti-TS ([EPR4545]), 1:1,000 (Abcam), anti-TS (F-7), 1:1,000; anti-HA, 1:200; anti-GAPDH, 1:5,000; anti-β-tubulin, 1:1,000 (Santa Cruz) or anti-PARP-1, 1/1,000 (Cell Signaling) overnight at 4°C and

secondary antibodies (1:10,000, GE Healthcare) for 1 h at room temperature (RT). Signals were detected using a chemiluminescence imaging system Fusion Solo (Vilber Lourmat).

Immunoprecipitation and co-immunoprecipitation

Immunoprecipitation (IP) or co-immunoprecipitation (CoIP) experiments were performed using RIPA-modified lysis buffer or CoIP lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1%, pH 7.4) complemented with protease and phosphatase inhibitors. One milligram of total proteins was precleared with protein A-sepharose and protein G-sepharose (50:50) immobilized beads (GE Healthcare) at 4°C for 1 h. Precleared supernatants were incubated with 5 µg of specific antibody or irrelevant IgG (Santa Cruz and SouthernBiotech) overnight at 4°C and then with fresh beads at 4°C for 1 h. Beads were collected and then washed 3 times successively with lysis buffer, lysis buffer plus NaCl 400 mM and lysis buffer. Samples were eluted in 2X Laemmli buffer and resolved by SDS-PAGE.

Click chemistry

Two-hundred micrograms of RIPA-modified cell lysis total proteins was methanol/chloroform precipitated and subjected to Click-It™ *O*-GlcNAc Enzymatic Labelling System (Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's instructions. GalNAz labeled samples were

subsequently chemically labeled with DBCO-PEG (4.4 kDa). O-GlcNAc mass tag with GalNAz-DBCO-PEG (4.4 kDa) was conducted as described in [25]. Briefly, 50 µg of GalNAz labelled proteins was methanol/chloroform precipitated and resuspended in HEPES 10 mM, SDS 1%, DTT 10 mM, pH 7.9 and incubated for 1 h with shaking. The, 100 mM final concentration of iodoacetamide was added and the reaction mix was further incubated for 1 h in the dark. Proteins were then methanol/chloroform precipitated and resuspended in 10 µL HEPES 10 mM, SDS 1%, pH 7.9. One µL of homemade DBCO-PEG (4.4 kDa) was added to 10 mM final concentration. Reaction mix was subsequently incubated for 1 h at RT with shaking. The excess of DBCO-PEG was then removed by methanol/chloroform precipitation. Proteins were resuspended in Laemmli buffer, boiled and resolved by SDS-PAGE.

Real time RT-qPCR

Total RNAs were isolated using the NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Two µg of total RNAs was reverse transcribed using Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Samples were subsequently analyzed by real time PCR on a MX3005P thermocycler (Agilent Technologies) using Maxima SYBR Green

qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) with the appropriate primer set (**Table S1**) according to the manufacturer's instructions. Data was normalized to expression level of corresponding *HPRT* following the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Mass spectrometry

Following resolution of immunopurified TS by SDS-PAGE and Coomassie Brilliant Blue staining, the band of interest was excised off the gel and TS was in-gel digested with trypsin, and released peptides were analyzed by high resolution mass spectrometry according to a previously published protocol [26]. Only the nanoLC gradient was modified: the peptide mixture was separated with a 120 min linear gradient from 96.8% to 80% buffer A/3.2% to 20% buffer B in 100 min (A: formic acid (FA) 0.1% in water, B: FA 0.1% in acetonitrile (ACN)), from 80% to 68% of A/20% to 32% of B in 20 min and then from 68% to 10% of A/32% to 90% of B in 2 min, held for 10 min and returned to the initial conditions in 1 min for 14 min. The total duration was set to 150 min at a flow rate of 300 nL/min. Proteins were identified by a database search using Sequest HT and Byonic with Proteome Discoverer 2.2 software (Thermo Scientific) against the Swissprot Homo sapiens database (20,368 entries). Precursor mass tolerance was set at 10 ppm and fragment mass tolerance was set at 0.02 Da, and up to 2 missed cleavages were allowed. Oxidation (M),

Oligonucleotide	Sequence	Annealing temperature (°C)
PCR, cloning and mutagenesis		
	5'-TGTGGTGGAATCTGCAGATATCATGCCAGTTGCCGGGTCTGAGTTGCCACGGCGCCCACTTCCCCAGCGGCT CAAGAGAGAGACGCTGAAACCCGACCGCCACACGCGTGAACCTCAATATCTTGCCAGATTGAGCATATCTTGCCTGTGGCTAAGAAAAATGACAGA ACAGGTACCGGACTTTGT CAGTCTTCGGTATGCAAGCAGATATAGCTTGAGGGACGAATTTCCACTTCTTCAACTAAGCGGCTTTTGGAAAGGGG TTCTGGAAGAGCTGCTCGGTTCAAAAAGTTCCACGAATGCAAAAGAACTGTCCTCTAAAGGGGTTAAGATTTGGGACGCTAACGGATCTAGGGATTT TCTGGATTCACTTGGCTTTTCTACCCGCGAGGAAGGTGATCTTGGCCGGGTACGGGTTCCAATGGCGGCAATTCGGGTGAGTATCGAGACATGGAG TCTGACTACAGCGGTCAAGGCGTAGATCAATTGAGCGGGTATCGATACCATAAAACAAACCAGACGATCGACGGATCATTATGTGTGCGTGAACCC CAGGGACTTCCGCTTATGCCCTCCCGCTGTCACGCGTGTGTCAATTTACGTCTCAATAGCGAACTGAGCTGTCAACTGTATCAAAGATCTGGCG ATATGGGCTTGGAGTTCCTTTAACATAGCTCATAACGCGCTCTGACATATATGATAGCACATATCACTGGTCTCAAACCCGGGATTTTCATCCATACACTC GGGGACGCGCACATATATCTAATCATATCGAACCGCTCAAAATCCAACCTCAACGCGAACCGAGGCCCTTTCCCAAACGCGGATACTAGGAAGGTAGA AAAGATTGACGATTTAAAGCGGAGGATTTCAAATCAGGGATATAACCCCAACCCACCATCAAGATGGAGATGCGCGTGGGTGTTCTGGTGACTAC AAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAAGTAGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAA-3'	
T251A Forward	5'-GTCCCCGAGTGCATGGATGAAATCGCCGGG-3'	
T251A Reverse	5'-CCCGGCGATTTCACTCATGCACTCGGGGAC-3'	
T306A Forward	5'-CATCTCCATCTTGATGGCGGGGTGGGGTTATATC-3'	
T306A Reverse	5'-GATATAACCCCAACCCGCGCATCAAGATGGAGATG-3'	
T306D Forward	5'-GCCATCTCCATCTTGATGTCGGGGTGGGGTTATATCC-3'	
T306D Reverse	5'-GGATATAACCCCAACCCGACATCAAGATGGAGATGGC-3'	
real time PCR		
OGT Forward	5'-TGGCTTCAGGAAGGCTATTG-3'	
OGT Reverse	5'-CAAGTCTTTGGATGTTTATATG-3'	56
TYMS Forward	5'-ATCATCATGTGCGCTTGGAAAT-3'	
TYMS Reverse	5'-TGTTCAACCATAGAACTGGCAGAG-3'	60
HPRT Forward	5'-GCCAGACTTGTGGATTG-3'	
HPRT Reverse	5'-CTCTCATCTAGGCTTTGATTTG-3'	56

Additional file 1. Table S1. Oligonucleotides used in this study.

acetylation (Protein N-terminus), phosphorylation (S, T, Y), HexNAc (S, T) and deamidation (N, Q) were set as variable modifications, and Carbamidomethylation (C) as a fixed modification. Proteins were filtered with a fixed value PSM validator and rank 1. Byonic Scores greater than 300 were only considered except when Sequest HT has validated the same MS/MS spectrum with a High XCorr.

TS activity

TS activity assay was measured according to the tritium-release assay described previously [27] with the following modification: 4×10^6 cells were lysed with assay buffer (Tris-HCl 50 mM, DTT 2 mM, pH 7.3), sonicated on an ice bed (3 times 10 s at 20 s intervals) and centrifuged (20,800×g, 30 min, 4°C). Twenty-five μL of the cytosolic fraction was incubated with 0.375 μCi [$5\text{-}^3\text{H}$]-dUMP (Isobio) and 0.62 mM CH_2FH_4 (Santa Cruz) in a total assay buffer volume of 55 μL at 37°C for 0, 10, 20 and 30 min. The reaction was stopped on an ice and the excess of [$5\text{-}^3\text{H}$]-dUMP was removed by addition of 300 μL of 15% activated charcoal containing 4% trichloroacetic acid. Samples were clarified by centrifugation at 14,000×g for 5 min at RT. Radiolabeled $^3\text{H}_2\text{O}$ formed during the reaction was measured by Ultima Gold™ liquid scintillation (PerkinElmer) with a Hidex 300 SL scintillation counter (Hidex).

Immunohistochemistry

Formalin fixed dissected colon tissues were embedded in paraffin wax by automatic sample preparation system (LOGOS One, Milestone). Histological sections (4 μm) were deparaffinized and rehydrated. Antigen retrieval was performed in Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 9 for anti-TS antibody [EPR4545] or Tris sodium citrate 10 mM pH 6 for anti-*O*-GlcNAc antibody using a pressure cooker. Endogenous peroxidase activity was blocked with BLOXALL® (Vector Laboratories) for 5 min at RT. After PBS washing, samples were blocked using 5% BSA/PBS 0.1% Tween for 30 min at RT. Slides were incubated overnight at 4°C with primary mouse anti-*O*-GlcNAc (1:1,000) or rabbit anti-TS (1:100). Samples were washed and incubated with the secondary antibody (mouse, 1:200 and rabbit, 1:100) and SignalStain® DAB (Cell Signaling). Slides were counterstained with hematoxylin and mounted in Aquatex® (Sigma-Aldrich). Images were acquired using Leica DM5500B (Leica Microsystems) light microscope analyzed with the Leica Application Suite software. Mucosal layers were photographed at x20 magnification. The assessment of staining was performed using ImageJ software and the IHC score was determined by multiplying the staining intensity score (low:1; medium:2 and high:3) by the percentage of the surface that was stained.

***In silico* modeling of TS structure**

The tridimensional structures of the human TS were retrieved from the Protein Data Bank (www.rcsb.org) under the PDB codes 1HZW (X-ray diffraction at 2.0 angstroms resolution) and 1I00 (X-ray diffraction at 2.5 angstroms resolution) [28]. The missing sequences M1-G29 and I307-V313 were built and added to the X-ray structure 1HZW. A conformational analysis of the whole structure was performed keeping the E30-T306 as aggregate. In the present case, Monte Carlo simulations seemed more convenient to us rather than Molecular Dynamics simulations [29]. Once the amino acids under study were modified, they were optimized within the protein using a classical Monte Carlo conformational searching procedure as described in the BOSS software [30]. In addition, an empirical potential energy was evaluated for the various post-translationally modified TS using the SPASIBA force field and the corresponding parameters, in particular for proteins and saccharides [31,32]. Stabilization energies of modified TS relative to unmodified TS were given. Molecular graphics and analysis were performed using Discovery Studio Visualizer, Biovia 2020 (Dassault Systèmes BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2020, San Diego, Dassault Systèmes, 2020).

Quantification and statistical analyses

All statistical analyses were performed with Prism 8. One-way ANOVA analysis was applied except for

Fig. 1G for which the Mann-Whitney test was used and Figs. 2A, 2D, 5B, 5C, S1B and S1C for which the unpaired Student's t test was used. Significance was defined as $P < 0.05$ *, $P < 0.01$ ** and $P < 0.001$ ***. The number of replicates and the meaning of error bars are described in the corresponding figure legends.

DECLARATIONS

Ethics approval

The study protocol was approved (APAFIS#1879-2018121918307521) by the Ethics Committee on Animal Experiments (CEEA) 75 Hauts-de-France.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

Microarray GSE104645 data are available in the Gene Expression Omnibus (GEO) repository, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/?acc=GSE104645>. All other data used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by the "Ligue Contre le Cancer/Comité du Nord/Comité de la Somme", the

Région Hauts-de-France (Cancer Regional Program), the University of Lille and the “Centre National de la Recherche Scientifique”. NV is the recipient of a fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”. The authors acknowledge the financial support from ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences and Health) within the framework of the cancer plan for Orbitrap mass spectrometer funding.

Authors’ contributions

NV designed, performed and analyzed *in vitro* and *in vivo* experiment data and co-wrote the manuscript. SH performed plasmid constructions and PEG synthesis and co-wrote the manuscript. AD contributed to the *in vivo* experiments. JKC contributed to the *in vivo* experiment design and the reviewing of the manuscript. JT contributed to the *in vivo* experiments. MD performed mice colonoscopy and contributed to the IHC experiments. AP performed mass spectrometry analyzes. GV performed TS structure modeling *in silico* analysis. CS performed microscopy acquisition of fluorescence images of immunocytochemistry experiments. TL contributed to discussions and reviewed the manuscript. VD contributed to the work design, the experiments, the data analysis and the reviewing of the manuscript. IEB supervised and conceptualized the research, contributed to the experiments and data analyzes, and co-wrote the

manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgments

We thank Dr. Guillemette Huet (CANTHER UMR9020 UMR1277, Lille, France) for HT-29 5F31 cell line [22], Dr. Mattwen G. Alteen (Department of Chemistry, Simon Fraser University, Canada) for Thiamet-G and Dr. Cyril Couturier (UMR8090 IBL, Lille, France) for pcDNA3.1-Ub-HA plasmid gifts.

Abbreviations

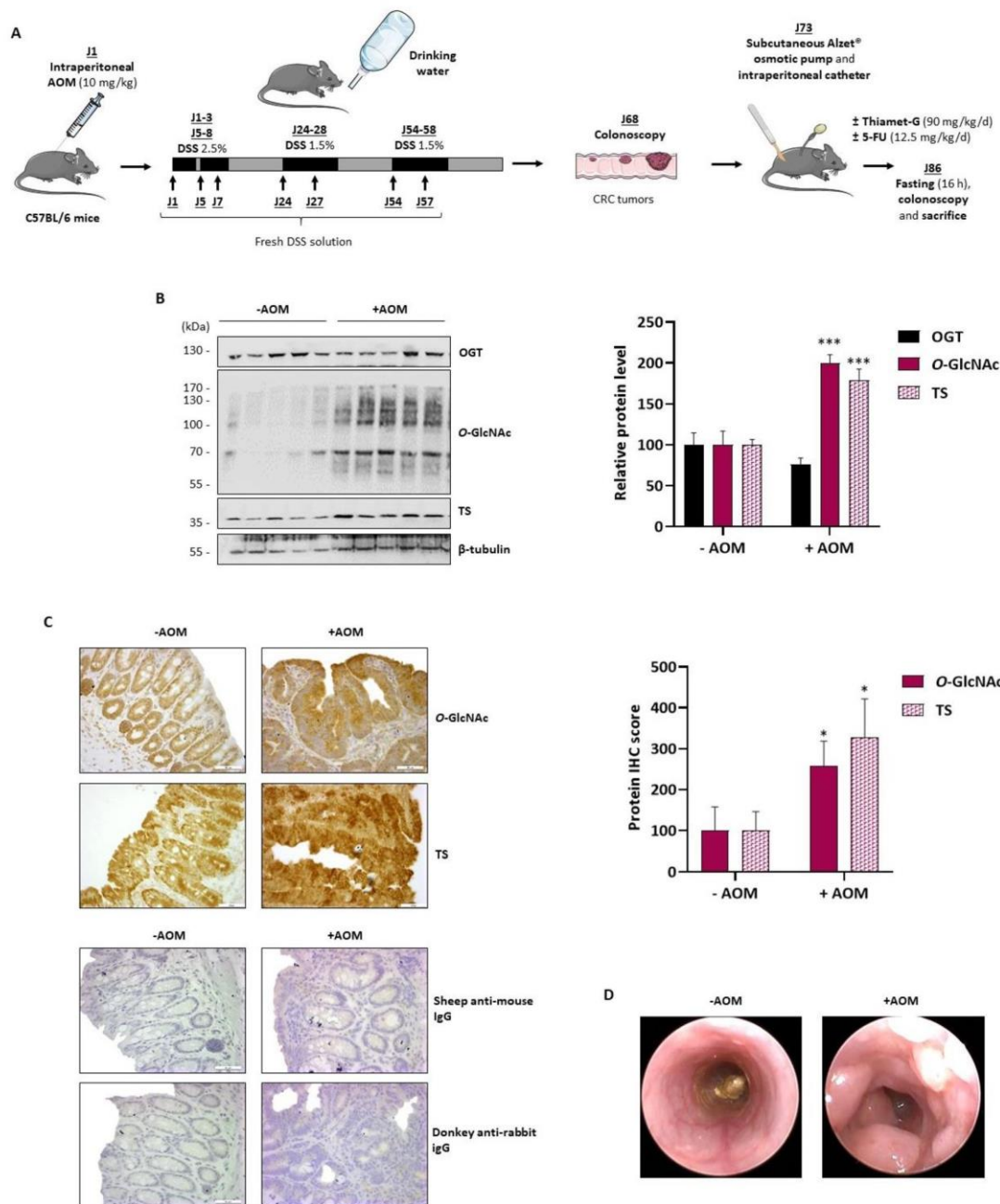
5,10-MTHF: 5,10-methylenetetrahydrofolate; 5-FU: 5-fluorouracil; AOM: Azoxymethane; CRC: Colorectal cancer; DHF: Dihydrofolate; DSS: Dextran sulfate sodium; dTMP: 2’-deoxythymidine-5’-monophosphate; dTTP: 2’-deoxythymidine-5’-triphosphate; dUMP: 2’-dexoyuridine-5’-monophosphate; FdUMP : 5-fluoro-2’-deoxyuridine-5’-monophosphate; *MGEA5*: *Meningioma Expressed Antigen 5*; OGA: *O*-GlcNAcase; OGT: *O*-GlcNAc transferase; TRAIL: Tumor necrosis factor related apoptosis-Inducing ligand; TS: Thymidylate synthase; *APC* : *Adenomatous Polyposis coli*; IDR: Intrinsically Disordered Region; hA: Amphipathic α -helix.

RESULTS

O*-GlcNAcylation potentiates CRC sensitivity to 5-FU chemotherapy *in vivo

To investigate the effect of *O*-GlcNAcylation on CRC progression and tumor response to 5-FU *in vivo*, we induced CRC in C57BL/6J mice using the AOM/DSS combination (**Fig. S1A**) that was shown to mimic a wide variety of tumors of all CRC consensus molecular subgroups [33]. Initiation and progression of CRC was checked by colonoscopy 10 weeks after AOM injection. Vehicle, 5-FU and/or Thiamet-G, a pharmacological inhibitor of OGA, was then delivered continuously using an osmotic pump for 13 days. Before sacrifice, tumor number and grade were analyzed and scored by colonoscopy (**Fig. S1A**). Consistent with the literature, immunoblotting and immunohistochemistry on these tissues showed that CRC tumors present a hyper-*O*-GlcNAcylation of proteins compared to healthy control tissues without affecting OGT levels (**Figs. S1B-D**). Interestingly, an elevated *O*-GlcNAcylation level was also accompanied by an increase in the amount of TS (**Figs. S1B and S1C**), suggesting that *O*-GlcNAcylation regulates the levels of this enzyme. More importantly, tumor number was reduced upon Thiamet-G or 5-FU treatment, compared to the control treatment and to a further extent in the AOM/DSS treated mice that received a combination of both drugs (**Figs. 1A and 1B**). We also observed less grade 1 tumors upon all three treatments demonstrating that Thiamet-G and

5-FU alone or in combination reduced the number of low-grade tumors (**Fig. 1C**). Furthermore, only combined treatment reduced the number of grade 4 and 5 tumors (**Fig. 1C**). Thiamet-G and 5-FU alone or in combination decreased the percentage of mice with grade 5 tumors and increased those with grade 3 and 4. The percentage of grade 3 tumors was higher in co-treatment condition than in Thiamet-G or 5-FU treatment alone (**Fig. 1D**), suggesting that the combination of 5-FU and Thiamet-G further delays the progression of the disease. In AOM/DSS treated mice, Thiamet-G treatment triggered an increase of global *O*-GlcNAcylation in CRC tumors (**Fig. 1E**). This *O*-GlcNAc increase was associated with a decrease in OGT levels (**Fig. 1E**) suggesting a compensatory mechanism as previously reported by [34]. Elevation of *O*-GlcNAcylation was also accompanied with a tendency of increased TS levels (**Figs. 1E and 1F**). As expected and previously referenced [35], we observed the heavy TS isoform (38 kDa) complexed with 5,10-MTHF and FdUMP confirming 5-FU incorporating into CRC tissue (**Fig. 1E**). 5-FU treatment led to a decrease of global *O*-GlcNAcylation without affecting OGT levels (**Fig. 1E**). Interestingly, the Thiamet-G induced increase in *O*-GlcNAcylation returned close to control levels upon 5-FU co-treatment in CRC tumors (**Fig. 1E**) and more precisely in the epithelium (**Fig. 1F**). TS levels were further increased in co-treatment condition compared to the 5-FU condition alone (**Figs. 1E and 1F**). Thus, our



Additional file 2: Figure S1. AOM/DSS-induced carcinogenesis increases O-GlcNAcylation and TS levels in colorectal tumors.

(A) Schematic representation of AOM/DSS-induced CRC, colonoscopy and drug treatment protocols. **(B)** Effect of AOM/DSS treatment on OGT, O-GlcNAcylation and TS levels was evaluated by WB with indicated antibodies (left panel). Densitometric analysis (right panel). Data is mean \pm SEM, $n \geq 5$. **(C)** Immunohistochemistry of normal (-AOM) and tumor (+AOM) tissues. Samples were stained with indicated antibodies (left panel). Scale bars = 50 μ m. Staining intensity analysis in epithelial cells and scoring (right panel). Data is mean \pm SEM, $n = 3$. **(D)** Representative endoscopic images of colon tissues.

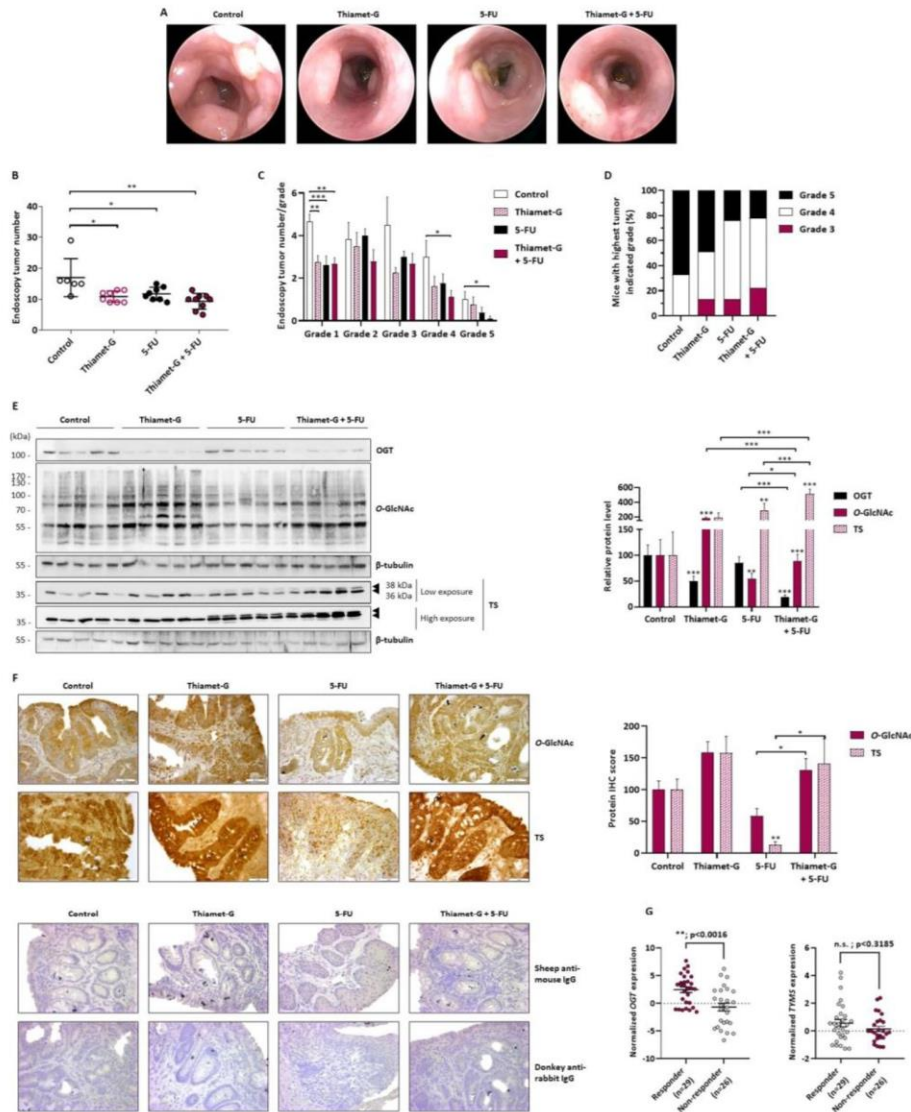


Figure 1. O-GlcNAcylation sensitizes CRC to 5-FU chemotherapy *in vivo*.

(A-F) Colorectal tumors were induced by AOM/DSS and continuously treated with Thiamet-G (90 mg/kg/d) and/or 5-FU (12,5 mg/kg/d) during 13 days. Colonoscopy was performed before sacrifice. (A) Representative endoscopic images of tumors. (B) Quantification of tumor number as observed by endoscopy. Data is median \pm SEM, $n \geq 6$. (C) Quantification of tumor number by grade as observed and scored by endoscopy. Data is mean \pm SEM, $n \geq 6$. (D) Histogram quantification of percentage of mice with the tumor indicated highest grade. (E) Levels of OGT, O-GlcNAcylation and TS in tumors. Samples were immunoblotted with indicated antibodies (left panel). Densitometric analysis (right panel). Data is mean \pm SEM, $n \geq 6$. (F) Immunohistochemistry of O-GlcNAcylation and TS in tumors. Samples were stained with indicated antibodies. Scale bars = 50 μ m. Staining intensity analysis in epithelial cells and scoring (right panel). Data is mean \pm SEM, $n \geq 3$. (G) Expression levels of OGT and TYMS in responder and non-responder metastatic CRC patients treated with first line 5-FU-based chemotherapy from microarray dataset GSE104645. Data was normalized by the percentile shift (all samples were normalized to the signal value of 75th percentile of all of probes on the microarray) and the scaling (all genes were normalized to the median of all samples). Data is median \pm SEM.

in vivo data suggest a cross-talk between *O*-GlcNAcylation and 5-FU metabolism, and a sensitizing effect of *O*-GlcNAcylation to 5-FU cytotoxicity in CRC possibly by increasing TS protein levels. Finally, we examined the relevance of this data in the human physiopathology by analyzing the *OGT* and *TYMS* mRNA expression profiles of metastatic CRC patients treated with first line 5-FU-based chemotherapy from the microarray dataset GSE104645 [36] (**Fig. 1G and Table S2**). Interestingly, while *TYMS* expression was not correlated to chemotherapy response in this cohort, the level of *OGT* mRNA was significantly higher in responders compared to non-responder patients (**Fig. 1G**).

5-FU decreases cellular *O*-GlcNAcylation *in vitro*

In order to decipher the relationship between *O*-GlcNAcylation, TS and cellular response to 5-FU, we first investigated levels of *OGT*, *O*-GlcNAcylation and TS in CCD 841 CoN a non-cancerous colon cell line compared to HT-29 a cancerous one. As expected, levels of *OGT*, global *O*-GlcNAcylation and TS were increased in cancer cells compared to non-cancerous cells (**Fig. 2A**). We next investigated efficiency of 5-FU to reduce viability of both cell lines by treatment with increasing concentrations of 5-FU. CCD 841 CoN and HT-29 cells showed an IC_{50} value of $21.79 \mu\text{M} \pm 0.92$ and $9.84 \mu\text{M} \pm 1.71$ for 5-FU respectively (**Figs. 2B and S2A**). CCD 841 CoN cells were less sensitive to S-phase dependent 5-FU cytotoxicity than HT-29 cells most likely due to

their very low growth rate (**Figs. S2B and S2C**). In all subsequent experiments, we treated both cell lines with a sub- IC_{50} 5-FU concentration of $6 \mu\text{M}$, which induced S-phase arrest within 24 h and apoptosis at 72 h in HT-29 cells (**Figs. S2B and S2C**). Next, we investigated the effect of 5-FU treatment on *OGT* and *O*-GlcNAcylation levels. Upon 24 h of treatment, 5-FU led to decreased *O*-GlcNAcylation of proteins (**Fig. 2C**) concurrent with a decrease of both *OGT* mRNA (**Fig. 2D**) and protein (**Fig. 2C**) levels in both cell lines. These results indicate that 5-FU affects *O*-GlcNAcylation by decreasing *OGT* at a transcriptional level in non-cancerous and cancerous colon cells.

***O*-GlcNAcylation modulates sensitivity to 5-FU and TS activity in colon cancer cells**

Next, we wondered whether *O*-GlcNAcylation could impact sensitivity to 5-FU by regulating TS. First, we controlled the downregulation of *OGT* by siRNA leading to a decrease in TS and in the global protein *O*-GlcNAcylation (**Fig. 3A**). In CCD 841 CoN cells, *OGT* knockdown drastically reduced free and FdUMP complexed TS levels (**Fig. 3A**) and cellular activity (**Fig. 3B**) by approximately 75%, but only in untreated cells. However, 5-FU or downregulation of *OGT* did not affect cell cycle progression in CCD 841 CoN cells (**Figs. 3C**). In HT-29 cells, si*OGT* treatment led to a drastic decrease of TS levels (**Figs. 3A**) and cellular activity in control and 5-FU treatment conditions (**Fig. 3B**). *OGT* knockdown did not regulate the expression of TS at an mRNA level

		Responder n=29	No responder n=26
Age	Median	63.9	63.4
	Range	51-77	32-83
Gender	Male	69% (n=20)	62% (n=16)
	Female	31% (n=9)	38% (n=10)
Stage at diagnosis	I	3% (n=1)	0% (n=0)
	II	7% (n=2)	8% (n=2)
	III	24% (n=7)	35% (n=9)
	IV	66% (n=19)	58% (n=15)
Primary site	Colon	52% (n=15)	46% (n=12)
	Rectum	48% (n=14)	54% (n=14)
Adjuvant chemotherapy	Yes	31% (n=9)	31% (n=8)
	No	69% (n=20)	69% (n=18)
1st-line chemotherapy regimens	FOLFOX	86% (n=25)	81% (n=21)
	FOLFIRI	14% (n=4)	19% (n=5)
Best response of 1st-line chemotherapy	Progressive disease	-	23% (n=6)
	Stable disease	-	77% (n=20)
	Partial response	97% (n=28)	
	Complete response	3% (n=1)	

Additional file 3: Table S2. Clinical characteristics of GSE104645 cohort metastatic CRC patients.

Age, gender, stage at diagnosis, primary site, adjuvant chemotherapy, 1st-line chemotherapy regimens, and best response of 1st-line chemotherapy are indicated.

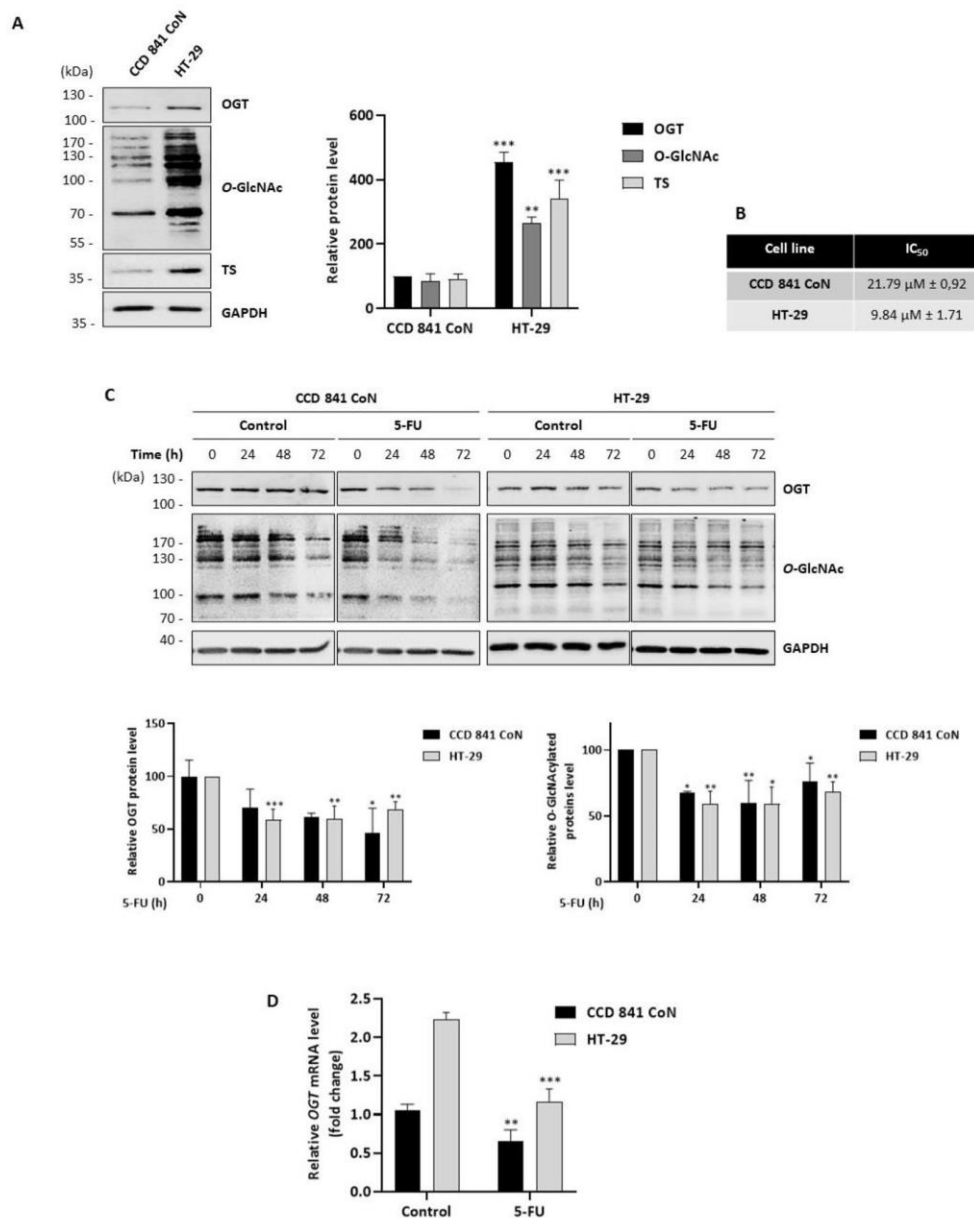
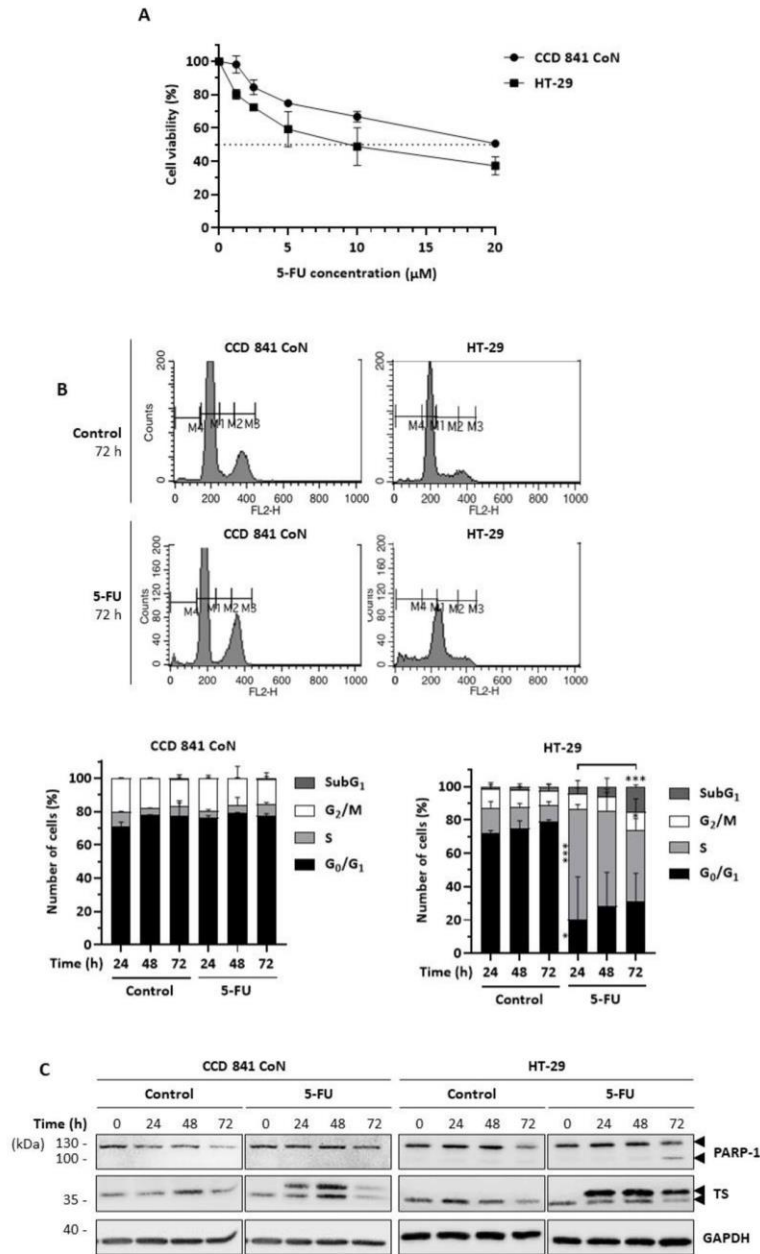


Figure 2. 5-FU decreases OGT and O-GlcNAcylation levels in non-cancerous and cancerous cells.

(A) OGT, O-GlcNAcylation and TS protein levels in CCD 841 CoN and HT-29 cells. Samples were immunoblotted with indicated antibodies (left panel). Densitometric analysis (right panel). **(B)** 5-FU IC₅₀ values for CCD 841 CoN and HT-29 cells as determined by the MTS assay. Cells were treated 48 h by increasing concentrations of 5-FU ranging from 0 to 20 μ M. **(C)** Effect of 5-FU on OGT, O-GlcNAcylation and TS protein levels. Cells were treated with or without 5-FU (6 μ M) for 0, 24 h, 48 h or 72 h. Samples were immunoblotted with indicated antibodies (top panel). Densitometric analysis (bottom panel). **(D)** Effect of 5-FU on OGT expression. Gene expression levels of OGT were determined by RT-qPCR in cells treated with or without 5-FU (6 μ M) for 72 h. Data is expressed as relative expression. **(A-D)** Data is mean + SD, n=3.



Additional file 4: Figure S2. 5-FU inhibits cancer cell growth by cell cycle blockage and apoptosis induction.

(A) Dose response curve to 5-FU treatment. CCD 841 CoN and HT-29 cells were treated by increasing concentrations of 5-FU ranging from 0 to 20 μM . Data is mean \pm SD, $n=3$. (B-C) CCD 841 CoN and HT-29 cells were treated with or without 5-FU (6 μM) for 0, 24 h, 48 h or 72 h. (B) Cell cycle distribution analysis. Flow cytometry histogram (top panel). Quantification of cell number in each phase of cell cycle (bottom panel), data is mean \pm SD, $n=3$. (C) Apoptosis induction as assessed by PARP-1 cleavage. Samples were immunoblotted with the indicated antibodies.

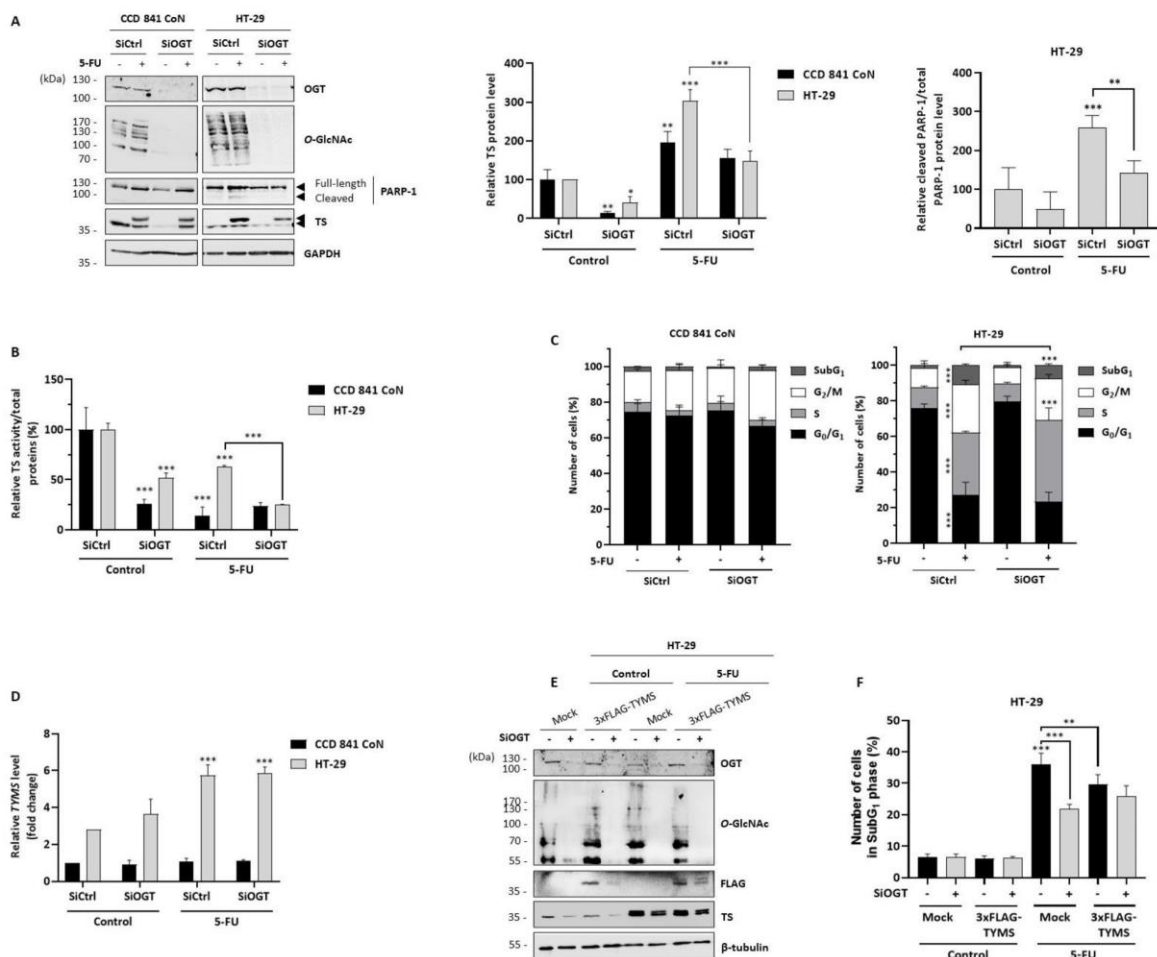
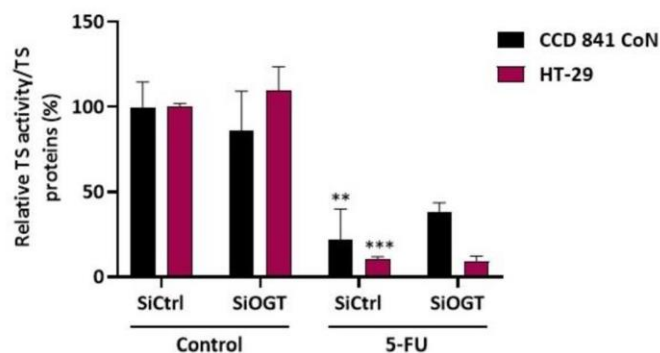


Figure 3. Knockdown of *OGT* reduces 5-FU sensitivity of cancer cells by decreasing TS target levels.

(A-D) Cells were transfected with control or *OGT* siRNA (siCtrl or siOGT; 10 nM). Then, 24 hours later, cells were co-treated with or without 5-FU (6 μM) for 72 h. (A) Effects of siOGT and 5-FU treatments on OGT, O-GlcNAcylation, PARP-1 and TS levels were evaluated by WB (left panels). Densitometric analysis (right panels). Data is mean ± SD, n=3. (B) Effect of siOGT and 5-FU treatments on cellular TS activity was analyzed by radioactive tritium-release assay. Data is mean ± SD, n=3. (C) Effect of siOGT and 5-FU treatments on cell cycle distribution was analyzed by FACS after propidium iodide incorporation. Data is mean ± SD, n=4. (D) Effect of siOGT and 5-FU treatment on TS transcriptional levels. Gene expression level of *TYMS* was determined by RT-qPCR and data are represented as relative expression. Data is mean ± SD, n=3. (E-F) Effect of TS overexpression on siOGT-regulated apoptosis in HT-29 cells. HT-29 cells were first transfected with indicated siRNA. After 24 h, cells were transfected with the indicated constructs and treated with 5-FU (6 μM) for 72 h prior to lysis. (E) PARP-1, O-GlcNAcylation, TS-3xFLAG and TS WB (left panel). Densitometric analysis (right panel). Data is mean ± SD, n=3. (F) SubG₁ apoptotic cell population was analyzed by FACS after propidium iodide incorporation. Data is mean ± SD, n=4.



Additional file 5. Figure S3. Effect of *O*-GlcNAcylation on TS intrinsic activity.

Cells were transfected with control or *OGT* siRNA (siCtrl or siOGT; 10 nM) then, 24 h later, were co-treated or not with 5-FU (6 μM) for 72 h. Effect of siOGT and 5-FU treatments on intrinsic TS activity was analyzed by a radioactive tritium-release assay that was normalized to TS protein amount. Densitometric analysis. Data is mean ± SD, n=3.

neither in control nor in 5-FU conditions in both cell lines (**Fig. 3D**), suggesting that the regulation would occur at the protein level. Of note, treatment with siOGT did not modulate neither intrinsic TS activity (**Fig. S3**) nor TS subcellular localization (**data not shown**) in both cell lines. Furthermore, 5-FU treatment of HT-29 cells induced S-phase arrest and apoptosis as observed by the increase of sub-G₁ phase cell population (**Fig. 3C**) and the PARP-1 cleavage (**Fig. 3A**). Interestingly, HT-29 cell apoptosis was reduced by more than 30% upon *OGT* knockdown (**Figs. 3A and 3C**) suggesting that reduced *O*-GlcNAcylation would counteract sensitivity to 5-FU possibly by decreasing the amount of TS. We then hypothesized that increasing TS levels would counteract siOGT effects on HT-29 cell sensitivity to the drug. We showed that overexpression of 3xFLAG tagged TS (**Fig. 3E**) rendered HT-29 cells resistant to 5-FU (**Fig. 3F**).

Moreover, siOGT decreased both endogenous and 3xFLAG tagged TS levels confirming that *O*-GlcNAcylation regulates TS protein levels in a transcription independent manner. Indeed, the reduction of sensitivity to 5-FU induced by siOGT was counteracted by the overexpression of recombinant 3xFLAG tagged TS (**Figs. 3E and 3F**). Together, our data showed that the knockdown of *OGT* lowered 5-FU sensitivity of cancer cells by decreasing TS levels and consequently its activity. Next, we asked whether TS was regulated by *O*-GlcNAcylation.

TS interacts with OGT and is *O*-GlcNAcylated

We hypothesized that GlcNAc precursors, glucose and glucosamine (GlcNH₂), regulate *O*-GlcNAcylation and TS levels (**Fig. 4A**). First, we

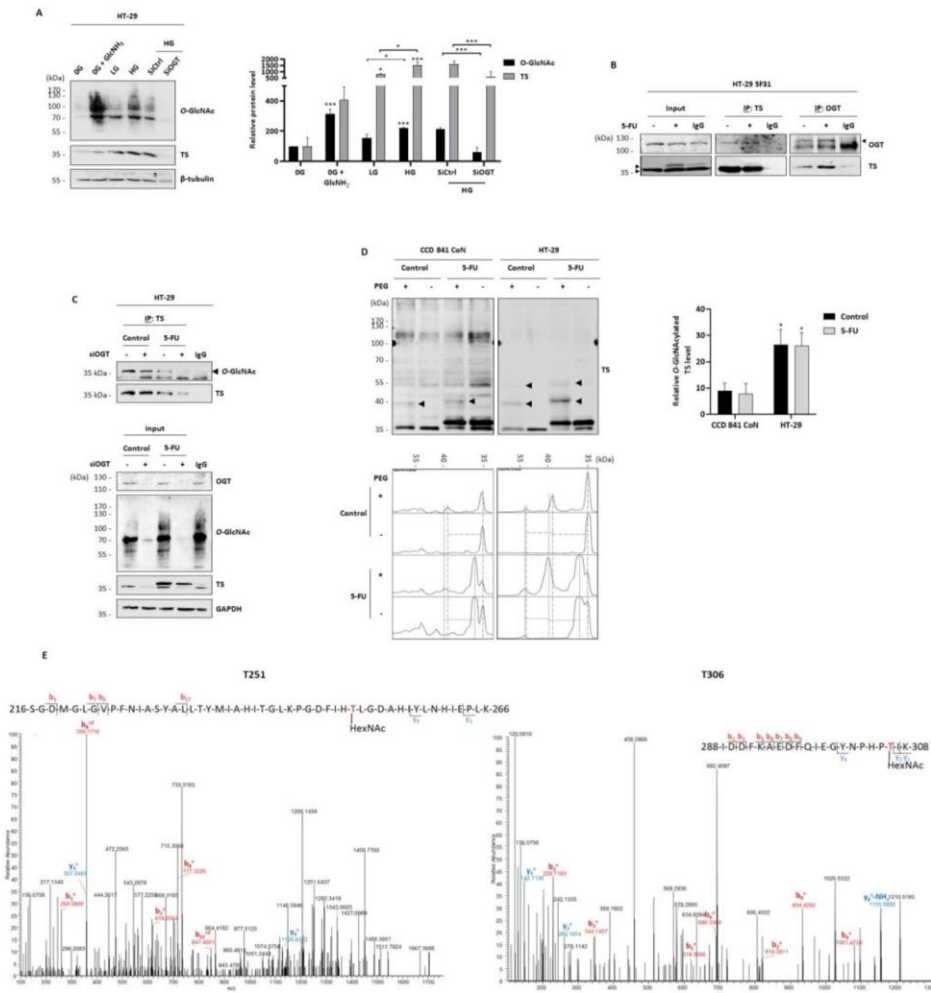


Figure 4. OGT interacts with and O-GlcNAcyates TS.

(A) O-GlcNAcylation regulates TS protein levels. Prior to conducting the experiment, HT-29 cells were grown in low glucose (LG, 5 mM) medium for 60 h, then in medium without glucose (OG) supplemented with or without glucosamine (GlcNH₂, 5 mM) or LG or high glucose (HG, 25 mM) medium for 12 h. In transfection experiment cells were transfected in LG medium with control or OGT siRNA (siCtrl or siOGT; 10 nM) and, 24 h later, grown in HG medium during the last 48 hours. Samples were immunoblotted with indicated antibodies (left panel). Densitometric analysis (right panel). Data is mean ± SD, n=3. **(B-D)** Cells were treated with or without 5-FU (6 μM) for 48 h. **(B)** OGT interacts with TS. TS and OGT were co-immunoprecipitated from HT-29 5F31 lysates and samples were immunoblotted with indicated antibodies. **(C)** OGT O-GlcNAcyates TS. HT-29 cells were transfected with siCtrl or siOGT (10 nM) and, 24 h later, incubated with or without 5-FU (6 μM) for 72 h. TS was immunoprecipitated from HT-29 cell lysates and samples were immunoblotted with indicated antibodies. **(D)** O-GlcNAc stoichiometry of TS. CCD 841 CoN and HT-29 cell lysates were O-GlcNAc mass tagged by click-chemistry using a PEG tag of 4,4 kDa. Samples were immunoblotted for TS (top left panel). Densitometric curves are shown in bottom left panel and densitometric analyses are presented in top right panel. Data is mean ± SD, n=2. **(E)** TS is O-GlcNAcylated at T251 and T306. HT-29 and HT-29 5F31 cells were treated with Thiamet-G (2 μM) for 48 h. HCD-MS/MS spectrum of peptides covering the T251 and T306 O-GlcNAcylated sites of TS. The modification sites on TS are indicated in red in the peptide sequence.

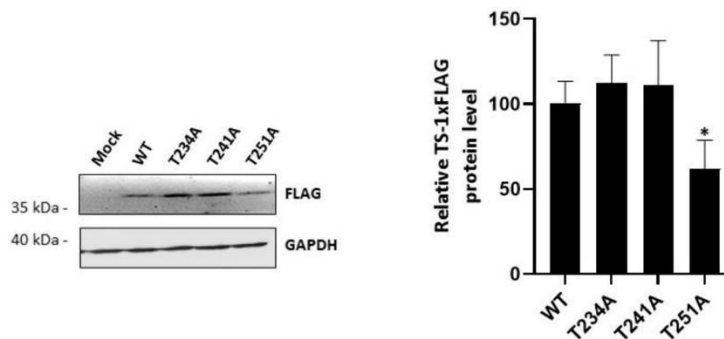
confirmed that in HT-29 cells *O*-GlcNAcylation levels are lowered or barely detectable under low glucose (LG, 5 mM) or no glucose (OG) conditions respectively. Also, highly reduced *O*-GlcNAcylation levels could be restored by complementing OG media with GlcNH₂ (**Fig. 4A**). Conversely, high glucose media (HG, 25 mM) enhanced *O*-GlcNAcylation levels compared to LG condition (**Fig. 4A**). TS levels were highly decreased under glucose deprivation, and were partially restored by GlcNH₂ treatment. Interestingly, TS levels correlated to *O*-GlcNAcylation levels. More notably, reduced glucose levels led to a decrease in TS content compared to the *OGT* knockdown condition (**Fig. 4A**). These results indicate that TS expression level is impacted by *O*-GlcNAcylation in a nutrient dependent manner in HT-29 cells. We performed a set of experiments to get more insight on the *O*-GlcNAcylation of TS. First, co-immunoprecipitation experiments in HT-29 5F31 cells that highly express TS proteins [22] showed that *OGT* interacts with TS in both the control and 5-FU treated cells (**Fig. 4B**). Immunoblotting of immunopurified TS from HT-29 cells lysate with a pan anti-*O*-GlcNAc antibody revealed that the enzyme is modified by *O*-GlcNAcylation. The decrease of the signal upon silencing of *OGT* supports this observation (**Fig. 4C**). Interestingly, while si*OGT* drastically decreased total TS proteins (input), it only slightly affected

O-GlcNAcylation of immunoprecipitated TS suggesting that this PTM is abundant and/or stable, and may have a major impact on TS protein levels. We then performed *O*-GlcNAc mass tag experiments using a 4.4 kDa PEG to monitor the TS *O*-GlcNAc stoichiometry in CCD 841 CoN and HT-29 cells. In both cell lines, we observed a PEGylated-*O*-GlcNAc-TS isoform with an apparent molecular weight shift of + 4-5 kDa showing that TS is the recipient of one *O*-GlcNAcylation (**Fig. 4D**). In HT-29 cells, a second PEGylated-*O*-GlcNAc-TS isoform bearing 4 *O*-GlcNAc was also detected as shown by an apparent molecular weight shift of + 17-18 kDa. Interestingly, PEG-*O*-GlcNAc-TS underwent an extra shift upon 5-FU treatment revealing that the complexed TS isoform is also *O*-GlcNAcyated in the two cell lines. We also noted that TS *O*-GlcNAcylation levels were higher in cancer cells (27% of total TS) compared to non-cancerous cells (9%) and that 5-FU did not significantly affect the *O*-GlcNAcyated stoichiometry of TS (**Fig. 4D**). To further document the *O*-GlcNAcylation of TS, we mapped its PTMs by HCD-MS/MS in HT-29 and HT-29 5F31 cells treated with Thiamet-G to stabilize *O*-GlcNAcylation. We identified two *O*-GlcNAcyated sites at T251 and T306 (**Table S3, Figs. 4E and S4**), along with two phosphorylated sites at S114 and T170 (**Table S3, Fig. S5**). Interestingly, our data also confirmed the previously described [37] phosphorylation at T306

Modification Position in Protein	Peptide Sequence	Modifications	# PSMs	Peptide Position in Protein	# Missed Cleavages	Charge	m/z [Da]	MH+ [Da]	Theo. MH+ [Da]	Confidence Bionic	Bionic Score	Bionic Delta Mod Score	Confidence Sequest HT	Xcorr Sequest HT
S114	[K]IWDANGSRDFLDSLGFSTR.[E]	S7(Phospho)	4	108-126	1	3	746.33881	2237.0019	2337.00229	High	625	171.1	High	4.15
T170	[K]INPDDRRIMCAWNPRL.[D]	T1(Phospho); C11(Carbamidomethyl)	2	170-185	2	3	698.97766	2094.9184	2094.93614	High	143.1	128	High	3.06
T234/T241/T251	[R]SGDMGLGVPFNIAASYALLTYMIAHITG LKPGDFIHLGDAHYLNHIEPLK.[I]	T19/T26/T36(HexNAc)	1	216-266	1	5	1148.5953	5738.9474	5737.9436	High	609.7	0	-	-
T306	[K]IDDFKAEDFQIEGYNPHPIK.[M]	T19(Phospho)	4	288-308	1	3	853.06232	2557.1724	2557.16466	High	293	225.2	High	3.3
T306	[K]IDDFKAEDFQIEGYNPHPIK.[M]	T19(HexNAc)	1	288-308	1	4	670.82941	2680.2958	2680.2777	High	433.4	373.4	Medium	1.87

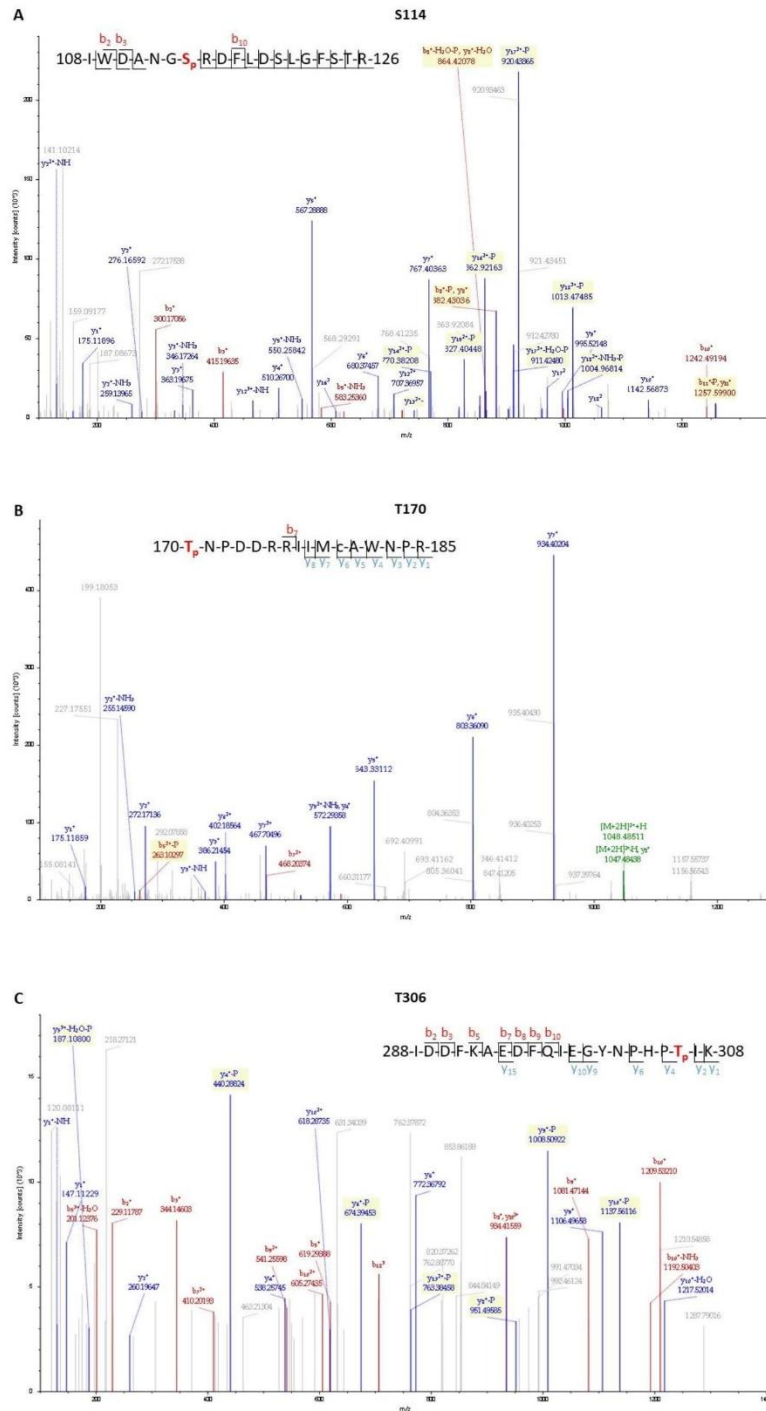
Additional file 6. Table S3. Post-translational modifications identified on TS.

HT-29 and HT-29 5F31 cells were treated with Thiamet-G (2 μ M) for 48 h prior lysis in RIPA buffer containing Thiamet-G (2 μ M). Summary table of PTMs identified on TS by HCD-MS/MS mass spectrometry: the modification position, the peptide sequence, the number of peptide spectrum matches (PSMs), the number of missed cleavages, the charge ion of the precursor ion of MS/MS spectrum, the experimental and theoretical peptide mass (Theo. MH+), the confidence, identification score and modification localization (Delta Mod) score using Bionic search engine, and the confidence and Xcorr value of identification with the Sequest HT search engine.



Additional file 7. Figure S4. TS protein level is decreased by the single-point mutation at putative O-GlcNAcylated T251 but not at T234 and T241 adjacent sites.

Expression level of putative O-GlcNAc-TS mutants. HT-29 cells were transfected with empty pcDNA3.1 (mock), pcDNA3.1-1xFLAG-TYMS or the indicated mutants (1 μ g) for 48 h. TS-FLAG proteins were detected by WB with the anti-FLAG antibody (left panel). Densitometric analysis (right panel). Data is mean \pm SD, n=4.



Additional file 8. Figure S5. Phosphorylation sites identified on TS.

HT-29 and HT-29 5F31 cells were treated with Thiamet-G (2 μ M) for 48 h prior lysis in RIPA buffer containing Thiamet-G (2 μ M). HCD-MS/MS spectra of peptides covering the S114 (A), T170 (B) and T306 (C) phosphorylated sites of TS. The modification sites are indicated in red in peptide sequence.

suggesting a reciprocal phosphorylation/*O*-GlcNAcylation interplay on this residue.

***O*-GlcNAcylation increases TS stability by preventing its proteasomal degradation**

Since OGT and *O*-GlcNAcylation are known to control protein expression and stability [38], we investigated the putative regulation of TS stability by *O*-GlcNAcylation. To further investigate the function of *O*-GlcNAcylation on TS behavior, we generated a series of mutants for the *O*-GlcNAcylated sites (T251A, T306A and T251A/T306A) (Fig. 5A). Two phosphomimetic mutants at T306 were also engineered (T306D and T251A/T306D). When expressed in HT-29 cells, the level of the T251A mutant was reduced by about 45% compared to the wild type. Neither the substitution of T306 to alanine (T306A) nor to aspartic acid (T306D) affected the TS expression levels compared to the wild type. Interestingly, the double mutant T251A/T306A exhibited a strongly decreased-level of about 75% that was restored close to wildtype levels for the double mutant T251A/T306D (Fig. 5A). Altogether, this data suggests that *O*-GlcNAcylation at T251 and phosphorylation/*O*-GlcNAcylation interplay at T306 to control TS protein levels. We then performed a time-course experiment in which HT-29 cells were treated with cycloheximide with or without Thiamet-G to analyze TS amounts (Fig. 5B). Upon protein synthesis inhibition, TS levels sharply

decreased. Twenty-eight hours after treatment with cycloheximide, only 10% of total TS remained detectable, while cells co-treatment with Thiamet-G exhibited about 20% of total TS levels (Fig. 5B). This data showed that forced-enhancement of *O*-GlcNAcylation increased TS lifetime. We then analyzed TS amounts after cell treatment with siOGT with or without the proteasome inhibitor MG132 (Fig. 5C). The reduction of TS levels induced by *OGT* knockdown was partially restored upon MG132 treatment indicating that *O*-GlcNAcylation protects TS from proteasomal degradation in an ubiquitin-independent manner [39,40] (Figs. 5C and 5E). Furthermore, we observed that MG132 treatment was able to restore the protein levels of T251A and T251A-T306A mutants, reinforcing the involvement of *O*-GlcNAcylation in the protection of TS toward proteasomal degradation of TS (Fig. 5D). Our results revealed that *O*-GlcNAcylation of TS at T251 and *O*-GlcNAcylation/phosphorylation interplay at T306 to regulate proteasomal degradation and stability of the enzyme. In order to assess the effect of PTM in TS stability, full human TS protein was modeled (Fig. 6A) and empirical potential energies of stabilization (ΔE) of modified TS have been calculated (Fig. 6B). The result indicated that *O*-GlcNAcylation at T306 slightly increased the stability of TS ($\Delta E = -5.8 \text{ kcal.mol}^{-1}$) while phosphorylation at T306 and *O*-GlcNAcylation at T251 similarly and strongly stabilized TS ($\Delta E = -29.7$ and $-32.5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ respectively). In

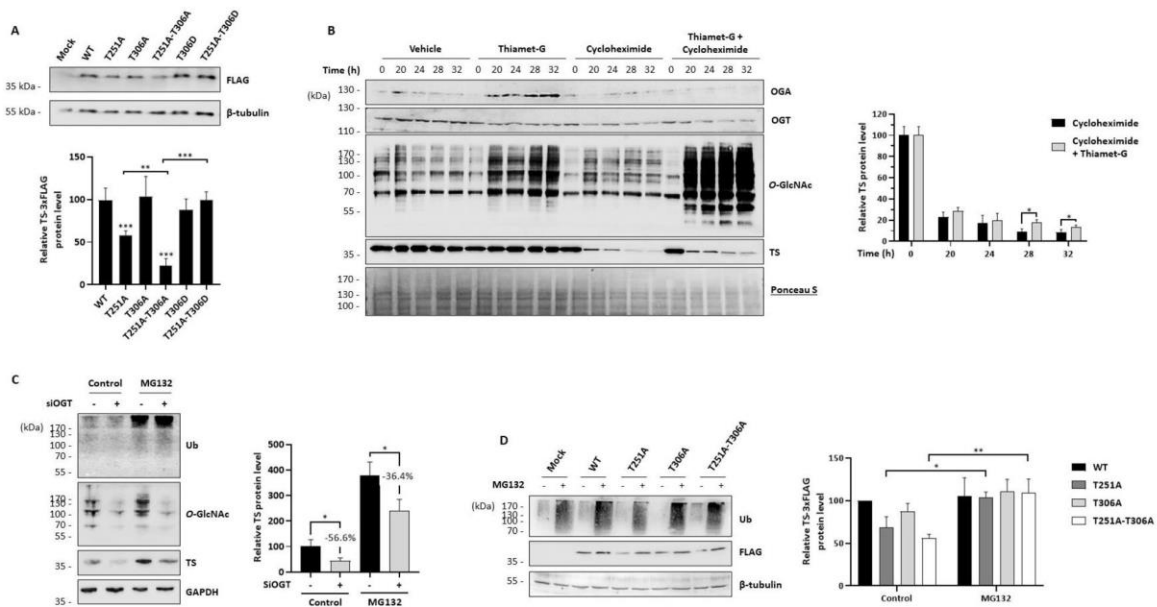
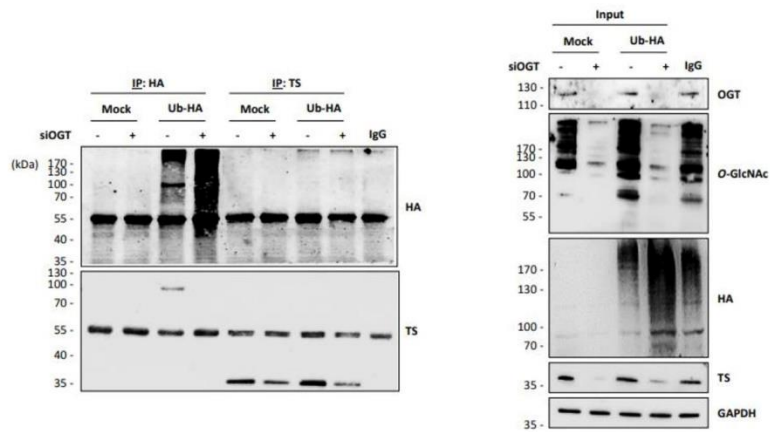


Figure 5. *O*-GlcNAcylation at T251 and T306 increases TS stability by preventing its proteasomal degradation.

(A) Expression levels of *O*-GlcNAc-TS mutants. HT-29 cells were transfected with empty pcDNA3.1 (mock), pcDNA3.1-3xFLAG-TYMS or the indicated mutant (1 μ g) for 48 h. TS-FLAG proteins were detected by WB with the anti-FLAG antibody (top panel). Densitometric analysis (bottom panel). Data is mean \pm SD, n=4. **(B)** *O*-GlcNAcylation increases TS stability. HT-29 cells were treated or not with Thiamet-G (2 μ M) and/or cycloheximide (90 μ g/mL) for 0, 20 h, 24 h, 28 h or 32 h. Samples were immunoblotted with indicated antibodies (left panel). Densitometric analysis (right panel). Data is mean \pm SD, n=3. **(C)** *OGT* knockdown induced-TS decrease is dependent on proteasomal degradation. HT-29 cells were transfected with control or *OGT* siRNA (siCtrl or siOGT, 10 μ M) and then, 84 h later, treated or not with MG132 (10 μ M) for 12 h prior lysis. Samples were immunoblotted with indicated antibodies (left panel). Densitometric analysis (right panel). Data is mean \pm SD, n=3. **(D)** Expression level of TS-*O*-GlcNAc mutants under proteasome inhibition. HT-29 cells were transfected with the indicated construct and then, treated or not after 36 h with MG132 for 12 h prior lysis. Samples were immunoblotted with indicated antibodies (left panel). Densitometric analysis (right panel). Data is mean \pm SD, n=3.



Additional file 9. Figure S6. O-GlcNAcylation does not regulate the TS ubiquitination.

HT-29 cells were transfected with indicated constructs (1 μ g) and control or *OGT* siRNA (siCtrl or siOGT, 10 μ M) and then, 84 h later, treated or not with MG132 (10 μ M) for 12 h prior lysis in RIPA buffer containing MG132 (10 μ M). Samples were immunoprecipitated and immunoblotted with the indicated antibodies.

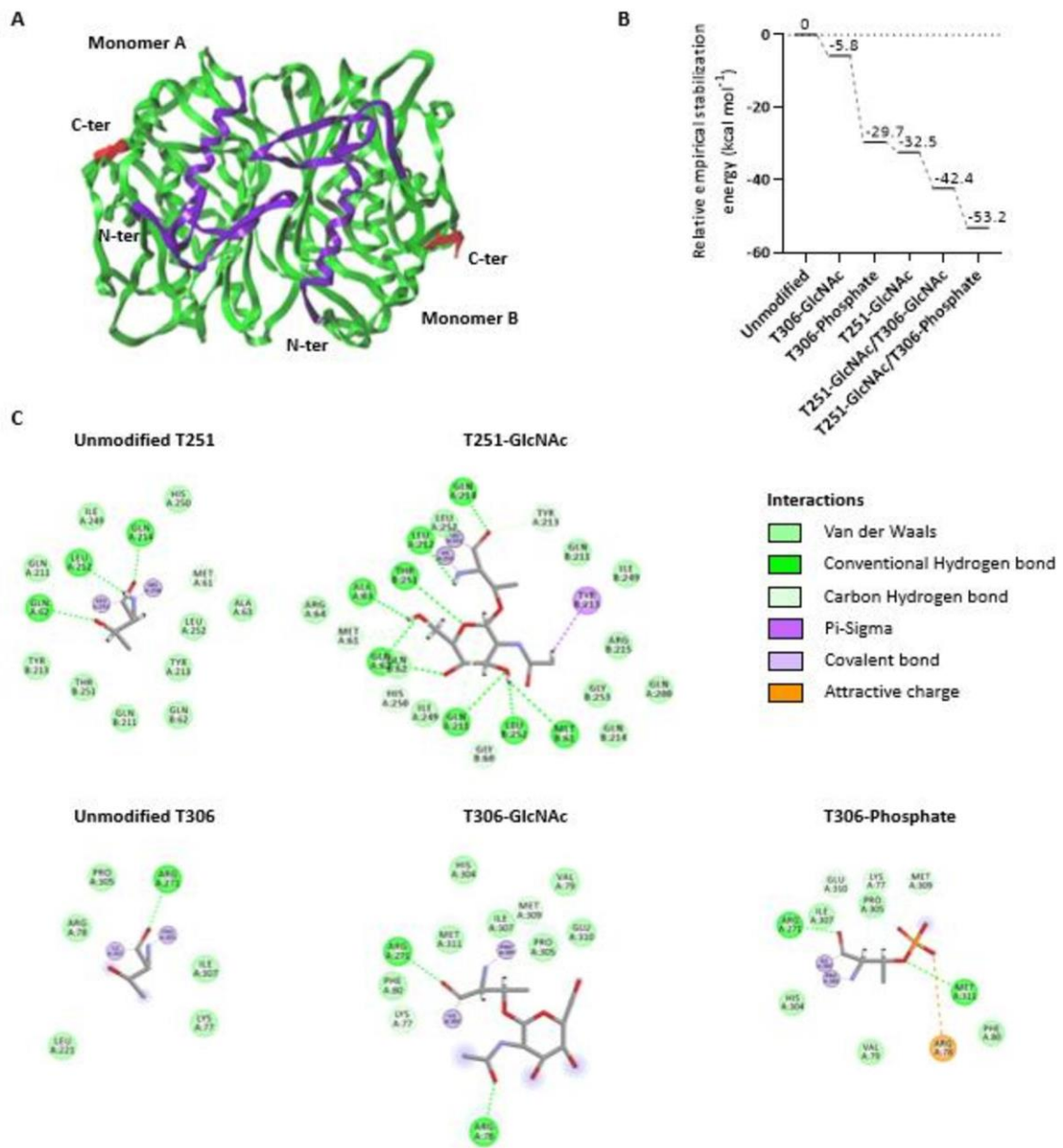


Figure 6. *O*-GlcNAcylation at T251 and T306 increases TS dimer stabilization by generating intra- and inter-monomer interactions.

(A) 3D modeling of human TS dimer structure. TS dimer crystal structure (green, PDB: IHZW) was completed with reconstituted M1-G29 (purple) and I307-V313 (red) sequences. (B) Empirical potential energies of stabilization of TS dimer whose monomer A is modified at T251 and T306 residues relative to TS dimer whose monomer A is unmodified. (C) 2D view of interaction types of *O*-GlcNAc or phosphate moiety at T251 and T306 residues of TS monomer A with surrounding amino acids of TS monomers A and B.

accordance to experimental data (Fig. 5A), modification of both amino acids increased even more this stability ($\Delta E = -42.4$ and -53.2 kcal.mol⁻¹ for *O*-GlcNAcylation at T251 and *O*-GlcNAcylation or phosphorylation at T306 respectively). Stabilization has originated from strong ionic and van der Waals interactions, and hydrogen bonds between TS amino acids and phosphate or *O*-GlcNAc moiety (Fig. 6C). Interestingly, TS dimerization seems to be driven partly by *O*-GlcNAcylation since glycosylation at T251 of monomer A generates hydrogen and π - σ bonds with amino acids located into the dimer interface of TS monomer B (at G60, M61, Q62, T251, L252 and Y213 residues respectively) (Fig. 6C). This network of links does not seem to be generated by the other structures proposed.

DISCUSSION

5-FU alone or combined with other drugs is one of the most frequently used chemotherapy for CRC treatment. Nonetheless, the outcome is often sub-optimal because CRC patients are commonly intrinsically or will become resistant to 5-FU treatment, leading to disease recurrence. Since TS is a key target of 5-FU, the possible mechanism of 5-FU response in CRC is likely to involve this enzyme. Proteomic and systematic approaches identified TS as an *O*-GlcNAcylated protein [9,10] but the role of this PTM on the enzyme remained unknown. Glycosylation alterations play an important role in CRC response to several therapies

[41]. To test this conjecture, we first investigated TS expression and *O*-GlcNAcylation levels in CRC tissues. Consistent with previously published data, *O*-GlcNAcylation levels are increased in colorectal tumors compared to normal tissues [42–44]. TS levels are also increased in tumors highlighting the significant need for dTMP synthesis to support cell proliferation [45]. Our data also showed that nutrients affect TS levels by regulating *O*-GlcNAcylation and that TS *O*-GlcNAcylation is increased in colon cancer cells compared to non-cancerous ones. More interestingly, we present evidence that enhanced TS levels by *O*-GlcNAcylation sensitizes CRC to 5-FU cytotoxicity and decipher the underlying molecular mechanism. Elevation of *O*-GlcNAcylation *in vivo* by using Thiamet-G correlated with an increase in TS levels and a potentiation of 5-FU cytotoxic effect in a murine model of CRC as shown by number and grade tumor analyses. Interestingly, we showed that Thiamet-G alone reduces CRC progression. It was previously shown that increased *O*-GlcNAcylation by heterozygote knockout for *Meningioma Expressed Antigen 5 (MGEA5)* encoding OGA attenuates tumorigenesis and enhances survival in sporadic *Adenomatous Polyposis coli (APC)^{min/+}* CRC mice model [46]. Consistently with our and other's data showing that knockdown of *OGT* or *MGEA* reduces cell growth [47,48], these studies highlight the pivotal role of *O*-GlcNAcylation homeostasis in carcinogenesis and tumor growth. Data mining of CRC patients [36]

revealed that *OGT* expression is positively correlated with the 5-FU-based chemotherapy response. Consistently, down-regulation of *OGT* and *O*-GlcNAcylation decreased *in vitro* 5-FU cytotoxic effect by regulating both TS stability and levels. Reduced TS amounts inhibited 5-FU-induced cell apoptosis in colon cancer HT-29 cells. *TYMS* gene overexpression is a current biomarker of 5-FU resistance in CRC [4]. Distinguishing between mRNA overexpression and enzyme stabilization as a regulation mechanism of TS proteins has implications with regard to how cancer cells may respond to 5-FU therapy. Our data suggest that the regulation of 5-FU response by *O*-GlcNAcylation is finely tuned and depends on a proper amount of TS proteins. Moreover, *O*-GlcNAcylation strongly stabilizes TS by forming novel intra- and inter-monomer interactions (hydrogen and π - σ bonds). Potential PTM induced-structure modifications of TS could also increase its affinity for FdUMP metabolites and thus enhancing TS inhibition.

In this study, we also reveal a reciprocal effect of 5-FU on *O*-GlcNAcylation levels *in vitro* and *in vivo*. 5-FU treatment affected *O*-GlcNAcylation by decreasing OGT at both protein and mRNA levels in cancerous colon cell line. The underlying mechanism appears to be different in murine CRC tumors since OGT levels were steady under 5-FU treatment. Hyper-*O*-GlcNAcylation of proteins in murine CRC tissues compared to normal tissues is not related to an increase in OGT levels but could

be related to increased OGT activity *in vivo*. Thus, 5-FU could reduce *O*-GlcNAcylation by affecting the activity of the OGT enzyme in murine CRC tumors. Furthermore, as OGT activity is inhibited by high UDP, UTP and UDP-GlcNAc concentrations [49], 5-FU metabolites may inhibit OGT by producing fluorinated derivatives of uridine compounds [50]. Together, our study highlights a cross-talk between *O*-GlcNAcylation and 5-FU metabolism *in vitro* and *in vivo*.

Furthermore, our data showed that TS *O*-GlcNAcylation at T251 and T306 stabilizes the enzyme by preventing its proteasomal degradation in an ubiquitin-independent pathway. Proteasomal degradation of TS is controlled by two degron sequences located respectively in the N- (N-ter) and C-terminal (C-ter) regions. The N-ter degron includes an Intrinsically Disordered Region (IDR, M1-P27 residues) and an amphipathic α -helix (hA, L31-R42 residues) [51]. We report here for the first time an *O*-GlcNAc modification at T251, a key residue located in the sixth β -strand at the dimer interface of TS [52]. Our data show that the T251A mutation decreases stability of TS. Recently, Pozzi et al. (2019) showed that the substitution of Q62N at the dimer interface destabilizes TS homodimer by inducing a slight aperture of the TS dimer [53]. In a similar manner, the T251A mutation could decrease stability of TS by modifying *O*-GlcNAc induced-interactions and reducing its dimerization. Interestingly, T306 is located within the C-ter cryptic degron (F276-V313) whose activity is

regulated by the N-ter degron [54]. The sole mutation T306A does not affect TS stability in accordance with the observation that deletion of P305-I307 sequence comprising the T306 residue does not affect stability of TS [40]. Conversely, in combination with T251A mutation the absence of phosphorylation at T306 enhances TS degradation. This result is reinforced by our data showing that the T306D phosphomimetic mutation is able to restore stability of T251A mutants suggesting that phosphorylation of this site would inhibit the degron activity of TS. Remarkably, the P305-I307 sequence of TS is similar to the P375-T-L377 tripeptide motif that dictates the ubiquitin-independent degradation of c-Fos protein [55,56]. Degradation of c-Fos depends on the activity of N-ter and C-ter degrons that are regulated by phosphorylation and possibly by heterodimerization of c-Fos with various partners, the best known being the Jun family members [57]. TS degron activity could also be regulated by PTMs and dimerization. Here, we report that the T251A mutation decreases TS stability that can be restored by phosphorylation at T306, indicating that TS proteasomal degradation driven by hypo-*O*-GlcNAcylation at T251 depends on *O*-GlcNAcylation/phosphorylation status at T306 of the C-ter degron. Furthermore, the relative empirical potential stabilization energy calculations indicate that both *O*-GlcNAcylation and phosphorylation at T306 increases stability of T251 *O*-GlcNAcyated TS.

In agreement with our findings, the beneficial effect of *O*-GlcNAcylation in response to chemotherapy has also been documented for cisplatin in ovarian cancer [16], for bortezomib in mantle cell lymphoma [19] and for TRAIL therapy in various cancers [14]. Treatment of ovarian carcinoma cells with Thiamet-G led to p53 stabilization, increased nuclear localization, and increased protein levels of p53 target genes [17]. Combination treatment of the chemotherapeutic cisplatin with Thiamet-G decreased tumor cell growth and enhanced cell cycle arrest. Authors suggested OGA inhibition as an adjuvant treatment for ovarian carcinoma [17]. Thiamet-G is the most widely used OGA inhibitor *in vitro* and *in vivo* as it exhibits excellent stability and selectivity [58]. Two others selective OGA inhibitors (MK-8719 and ASN120290) have been recently included in the orphan drug designation program of the US Food and Drug Administration for the safe and effective treatment of the progressive supranuclear palsy, a neurodegenerative tauopathy. In conclusion, our study shows that *O*-GlcNAc homeostasis-TS axis plays an important role in mediating 5-FU sensitivity in CRC, hence therapeutic combination strategy of 5-FU with an OGA inhibitor would be beneficial for patients with CRC.

Bibliography

1. Ishikawa M, Miyauchi T, Kashiwagi Y. Clinical implications of thymidylate synthetase, dihydropyrimidine dehydrogenase and orotate phosphoribosyl transferase activity levels in

- colorectal carcinoma following radical resection and administration of adjuvant 5-FU chemotherapy. *BMC Cancer*. 2008;8:188.
2. Kristensen MH, Weidinger M, Bzorek M, Pedersen PL, Mejer J. Correlation between thymidylate synthase gene variants, RNA and protein levels in primary colorectal adenocarcinomas. *J Int Med Res*. 2010;38:484–97.
 3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68:394–424.
 4. Palmirotta R, Carella C, Silvestris E, Cives M, Stucci SL, Tucci M, et al. SNPs in predicting clinical efficacy and toxicity of chemotherapy: walking through the quicksand. *Oncotarget*. 2018;9:25355–82.
 5. Samsonoff WA, Reston J, McKee M, O'Connor B, Galivan J, Maley G, et al. Intracellular location of thymidylate synthase and its state of phosphorylation. *J Biol Chem*. 1997;272:13281–5.
 6. Fraczyk T, Kubiński K, Masłyk M, Cieśła J, Hellman U, Shugar D, et al. Phosphorylation of thymidylate synthase from various sources by human protein kinase CK2 and its catalytic subunits. *Bioorg Chem*. 2010;38:124–31.
 7. Anderson DD, Woeller CF, Stover PJ. Small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) modification of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45:1760–3.
 8. Peña MMO, Melo SP, Xing Y-Y, White K, Barbour KW, Berger FG. The Intrinsically Disordered N-terminal Domain of Thymidylate Synthase Targets the Enzyme to the Ubiquitin-independent Proteasomal Degradation Pathway. *J Biol Chem*. 2009;284:31597–607.
 9. Hahne H, Sobotzki N, Nyberg T, Helm D, Borodkin VS, van Aalten DM, et al. Proteome wide purification and identification of O-GlcNAc modified proteins using Click chemistry and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2013;12:927–36.
 10. Sprung R, Nandi A, Chen Y, Kim SC, Barma D, Falck JR, et al. Tagging-via-Substrate Strategy for Probing O-GlcNAc Modified Proteins. *J Proteome Res*. 2005;4:950–7.
 11. Yang X, Qian K. Protein O -GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2017;18:452–65.
 12. Hanover JA, Chen W, Bond MR. O-GlcNAc in cancer: An Oncometabolism-fueled vicious cycle. *J Bioenerg Biomembr*. 2018;50:155–73.
 13. Kanwal S, Fardini Y, Pagesy P, N'tumba-Byn T, Pierre-Eugène C, Masson E, et al. O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor α expression and confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PLoS ONE*. 2013;8:e69150.
 14. Lee H, Oh Y, Jeon Y-J, Lee S-Y, Kim H, Lee H-J, et al. DR4-Ser424 O-GlcNAcylation Promotes Sensitization of TRAIL-Tolerant Persisters and TRAIL-Resistant Cancer Cells to Death. *Cancer Res*. 2019;79:2839–52.
 15. Yang S-Z, Xu F, Yuan K, Sun Y, Zhou T, Zhao X, et al. Regulation of pancreatic cancer TRAIL resistance by protein O-GlcNAcylation. *Lab Invest*. 2020;
 16. Zhou F, Yang X, Zhao H, Liu Y, Feng Y, An R, et al. Down-regulation of OGT promotes cisplatin resistance by inducing autophagy in ovarian cancer. *Theranostics*. 2018;8:5200–12.
 17. de Queiroz RM, Madan R, Chien J, Dias WB, Slawson C. Changes in O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Homeostasis Activate the p53 Pathway in Ovarian Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2016;291:18897–914.
 18. Luanpitpong S, Angsutararux P, Samart P, Chanthra N, Chanvorachote P, Issaragrisil S. Hyper-O -GlcNAcylation induces cisplatin resistance via regulation of p53 and c-Myc in human lung carcinoma. *Scientific Reports*. 2017;7:10607.
 19. Luanpitpong S, Chanthra N, Janan M, Poohadsuan J, Samart P, U-Pratya Y, et al. Inhibition of O-GlcNAcase sensitizes apoptosis and reverses bortezomib resistance in mantle cell lymphoma through modification of truncated Bid. *Mol Cancer Ther*. 2018;17:484–96.
 20. Sekine H, Okazaki K, Kato K, Alam MM, Shima H, Katsuoka F, et al. O-GlcNAcylation Signal Mediates Proteasome Inhibitor Resistance in Cancer Cells by Stabilizing NRF1. *Mol Cell Biol*. 2018;38.
 21. Kang KA, Piao MJ, Ryu YS, Kang HK, Chang WY, Keum YS, et al. Interaction of DNA demethylase and histone methyltransferase upregulates Nrf2 in 5-

- fluorouracil-resistant colon cancer cells. *Oncotarget*. 2016;7:40594–620.
22. Lesuffleur T, Kornowski A, Luccioni C, Muleris M, Barbat A, Beaumatin J, et al. Adaptation to 5-fluorouracil of the heterogeneous human colon tumor cell line HT-29 results in the selection of cells committed to differentiation. *Int J Cancer*. 1991;49:721–30.
23. Neufert C, Becker C, Neurath MF. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression. *Nat Protoc*. 2007;2:1998–2004.
24. Becker C, Fantini MC, Wirtz S, Nikolaev A, Kiesslich R, Lehr HA, et al. In vivo imaging of colitis and colon cancer development in mice using high resolution chromoendoscopy. *Gut*. 2005;54:950–4.
25. Hardivillé S, Banerjee PS, Selen Alpergin ES, Smith DM, Han G, Ma J, et al. TATA-Box Binding Protein O-GlcNAcylation at T114 Regulates Formation of the B-TFIID Complex and Is Critical for Metabolic Gene Regulation. *Molecular Cell*. 2020;77:1143-1152.e7.
26. David G, Fogeron M-L, Montserret R, Lecoq L, Page A, Delolme F, et al. Phosphorylation and Alternative Translation on Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis of the DHBV Large Envelope Protein. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2019 [cited 2020 Sep 18];6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6902406/>
27. Etienne M-C, Chazal M, Laurent-Puig P, Magné N, Rosty C, Formento J-L, et al. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol*. 2002;20:2832–43.
28. Almog R, Waddling CA, Maley F, Maley GF, Van Roey P. Crystal structure of a deletion mutant of human thymidylate synthase Δ (7–29) and its ternary complex with Tomudex and dUMP. *Protein Sci*. 2001;10:988–96.
29. Jorgensen WL, Tirado-Rives J. Monte Carlo vs Molecular Dynamics for Conformational Sampling. *J Phys Chem*. American Chemical Society; 1996;100:14508–13.
30. Jorgensen WL, Tirado-Rives J. Molecular modeling of organic and biomolecular systems using BOSS and MCPRO. *J Comput Chem*. 2005;26:1689–700.
31. Vergoten G, Mazur I, Lagant P, Michalski JC, Zanetta JP. The SPASIBA force field as an essential tool for studying the structure and dynamics of saccharides. *Biochimie*. 2003;85:65–73.
32. Lagant P, Nolde D, Stote R, Vergoten G, Karplus M. Increasing Normal Modes Analysis Accuracy: The SPASIBA Spectroscopic Force Field Introduced into the CHARMM Program. *J Phys Chem A*. 2004;108:4019–29.
33. Stastna M, Janeckova L, Hrckulak D, Kriz V, Korinek V. Human Colorectal Cancer from the Perspective of Mouse Models. *Genes (Basel)* [Internet]. 2019 [cited 2020 May 5];10. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6826908/>
34. 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;521:125–30.
35. Peters GJ, van der Wilt CL, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, Johnston PG, van Groeningen CJ, et al. Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer*. 1995;31A:1299–305.
36. Okita A, Takahashi S, Ouchi K, Inoue M, Watanabe M, Endo M, et al. Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*. 2018;9:18698–711.
37. Frączyk T, Ruman T, Wilk P, Palmowski P, Rogowska-Wrzesinska A, Cieśla J, et al. Properties of phosphorylated thymidylate synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2015;1854:1922–34.
38. Ruan H-B, Nie Y, Yang X. Regulation of Protein Degradation by O-GlcNAcylation: Crosstalk with Ubiquitination. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12:3489–97.
39. Forsthoefel AM, Peña MMO, Xing YY, Rafique Z, Berger FG. Structural determinants for the intracellular degradation of human thymidylate synthase. *Biochemistry*. 2004;43:1972–9.

40. Peña MMO, Xing YY, Koli S, Berger FG. Role of N-terminal residues in the ubiquitin-independent degradation of human thymidylate synthase. *Biochem J*. 2006;394:355–63.
41. Very N, Lefebvre T, El Yazidi-Belkoura I. Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;9:1380–402.
42. Mi W, Gu Y, Han C, Liu H, Fan Q, Zhang X, et al. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1812:514–9.
43. Olivier-Van Stichelen S, Dehennaut V, Buzy A, Zacharyus J-L, Guinez C, Mir A-M, et al. O-GlcNAcylation stabilizes β -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J*. 2014;28:3325–38.
44. 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;382:111464.
45. Rahman L, Voeller D, Rhaman M, Lipkowitz S, Allegra C, Barrett J, et al. Thymidylate synthase as an oncogene: a novel role for an essential DNA synthesis enzyme. - PubMed - NCBI. *Cancer Cell*. 2004;5:341–51.
46. Yang YR, Jang H-J, Yoon S, Lee YH, Nam D, Kim IS, et al. OGA heterozygosity suppresses intestinal tumorigenesis in *Apc^{min}/+* mice. *Oncogenesis*. 2014;3:e109.
47. 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 (Lausanne)* [Internet]. 2016 [cited 2020 Jan 5];7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4879930/>
48. 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;11:439–48.
49. 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;267:9005–13.
50. Pederson NV, Zanghi JA, Miller WM, Knop RH. Discrimination of fluorinated uridine metabolites in N-417 small cell lung cancer cell extracts via 19F- and 31P-NMR. *Magn Reson Med*. 1994;31:224–8.
51. Melo SP, Barbour KW, Berger FG. Cooperation between an Intrinsically Disordered Region and a Helical Segment Is Required for Ubiquitin-independent Degradation by the Proteasome. *J Biol Chem*. 2011;286:36559–67.
52. Chanama S, Chitnumsub P, Leartsakulpanich U, Chanama M. Distinct dimer interface of *Plasmodium falciparum* thymidylate synthase: Implication for species-specific antimalarial drug design. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2017;48:722–36.
53. Pozzi C, Lopresti L, Santucci M, Costi MP, Mangani S. Evidence of Destabilization of the Human Thymidylate Synthase (hTS) Dimeric Structure Induced by the Interface Mutation Q62R. *Biomolecules* [Internet]. 2019 [cited 2020 Aug 19];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6523895/>
54. Barbour KW, Xing Y-Y, Peña EA, Berger FG. Characterization of the bipartite degron that regulates ubiquitin-independent degradation of thymidylate synthase. *Biosci Rep* [Internet]. 2013;33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3549573/>
55. Acquaviva C, Brockly F, Ferrara P, Bossis G, Salvat C, Jariel-Encontre I, et al. Identification of a C-terminal tripeptide motif involved in the control of rapid proteasomal degradation of c-Fos proto-oncoprotein during the G(0)-to-S phase transition. *Oncogene*. 2001;20:7563–72.
56. Bossis G, Ferrara P, Acquaviva C, Jariel-Encontre I, Piechaczyk M. c-Fos Proto-Oncoprotein Is Degraded by the Proteasome Independently of Its Own Ubiquitylation In Vivo. *Mol Cell Biol*. 2003;23:7425–36.
57. Ferrara P, Andermarcher E, Bossis G, Acquaviva C, Brockly F, Jariel-Encontre I, et al. The structural determinants responsible for c-Fos protein proteasomal degradation differ according to the conditions of expression. *Oncogene*. 2003;22:1461–74.

58. Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, et al. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat Chem Biol.* 2008;4:483–90.

Revue N°1

Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer

Ninon Very¹, Tony Lefebvre¹ and Ikram El Yazidi-Belkoura¹

¹Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UGSF-UMR 8576 CNRS, Université de Lille, Lille 59000, France

Correspondence to: Ikram El Yazidi-Belkoura, **email:** ikram.el-yazidi@univ-lille1.fr

Keywords: drug therapy resistance mechanisms, cancer chemotherapy, cancer-associated glycosylations, glycosyltransferases, colorectal cancer

Received: July 26, 2017

Accepted: October 04, 2017

Published: November 03, 2017

Copyright: Very et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Colorectal cancer (CRC) is the fourth leading cause of cancer-related deaths in the world. Drug resistance of tumour cells remains the main challenge toward curative treatments efficiency. Several epidemiologic studies link emergence and recurrence of this cancer to metabolic disorders. Glycosylation that modifies more than 80% of human proteins is one of the most widespread nutrient-sensitive post-translational modifications. Aberrant glycosylation participates in the development and progression of cancer. Thus, some of these glycan changes like carbohydrate antigen CA 19-9 (sialyl Lewis a, sLea) or those found on carcinoembryonic antigen (CEA) are already used as clinical biomarkers to detect and monitor CRC. The current review highlights emerging evidences accumulated mainly during the last decade that establish the role played by altered glycosylations in CRC drug resistance mechanisms that induce resistance to apoptosis and activation of signaling pathways, alter drug absorption and metabolism, and led to stemness acquisition. Knowledge in this field of investigation could aid to the development of better therapeutic approaches with new predictive biomarkers and targets tied in with adapted diet.

INTRODUCTION

According to the World Health Organization (WHO) [1], colorectal cancer (CRC) is the third most common diagnosed cancer and the fourth cause of cancer-related death in the world (1,3 million new cases and 694 000 deaths respectively in 2012). When diagnosed at an early stage, surgical resection is curative for most of the cases but for advanced stages a survival advantage is gained with the systemic administration of cytotoxic chemotherapy (5-year recurrence rates after primary surgery are nearly 10% and 36% for early (stages 1 and 2A of the tumor/node/metastasis (TNM) classification of malignant tumors) and late (stages 2B and 3) stage diseases respectively [2]). One established chemotherapy regimen for the treatment of advanced CRC (from stages 2B to 4) consists of the combination of 5-fluorouracil (5-FU)/leucovorin (LV, folinic acid) with oxaliplatin or irinotecan (camptothecin-11, CPT-11) [3]. Furthermore, targeted therapy based on the use of the monoclonal antibodies cetuximab and panitumumab that

specifically bind the epidermal growth factor receptor (EGFR) and bevacizumab that neutralizes the vascular endothelial growth factor (VEGF) confers a benefit when administered in conjunction with chemotherapy [3]. However, the response rate is only about 57% [4] and the 5-year survival rate remains around 12,5% for patients with metastatic-stage disease [5]. The failure of treatments is primarily due to the development of drug resistance. In this context, much of current research is focused on the understanding of cancer resistance mechanisms and the identification of new predictive biomarkers and targets for drug therapy. We notice a renewed interest in the study of glycosylation since it was established that, compared to adjacent non-cancerous cells, CRC cells display glycosylation alterations which correlate with cancer progression and resistance to drug treatments. This review addresses the role of glycans in drug resistance mechanisms in CRC therapy. Particularly, the involvement of glycosyltransferases and related glycosylations in biological mechanisms controlling CRC development, progression and drug therapy resistance will be discussed.

THE MULTIPLE FACES OF GLYCOSYLATION IN MAMMALIAN CELLS

Glycosylation is a group of post-translational modifications (PTM) in which carbohydrates are enzymatically linked to proteins, carbohydrates, lipids or any other kind of molecule [6]. Glycosylation represents one of the most abundant PTM since nearly 1–2% of human genome encode 236 different glycosyltransferases (CAZy database) and more than 80% of human proteins are glycosylated [7]. This modification can affect the folding, stability, subcellular localization, partners interaction and biological activity of a glycoprotein. Major protein glycosylations are classified according to the atom that links the glycan to the aglycone: nitrogen of the amide group of asparagine (Asn, N) for *N*-linked glycosylation (*N*-glycosylation) and oxygen of the hydroxyl group of serine (Ser, S) or threonine (Thr, T) for *O*-linked glycosylation (*O*-glycosylation) (Figure 1).

N-glycosylation

In the *N*-linked glycosylation biosynthetic pathway, the preassembled precursor oligosaccharide GlcNAc2Man9Glc3 is co-translationally transferred from the dolichol pyrophosphate donor to an asparagine residue located in a NXS/T consensus sequence (where X is any amino-acid except proline (Pro, P)) of the nascent polypeptide in the lumen of the rough *endoplasmic reticulum* (ER) where *N*-glycosylation is necessary for protein folding and quality control [8]. This glycosylation is further processed and extended in the Golgi apparatus into oligomannose, hybrid or complex structures (Figure 1). *N*-acetylglucosaminyltransferases (GnT) are enzymes responsible for *N*-glycan branching. Beta1,6-branched *N*-glycans can be elongated with a poly-*N*-acetylglucosamine (poly-LacNAc) chain by the sequential addition of Gal β 1,4-GlcNAc β 1,3 moieties by β 1,4-galactosyltransferases (β 4GalT) and β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferases (β 3GnT). Alpha2,3-sialyltransferases (ST3GalT) and β -galactoside α 2,6-sialyltransferase 1 (ST6GalT-1) mediate the α 2,3- and α 2,6-sialylation of complex *N*-linked glycoproteins [9].

Mucin-type *O*-glycosylation

Two of the most representative *O*-linked glycosylations are *O*-linked α -*N*-acetylgalactosamine (*O*-GalNAc) commonly found in mucins and *O*-linked β -*N*-acetylglucosamine (*O*-GlcNAc). Mucin-type *O*-glycosylation is initiated by post-translationally transfer of *N*-acetylgalactosamine (GalNAc) through an α -linkage in the Golgi [9]. Then, *O*-glycans are elongated with other carbohydrates to build various cores (Figure 1). Terminal structures of *N*-linked and *O*-linked mucin-type glycans are often sialylated and fucosylated and

can generate Lewis (Le) blood group antigen structures. Mucin-type *O*-glycosylation is initiated by a large family of Golgi polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases (ppGalNAcT) [10] which transfer a GalNAc residue from uridine-5'-diphosphate-*N*-acetylglucosamine (UDP-GalNAc) to serine or threonine residues to generate the Thomsen-nouvelle (Tn) antigen. Then, Tn antigen can be extended by sequential enzymatic reactions to form four core structures (Figure 1). Core 1 β 1,3-galactosyltransferase 1 (C1GalT-1) enzyme catalyzes the synthesis of core 1 (also named Thomsen-Friedenreich antigen, T antigen) by transferring a galactose (Gal) residue in a β 1,3 linkage to the Tn antigen, and core 2 β 1,6-*N*-acetylglucosaminyltransferases (C2GnT) generate the core 2 by branching a GlcNAc residue in a β 1,6 linkage to core 1. Both Tn and T antigens can be further sialylated into sialyl-Tn antigen (sTn) and sialyl-T antigen (sT) respectively by α -GalNAc α 2,6-sialyltransferase 1 (ST6GalNAcT-1) and ST3GalT-1 causing premature termination of chain elongation. As an alternative to core 1, core 3 β 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase (C3GnT) adds a GlcNAc residue in a β 1,3 linkage to the Tn antigen to form the core 3. Finally, like for core 1, core 3 can be extended into core 4 by the core 4 *N*-acetylglucosaminyltransferase (C4GnT) which transfers another GlcNAc residue in a β 1,6 linkage [9]. As *N*-glycosylation, mucin-type *O*-glycosylation takes place in the ER and/or Golgi apparatus biosynthetic-secretory pathway and targets secreted or membrane-bound proteins. Based on their cellular localization, mucins (MUC) are classified as secretory or membrane-bound glycoproteins. Membrane bound mucins (MUC1, MUC3-4, MUC12-17 and MUC20) are anchored to the apical membrane of epithelial cells by a transmembrane domain and are involved in signal transduction. In contrast, secretory mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6-8 and MUC19) lack the transmembrane domain and are secreted into the extracellular space to compose a viscoelastic mucus gel, a protective and lubricative molecular barrier [11].

Lewis-type antigen glycosylation

Depending on the core disaccharide linkage on *N*- or *O*-linked glycoproteins, terminal Lewis blood group antigens are classified as either type 1 (Gal β 1,3-GlcNAc) or type 2 (Gal β 1,4-GlcNAc) structures [9, 12]. Alpha1,2-fucosyltransferases (α 2FucT) 1 and 2 (FucT-1 and FucT-2) transfer a fucose (Fuc) in an α 1,2 linkage to type 1 and type 2 structures to produce respectively H1- and H2-type determinants (Figure 1). H1- and H2-type structures can be further converted into Lewis b (Leb) and Lewis y (Ley) di-fucosylated antigens respectively by fucosylation in an α 1,4 or an α 1,3 linkage by α 1,3/4-fucosyltransferases (α 3/4FucT) FucT-3-7 and FucT-9 [9, 12]. Lewis a (Lea) and Lewis x (Lex) mono-fucosylated antigens are

positional isomers of respectively Leb and Ley antigens but are not fucosylated in $\alpha 1,2$. Moreover, $\alpha 1,4$ - and $\alpha 1,3$ -fucosylation of Lea and Lex can be forewent by the addition of $\alpha 2,3$ -sialic acid by ST3GalT-3-4 and ST3GalT-6 to form sialyl Lea (sLea) and sialyl Lex (sLex) [9, 12].

O-GlcNAcylation

Contrary to *N*- and mucin-type *O*-glycosylations found in secreted and membrane-anchored glycoproteins, *O*-GlcNAcylation occurs exclusively on cytoplasmic, nuclear and mitochondrial proteins [13]. *O*-GlcNAcylation is also different from all other classical glycosylations since it consists in the reversible addition of a single GlcNAc residue (Figure 1). It is a dynamic PTM that implies addition and removal of GlcNAc residues by a unique couple of antagonist enzymes, *O*-GlcNAc

transferase (OGT) and *O*-GlcNAcase (OGA) respectively. OGT transfers a single GlcNAc from uridine-5'-diphosphate-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) via a $\beta 1$ -linkage to hydroxyl group of serine or threonine residues of intracellular proteins involved in a plethora of biological processes such as cell signaling, transcription or cell cycle [13–16].

FROM THE METABOLISM SHIFT TO THE ALTERATIONS OF GLYCOSYLATIONS IN CANCER CELLS

Warburg effect and hexosamine biosynthetic pathway

One of the key hallmarks of cancer cells is the Warburg effect, an adaptive metabolic shift from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis [17, 18]. This adaptive

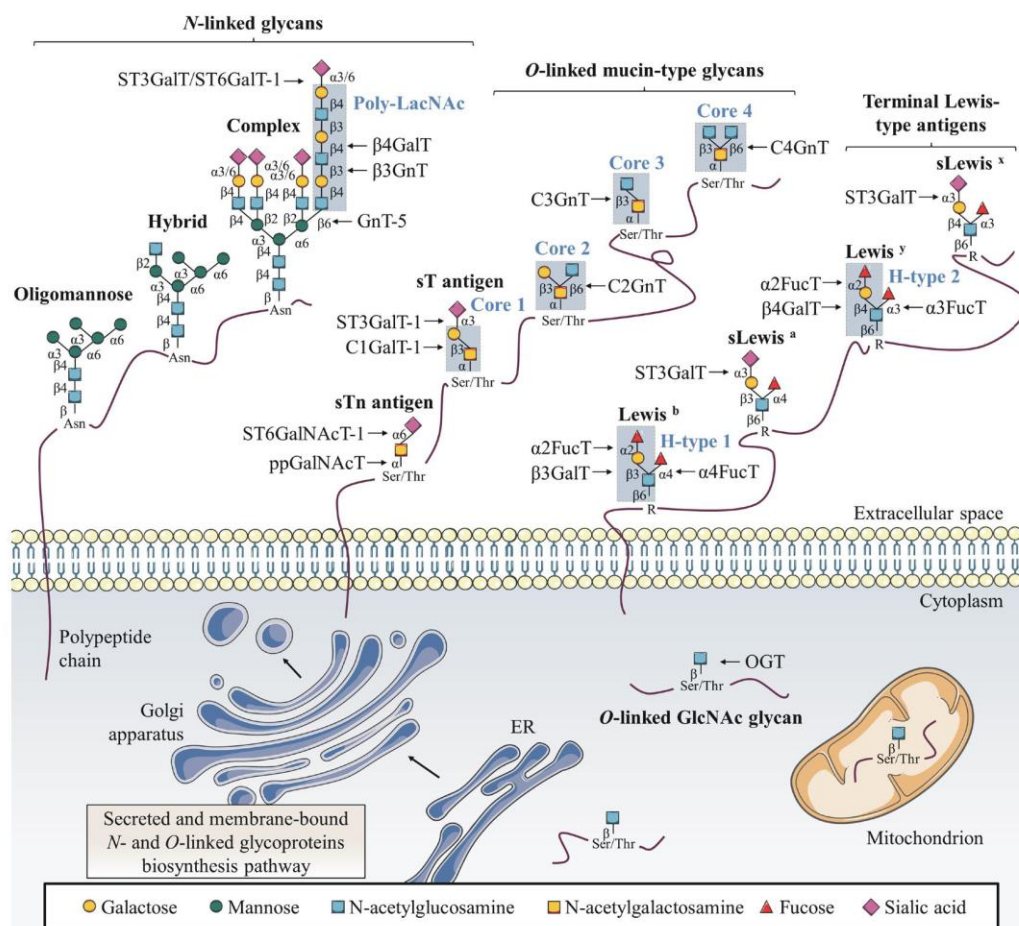


Figure 1: Classical glycosylation types found on mammalian proteins. This figure depicts common *N*-linked and *O*-linked glycoprotein structures as well as terminal Lewis antigens structures. The key glycosyltransferases responsible for the addition of specific glycans are also indicated. Secreted and membrane-bound glycoproteins exhibit *N*-glycans with β -GlcNAc linked to Asn as oligomannose, complex or hybrid forms. *O*-glycans are linked through α -GalNAc to Ser/Thr with various core structures and extensions. Terminal structures of *N*-linked and *O*-linked glycans are often sialylated and fucosylated to generate Lewis-type antigen glycosylation. Single β -*O*-GlcNAc is found on many cytosolic, nuclear and mitochondrial proteins.

metabolic is thought to provide an evolutionary advantage to cancer cells by providing both increase bioenergetics and biosynthesis. Warburg effect is characterized by an increase of glucose (Glc) and glutamine (Gln) consumption. Glucose and glutamine are the most abundant extracellular nutrients which support the growth and proliferation of cancer cells by contributing to energy production (glycolysis via glucose and Krebs cycle via glutaminolysis) and *de novo* biosynthesis of macromolecules (lipids, nucleic acids and proteins) [19, 20]. It is possible to take advantage of the increased cancer cells demand to detect primary and metastatic tumor sites by monitoring the incorporation of the glucose radioanalogue 2-deoxy-2-(18F)fluoroglucose ([18F] FDG) with positron emission tomography (PET) scan [21]. Elevated glucose uptake takes an active part in the increase of the pentose phosphate pathway (PPP) to produce reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH₂) needed for fatty acid synthesis and pentoses incorporated in nucleic acids, and the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) that generates UDP-GlcNAc (Figure 2). Approximately 2-3% of the glucose entering the cell are directed to the HBP [22]. Glutamine takes also an active part in HBP as the first and rate limiting step of this pathway is catalyzed by glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) which converts fructose-6-phosphate (Fru-6-P) to glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P) using glutamine as the amine group donor [23]. Through a subset of enzymatic reactions, GlcN-6-P is then converted to the nucleotide sugar UDP-GlcNAc, the end-product of HBP. UDP-GlcNAc is considered as a nutritional state sensor of the cell because it integrates glucose, amino acids, fatty acids and nucleotides metabolisms. UDP-GlcNAc can undergo epimerization to generate UDP-GalNAc used in the ER and Golgi apparatus and cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid (CMP-Neu5Ac), the donor of Neu5Ac, used in the Golgi apparatus for terminal glycosylation of cell membrane and secreted glycoproteins (Figure 2).

Loss of glycosylation control in cancer cells

Another well-established cancer phenotypic marker is altered glycosylation that underlies tumor growth and malignancy. Specific aberrant glycosylations are associated to CRC. These glycosylation abnormalities are caused by increased abundance and availability of nucleotide sugars [24–26] and altered expression or activity of the corresponding glycosyltransferases [27]. Specifically, overexpression of OGT is correlated with overall increased *O*-GlcNAcylation of intracellular proteins [28]. In the other hand, overexpression of GnT-5 [29] and β 3GnT [30] is responsible for an increase of branched-*N*-glycans with respectively GlcNAc residue and poly-LacNAc chain. Truncated mucin-type *O*-glycans such as T and Tn antigens result from the overexpression of the first-step biosynthesis enzymes ppGalNAcT

combined to down-expression of *O*-glycan extension enzymes C2GnT, C3GnT and C4GnT [31–33]. Increased activity of α 2FucT participate also in the synthesis of Leb and Ley oncofetal antigens [34–37]. These antigens are expressed in colon during fetal life, gradually decrease in adult life to be mostly restricted to the proximal colon and are re-expressed in distal colon and rectal carcinomas [34, 37]. Finally, the most-widely aberrant glycosylation associated with CRC is an increase of global sialylation. Overexpression of sialyltransferases such as ST6GalT-1, ST3GalT and ST6GalNAcT-1 is involved in aberrant glycan structures including α 2,6-sialylated *N*-glycans, sTn, sLea (also known as carbohydrate antigen 19-9, CA 19-9) and sLex (Figure 2). sLea and carcinoembryonic antigen (CEA) are widely used as serum glycoprotein biomarkers to monitor and detect recurrence of CRC even if they show low specificity and sensitivity in initial diagnosis [38]. Recently, targeted next-generation sequencing defined the mutational landscapes of glycosylation-associated genes in CRC. Notably, authors identified somatic mutations in glycosyltransferase genes encoding β 3GnT-2, β 4GalT-2 and ST6GalNAcT-2 involved in the synthesis of poly-LacNAc chains on *N*- and *O*-glycans for the two former, and in the sialylation-mediated termination chain elongation of *O*-glycan core 1 and 3 structures for the latter. Functional studies showed that these mutations are responsible for impairment of localization, enzymatic activity and PTM pattern [39].

In addition to have a major role in the CRC development and progression, some of these aberrant glycosylations have been correlated to drug resistance by interfering with metabolism, absorption, anti-proliferative and anti-apoptotic effects of the drugs. This will be discussed in detail in the next sections by type of glycosylation.

GLYCOSYLATION ALTERATIONS IN COLORECTAL CANCER CELLS AND RESISTANCE TO DRUG THERAPY

N-glycosylation alterations in colorectal cancer: a cause of drug resistance

Disturbing *N*-glycosylation profile impacts the response to chemotherapy

The use of glycosylation inhibitors demonstrated the importance of *N*-glycosylation in chemoresistance mechanisms. First, swainsonine, a potent inhibitor of α -mannosidase 2 that is essential for the production of complex-type *N*-glycans, increased 5-FU sensitivity in all induced-resistant cell lines established from colon 26, a mouse cancer colorectal cell line, but not in its parental one [40]. The authors observed that *N*-glycan profiles of both the resistant and parental cells were changed by swainsonine treatment and showed that alterations in the

N-glycan structure affected mechanisms of 5-FU resistance by up-regulating thymidylate synthase (TS) expression and down-regulating orotic acid phosphoribosyltransferase (OPRT) expression at the transcriptional level (Figure 3). However, the underlying mechanism correlating *N*-glycan structures profile and 5-FU metabolizing-enzymes expression is not yet elucidated. Drug-metabolizing enzymes play an important role in reducing the

intracellular accumulation of drugs. Their expression can therefore either potentiate or reduce the drugs toxicity, and variations in both the anabolic and catabolic pathways can lead to drug resistance. Increased expression of TS, a key enzyme in pyrimidine metabolism and the major target of 5-FU, and decreased expression of the anabolic enzyme OPRT have already been associated with 5-FU resistance [41]. Secondly, ATP-binding cassette (ABC) sub-family

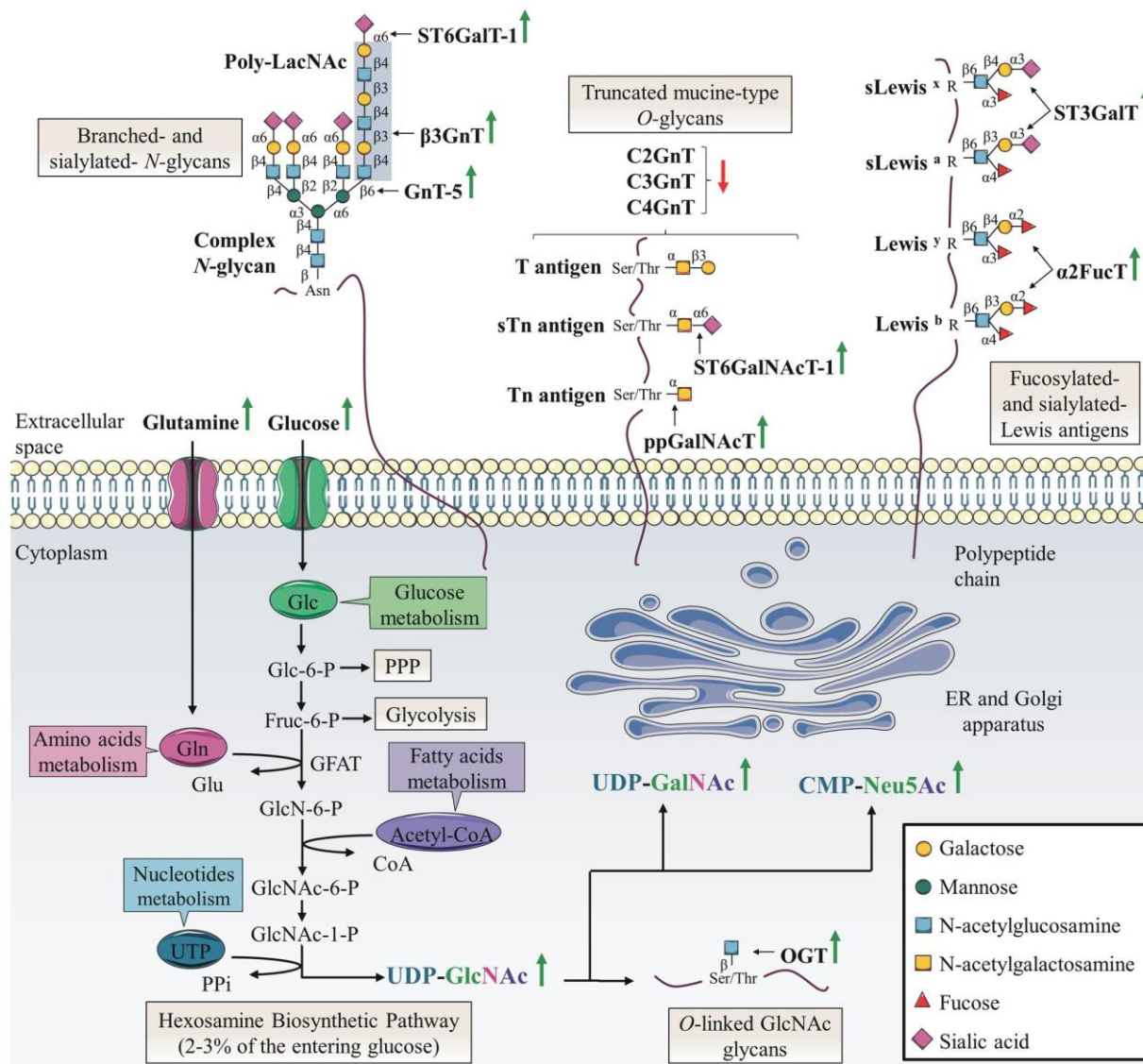


Figure 2: Specific alterations of glycosylation in colorectal cancer. The HBP pathway produces the nucleotide sugar UDP-GlcNAc in a nutrient-dependent manner. UDP-GlcNAc is critical for most kinds of glycosylation including *N*-glycosylation, *O*-GalNAc-based glycosylation and *O*-GlcNAcylation. In this sense, glycan structures are modified according to the metabolic status of the cell. The abnormal glycosylation which occurs in cancer cells can be attributed to abundance and availability of nucleotide sugars, acceptor substrates or cofactors in the same way as altered expression or activity, or mislocalization of glycosyltransferases. The most frequent abnormal glycosylations observed in CRC are increased branched- and sialylated-*N*-glycans, truncated mucin-type *O*-glycans, increased fucosylation and sialylation of Lewis antigens and increased *O*-GlcNAcylation. Green and red arrows indicate respectively increased and decreased availability of nutrients and nucleotide sugars, or expression or activity of glycosyltransferases in CRC. Acetyl-coA: acetyl-coenzyme A; Fru-6-P: fructose-6-phosphate; Glc-6-P: glucose-6-phosphate; GlcN-6-P: glucosamine-6-phosphate; GlcNAc-6-P: N-acetylglucosamine-6-phosphate; GlcNAc-1-P: N-acetylglucosamine-1-phosphate; Glu: glutamic acid; UTP: uridine triphosphate; PPI: inorganic pyrophosphate.

G member 2 (ABCG2) is an *N*-linked glycosylated transporter responsible for efflux of the active metabolite of irinotecan 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) (Figure 3). Overexpression of this efflux pump in cancer cells gives them also the ability to reduce chemotherapy intracellular concentration [41, 42]. Disruption of the early steps of the dolichol pyrophosphate precursor biosynthesis by treatment of Flp-In-293 embryonic kidney cells with tunicamycin decreases stability of ABCG2 and reduces cell resistance to SN-38 [43] (Figure 4A). In the same way, Santos et al. demonstrated an increased antitumor activity by combined administration of swainsonine and cisplatin *in vivo* [44]. Authors suggested that swainsonine may interfere with ABCB1 activity, a broad-spectrum multidrug efflux pump whose activity is dependent on *N*-glycosylation. Based on the aforementioned data, *N*-glycosylation can alter intracellular drug accumulation by reducing drug anabolism and increasing drug export. Targeting *N*-glycosylation may improve cancer chemotherapy and reduce drug resistance.

Beta1,6-GlcNAc bearing *N*-glycans implication in drug resistance

Increased expression of β 1,6-GlcNAc bearing *N*-glycans is a frequent cancer-associated modification due to abnormal expression of GnT-5. In the Golgi apparatus, GnT-5 catalyzes the transfer of GlcNAc to the trimannosyl core of *N*-glycan to produce tri or tetra-antennary complex glycans (Figure 1). GnT-5 expression is increased in different cancers [45, 46] including colon cancer [29] (Figure 2). In CRC, GnT-5 expression is associated with metastasis likely through glycosylation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1). Aberrant *N*-glycosylation of TIMP-1 affects its binding properties with matrix metalloproteinases (MMP) increasing cancer cell invasiveness [47].

The contribution of β 1,6-branched *N*-glycans in cancer angiogenesis was reinforced by the observation that vasculature of anti-VEGF resistant mice tumors presented high levels of β 1,6-GlcNAc branched *N*-glycans. In this model, GnT-5 knockdown increased efficacy of anti-VEGF treatment by modulating the interaction of some β -galactoside-binding lectins galectins with cell surface glycoproteins. Galectin-1 (Gal-1) is able to bind complex-type *N*-glycans on endothelial cell VEGF receptor 2 (VEGFR-2) and to activate an angiogenic signaling pathway in the absence of VEGF-A ligand. In fact, binding of Gal-1 resulted in VEGFR-2 clustering into membrane microdomains and increased surface retention. It was suggested that loss of β 1,6-GlcNAc *N*-glycan branching prevents Gal-1 binding to endothelial cells [48] (Figure 4B; Table 1). In this way, extrinsic properties of tumor-associated microenvironment can influence directly the drug response in cancer. Activation of the angiogenic pathway by the GnT-5 mediated *N*-glycosylation of VEGFR-2 in the absence of ligand

binding could be responsible, in part, of failure of anti-VEGF treatment. To circumvent this resistance, Croci et al. proposed targeting glycosylation-dependent galectin-receptor interactions and validated therapeutic efficiency of an anti-Gal-1 neutralizing monoclonal antibody [48]. Alternative therapeutic strategies targeting galectin-glycan interactions include β -galactose ligands, talose-based ligands and mimicking glycans [49]. In the other hand, we can also consider blocking the VEGF-VEGFR-2 signaling at a downstream level for example with receptor tyrosine kinases (RTK) inhibitors (TKI). A second-generation of these agents with higher specificity for VEGFR inhibition and favorable toxicity profiles are currently under clinical evaluation in metastatic CRC [50].

Poly-LacNAc chain bearing *N*-glycans implication in drug resistance

Among the β 3GnT family, β 3GnT-8 is the most recently identified enzyme involved in the biosynthesis of poly-LacNAc chain on tetra-antennary *N*-glycans [30] (Figure 1). The β 3GnT-8 transcript level is almost undetectable in normal colon tissues while it is increased in cancer tissues [30] (Figure 2). The β 3GnT-8 expression is also correlated with metastatic potential of CRC cells notably by targeting cluster of differentiation 147 (CD147), also known as extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) [51]. High *N*-glycosylated CD147 (HG-CD147), the active glycoform, is enriched on cancer cell surface and promotes production of secreted MMP in tumor cells themselves and in adjacent stromal cells [52].

Ni et al. showed that β 3GnT-8 overexpression and silencing respectively increases and decreases levels of HG-CD147 in LoVo metastatic colon cancer cell line revealing that HG-CD147 glycans consists of β 1,6-branched poly-LacNAc chains [51]. In parallel, β 3GnT-8 is overexpressed in 5-FU resistant colon cell line SW620 compared to parental sensitive cells and knockdown of β 3GnT-8 resensitizes cells to 5-FU-mediated apoptosis. However, the underlying mechanism leading to 5-FU resistance is unknown [53]. Recent findings suggest that glycosylated CD147 plays an essential role in multidrug resistance mechanism. CD147 is associated with CRC stem cells (CSC) [54], a minor cell population characterized by a slow rate of proliferation, an undifferentiated phenotype, a self-renewal potential and the capacity to generate differentiated progeny [55]. The longevity of CSC renders them more vulnerable to accumulate DNA damages and epigenetic alterations that may promote the proliferation of heterogeneous and aggressive cell phenotypes [55, 56]. Furthermore, some CSC can be found in hypoxic tumor niches distant from functional blood vessels which favor the maintenance of their undifferentiated state and exposed them to suboptimal drug concentrations [57]. In this sense, CSC appear to be more resistant towards chemotherapy than more proliferative progenitors coexisting within the tumor. It

was shown that CD147 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) [58], a trans-differentiation process by which epithelial-polarized cells acquire a mesenchymal phenotype and generate some cancer cells with stem-like cell properties [59, 60] (Figure 4D). Silencing CD147 sensitized cells to chemotherapeutic reagents including 5-FU [58], oxaliplatin [61] gemcitabine, cisplatin and docetaxel [54]. We may hypothesize that stimulation of the EMT by HG-CD147 leads to the formation of a pool of slowly-proliferative chemoresistant CSC. The therapy actually envisaged to inhibit this resistance mechanism is to specifically recognize and eliminate CSC [62, 63]. Thus, HG-CD147 may constitute a potential chemoresistance biomarker useful for identifying and therapeutically targeting CSC.

N-glycosylation alterations in colorectal cancer: a cause of drug resistance

Increased terminal sialylation of branched N-glycans is a common feature of cancer. ST6GalT-1 is a Golgi enzyme that catalyzes the transfer of the sialic acid Neu5Ac to the terminal galactose of N-glycans (Figure 1). ST6GalT-1 expression and global α 2,6-sialylation are up-regulated in CRC [64] (Figure 2) and in many other cancers [65]. Ras oncogene that transcriptionally drives ST6GalT-1 expression is mutated in 50% of CRC leading to the glycosyltransferase expression increase

[66]. ST6GalT-1 expression is positively correlated with metastatic potential of colon cancer cells [67, 68], CSC markers expression [69] and poor prognostic [70]. ST6GalT-1 enhances migration and invasion properties of tumor cells. On the one hand, the enzyme activates the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt mitogenic signaling pathway *in vitro* [71] and *in vivo* [72] by targeting integrins and potentially some RTK. On the other hand, forced α 2,6-sialylation of β 1 integrin subunit enhances its activity and subsequent cell migration by improving extracellular matrix (ECM)/cytoskeleton interactions [68].

Accumulating studies showed that ST6GalT-1 displays anti-apoptotic activities. First, it has been reported that ST6GalT-1 regulates apoptosis signaling in response to galectins [73]. In this way, overexpression of ST6GalT-1 and α 2,6-sialylation of β 1 integrins prevents galectin-3 (Gal-3) binding and pro-apoptotic activity in SW48 colon cancer cells (Figure 4C). Intriguingly, mice tumor vessels exhibiting high levels of α 2,6-sialylation were more sensitive to anti-VEGF whereas ST6GalT-1 knockout mice lacking this modification resisted to anti-VEGF therapy [48]. Contrary to β 1,6-branched N-glycans, loss of α 2,6-sialylation may activate VEGF-like pathway by unmasking Gal-1-specific binding sites on ligands such as VEGFR-2 [48] (Table 1). Next to the galectin-mediating pathway, α 2,6-sialylation of EGFR decreased its EGF-mediated

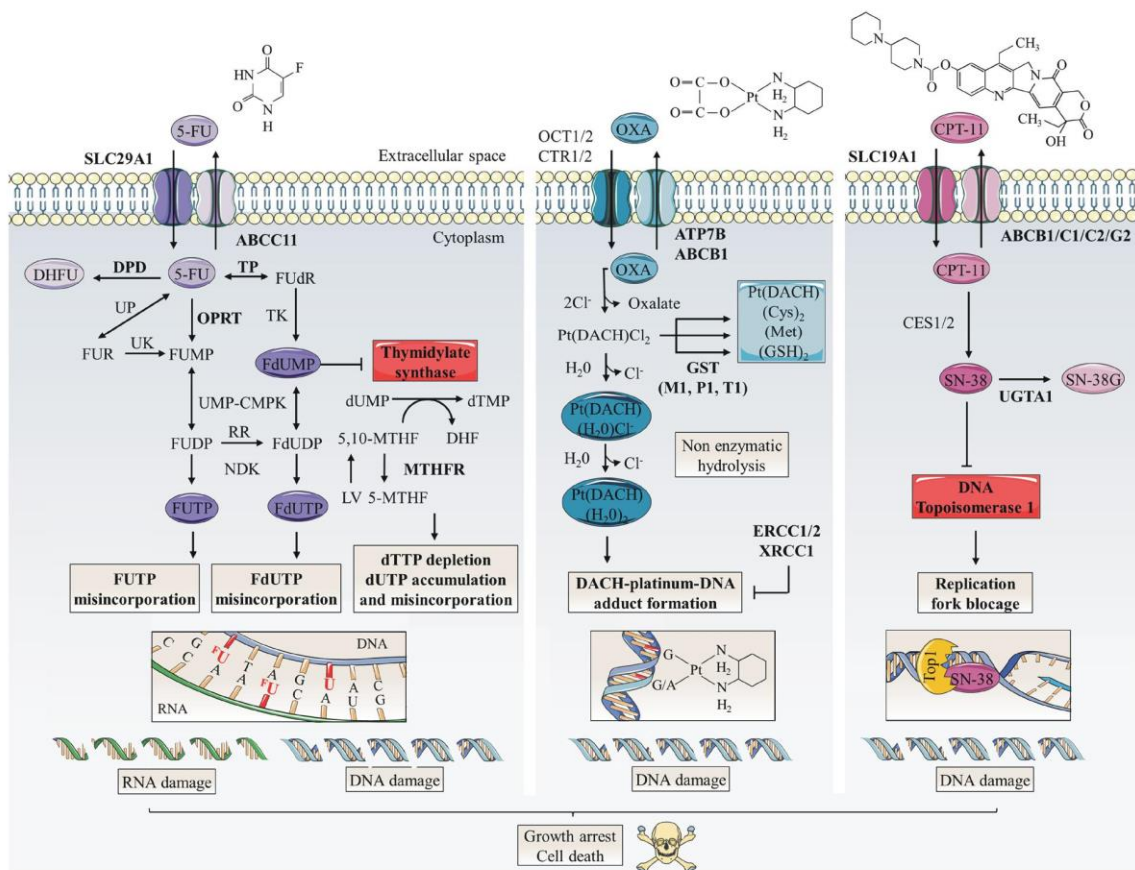


Figure 3: Schematic representation of mechanisms of action and resistance biomarkers in main colorectal cancer chemotherapies.

5-FU, oxaliplatin (OXA) and CPT-11 are the principal anti-colorectal cancer drugs. Arrow-headed lines indicate metabolite chemical conversion whereas bar-headed lines represent inhibition of chemical process (OXA pathway) or enzymes (5-FU and CPT-11 pathways). The anabolic pathways are dark-colored and the catabolic pathways are light-colored. Some of therapy resistance biomarkers are indicated in bold. 5-FU penetrates in tumor cell by nucleoside solute carrier (SLC) transporters such as SLC29A1. Then, 5-FU is converted to three main active metabolites: FdUMP, fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP) and fluorouridine triphosphate (FUTP) which acts as antimetabolites and pyrimidine analogues. FdUMP decreases the biosynthesis of pyrimidine nucleotides by inhibiting TS, the enzyme that catalyzes the rate limiting step in DNA synthesis by catalysing the reductive methylation of deoxyuridine monophosphate (dUMP) to deoxythymidine monophosphate (dTTP) using 5,10-methylenetetrahydrofolate (5,10-MTHF) as the methyl donor. By this way, FdUMP inhibits DNA synthesis and repair leading to DNA strand breakage and cell death notably by induction of apoptosis. 5-FU is also incorporated into DNA (via FdUTP) or RNA (via FUTP), leading to other cytotoxic actions including DNA fragmentation and decrease in protein synthesis. LV expands the intracellular pool of 5,10-MTHF and increases the toxicity of 5-FU. DPD mediates the conversion of 5-FU to non-active dihydrofluorouracil (DHFU). 5-FU catabolism also includes efflux of metabolites by ABC transporters such as ABCB1. TS and OPRT over-expressions are major molecular mechanism of 5-FU resistance. OXA, a third generation of alkylating platinum agent, is transported mainly by organic cation (OCT1/2) and copper (CTR1/2) transporters. On the contrary, P-type ATPase (ATP7A/B) transporters and ABC transporters promote its efflux. Inside the cell, displacement of the labile oxalate and non-enzymatic hydrolysis promotes the conversion of OXA in active metabolites such as monoquo-1,2-diaminocyclohexane (DACH) platinum and diaquo-DACH platinum. These products alkylate DNA leading to G/G or G/A intra-strand crosslinks which, if not repaired, will block both DNA replication and transcription leading to apoptosis. Hydrophobicity and bulkiness of the DACH ring prevents the MMR proteins from binding to OXA. Excision repair cross-complementation 1 and 2 (ERCC1/2) and X-ray repair cross complementing 1 (XRCC1) are involved in repair of DNA adducts. Cellular detoxification processes include metabolites targeting for excretion by conjugation of aequated compounds to cysteine (Cys), methionine (Met) or GSH. In particular, conjugation of GSH is catalysed by GST (-mu GSTM1, -pi GSTP1 and -theta GSTT1). CPT-11 is transported by SLC transporters such as SLC19A1. Inside the cell, CPT-11 is converted into the active SN-38 by carboxylesterases 1 and 2 (CES1/2). SN-38 binds and stabilizes its target DNA Top1 responsible for supercoiled DNA relaxation during replication and transcription. SN-38 inhibits the relegation step and the collision of the SN-38/Top1 complex with the moving DNA replication fork leads to irreversible arrest of the replication fork and double DNA stranded breaks. This damage causes cell-cycle arrest and apoptosis. CPT-11 resistance mechanisms include SN-38 glucuronidation in inactive SN-38 glucuronide (SN-38G) by uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1 polypeptide A1 (UGT1A1) and overexpression of ABC transmembrane transporters (ABCB1, ABCB1, ABCB2 and ABCG2) responsible for efflux of SN-38. 5-MTHF: 5-methyltetrahydrofolate; Cl-: chlorine; DHF: dihydrofolate; dTTP: deoxythymidine triphosphate; dUTP: deoxyuridine triphosphate; FdUDP: fluorodeoxyuridine diphosphate; FU: fluorouracil; FUDP: fluorouridine diphosphate; FUMP: fluorouridine monophosphate; FUR: fluorouridine; MTHFR: methylene tetrahydrofolate reductase; NDK: nucleoside-diphosphate kinase; Pt(DACH)(Cl2): dichloro-DACH platinum; Pt(DACH)(H2O)2: diaquo-DACH platinum; Pt(DACH)(H2O)Cl-: monoquo-DACH platinum; RR: ribonucleotide reductase; UK: uridine kinase; UMP-CMPK: uridine monophosphate/cytidine monophosphate kinase; UP: uridine phosphorylase.

tyrosine phosphorylation activity and promotes resistance to gefitinib, an EGFR-targeted TKI (Figure 4B; Table 1). The cytotoxic effect of gefitinib is respectively decreased and increased in CRC cell lines overexpressing or deficient in ST6GalT-1 [67]. Alpha2,6-sialylation of EGFR could prevent its dimerization and activation as it was shown that sialidase increased EGFR dimer formation upon EGF treatment in lung cancer cells [74]. Interestingly, EGFR gene copy number is strongly positively-associated with sensitivity to EGFR TKI in CRC [75, 76]. Together, these results indicate that active EGFR is necessary to effective response to TKI. Due to heterogeneous scoring systems and technical obstacles, estimation of EGFR gene copy number as EGFR TKI predictive biomarker is still unpractical in clinical practice [76]. Alpha2,6-sialylation of EGFR could be envisaged as another potential predictive biomarker. In addition, α 2,6-sialylation could inhibit apoptosis initiated by the Fas ligand (FasL) binding to Fas cell death receptor (FasR) [77]. In fact, ST6GalT-1 mediated α 2,6-sialylation of FasR prevents the formation of active death inducing signaling complex (DISC) by blocking the binding of the Fas-associated adaptor protein (FADD) to the FasR death domain and inhibits the internalization of stimulated FasR necessary for induction of apoptosis (Figure 4C; Table

1). It was similarly reported that ST6GalT-1-mediated sialylation of the tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) protects macrophages against TNF- α -induced apoptosis [78]. Cytotoxic effects of anti-cancer drugs are generally mediated by the activation of intrinsic and extrinsic pro-apoptotic cascades in response to DNA damages or other cellular injuries [79]. Anti-CRC drugs activate the extrinsic apoptotic pathway via up-regulation of expression and/or activation of death-receptors and downstream actors [80]. Evasion of apoptosis mediated by increased expression of anti-apoptotic proteins and decreased expression of pro-apoptotic proteins contributes to drug resistance [79]. Some targeted agents are currently evaluated to restore the impaired apoptotic signals in CRC. These include death receptor ligands or agonists, B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) antagonists, Bcl-2 homology 3 (BH3) mimetics or inhibitors of apoptosis (IAP) antagonists in monotherapy or in combination with standard chemotherapy regimens [80, 81]. Detection of aberrant N-glycosylation on inactive death receptors could allow choosing an appropriate therapeutic strategy by favoring targeted therapies against downstream effectors in the extrinsic apoptotic pathway such as IAP. Finally, ST6GalT-1 expression is restricted to stem cell compartment at the base of colonic crypts in normal

Table 1: Glycosylations involved in anti-cancer drug response of colorectal cancer

Types of glycosylation	Glycosyl-transferases involved	Targets	Functional roles	Drug responses	Cell types/tissues	References
β 1,6 branching of <i>N</i> -glycans	GnT-5	VEGFR-2	Promotes pro-angiogenic Gal-1 binding	Decreases anti-VEGF antibody sensitivity	HUVEC1 cells and transgenic mice models	[48]
Poly-LacNAc chain on <i>N</i> -glycans	β 3GnT-8	-	-	Decreases 5-FU sensitivity	SW6202 cells	[53]
α 2,6-linked sialylation of <i>N</i> -glycans	ST6GalT-1	VEGFR-2	Prevents pro-angiogenic Gal-1 binding	Increases anti-VEGF antibody sensitivity	HUVEC1 cells and transgenic mice models	[48]
		β 1 integrin	Prevents pro-apoptotic Gal-3 binding	Decreases Gal-3 sensitivity	SW482 cells	[73]
		FasR	Prevents formation of active DISC	Decreases FasL sensitivity	HD32 and SW482 cells	[77]
		EGFR	Decreases EGF-mediated phosphorylation and activation	Decreases gefitinib sensitivity	SW4802, HT-292, HCT-1162 and SW482 cells	[67]
		-	Increases cancer stem cells population	Decreases irinotecan sensitivity	HD32 and SW9482 cells	[69]
Mucin-type <i>O</i> -glycosylation	ppGalNAcT-3	-	-	Increases TRAIL sensitivity	DLD-12 and C1702 cells	[113]
	ppGalNAcT-14	-	-	“TT” genotype negatively correlated with oxaliplatin sensitivity	Patients with stage III colorectal cancer (CRC)	[115]
Lewis blood group antigen structures	FucT-1/FucT-2	-	-	Decreases 5-FU sensitivity	REG3 and PRO3 cells	[122]
		-	-	-	REG3 and PRO3 cells	[123]
	-	-	-	DLD-12 cells	[124]	
	FucT-3	-	-	Expression of FUT-3 positively correlates with TRAIL sensitivity	CRC cell lines2 panel	[113]
	FucT-6	-	Increases DISC activation of capase-8	Increases TRAIL sensitivity	DLD-12 and C1702 cells	[113]
-	-	-	-	Expression of sLex negatively correlates with irinotecan/5-FU/leucovorin therapy sensitivity	Patients with advanced or recurrent CRC	[131]
<i>O</i> -GlcNAcylation	OGT	-	Interacts with TET1 and SET1/COMPASS complex on promoter region of Nrf2	Decreases 5-FU sensitivity	SNUC52 cells	[161]
		-	-	OGT expression negatively correlates with FdUMP sensitivity	NCI-602 cells	[165]

- : not defined; 1: human umbilical vein endothelial cells; 2: human colorectal carcinoma cells; 3: rat colorectal carcinoma cells.

colon tissue and correlated with aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) stem cell marker [69]. In colon carcinoma cell lines, ST6GalT-1 expression also correlates with CD133/ALDH1 positive CSC [69]. Conversely, knockdown of ST6GalT-1 decreases the proportion of CSC. Irinotecan resistant cells show an increase in expression and activity of ST6GalT-1 and a greater proportion of CSC compared to parental sensitive cells (Figure 4D). In this study, the authors regard ST6GalT-1 as a CSC potential marker.

Mucin-type *O*-glycosylation profile alterations in colorectal cancer: a barrier to drug therapy

Truncated mucin-type *O*-glycosylation in CRC

High density of truncated mucins is another common tumor-associated carbohydrate modification. Compared to normal colon mucins which exhibit the four core structures (Figure 1) and mainly core-3 based *O*-glycans [82], during malignant transformation mucins present a dramatic decrease of core 3 and core

4 and an increase of T antigen. These modifications result from the deregulation of the glycosyltransferases involved in the building of the different structures [31–33] (Figure 2). The Sda blood group epitope bound to *O*-glycans core-3 is mostly expressed in healthy colorectal tissue but not in CRC cells. Accordingly, the expression of β 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (β 4GalNAcT-2) which synthesizes Sda epitope is decreased in CRC [83]. While T antigen is considered as an oncodevelopmental cancer-associated antigen and is overexpressed early during colon tumorigenesis, Tn and sTn antigens overexpression correlates with advanced and poorly differentiated colon carcinomas and is associated with a poor clinical outcome [84]. Moreover, mucin-type C2GnT (C2GnT-M) expression, encoded by GCNT3 gene, is down-regulated in early stage colon cancer in comparison to normal colon tissues [85]. Its overexpression inhibits cell growth, adhesion, migration and invasion and induces apoptotic cell death [86]. Recently, González-Vallinas et al. revealed that 5-FU induces a significant dose-dependent overexpression

of GCNT3 in sensitive parental SW620 colon cancer cell line but not in resistant one reinforcing the role of C2GnT-M in inhibition of tumor progression [85].

Drug resistance associated with dysregulation of expression, glycosylation and subcellular localization of mucins

Normal colon expresses highly MUC2, weakly MUC1, MUC3 and MUC4 and rarely MUC5AC, MUC5B and MUC6 [87–89]. Compared to normal tissues, hypoglycosylated MUC1 is overexpressed all over the surface of cancer cells and correlates with aggressiveness of carcinomas [90] whereas a decrease of MUC2 expression was described in colorectal adenocarcinoma but not in mucinous carcinomas [91, 92]. Recent studies demonstrate a relationship between the CRC classification and mucins expression pattern. According to genetic pathways involved, CRC follow the chromosomal instability (CIN) pathway with loss of heterozygosity (LOH) of tumor suppressor genes (such as adenomatous polyposis coli (APC) and tumor protein 53 (TP53)) and activation of proto-oncogenes (such as V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)) or the microsatellite instability (MSI) pathway with frequent aberrations in the DNA mismatch repair (MMR) machinery [93]. A strong correlation was reported between a mucinous phenotype (overexpression of MUC2, MUC5AC and MUC6) and sporadic MSI-high tumors characterized by V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (BRAF) mutation in which valine (Val, V) is substituted for glutamic acid (Glu, E) at residue 600 (p.V600E) and an extensive DNA methylation pattern also known as the CpG island methylator phenotype (CIMP) [94–96]. Increased secreted mucins expression can be attributed to promoters hypomethylation [95] and/or activation of the EGFR-RAS-RAF pathway [97].

Lesuffleur et al. showed that, compared to parental sensitive HT-29 cells, the 5-FU resistant mucus-secreting subclone overexpressed MUC1, MUC2 and MUC4 and underexpressed MUC3 at the transcript level [98]. Interestingly, cells resistant to methotrexate exhibit a different profile of mucins expression [98]. The increased level of MUC2 transcript in 5-FU resistant HT-29 cells has been further confirmed by [99]. Patients suffering mucinous adenocarcinoma and receiving 5-FU show a diminished clinical response compared to those with nonmucinous tumors; this discrepancy likely results from a significant higher expression of TYMS gene encoding TS [100] (Figure 3). Mucinous tumors overexpress also glutathione S-transferase pi 1 (GSTP1) gene [100] encoding enzyme involved in the detoxification of platinum agents by glutathione (GSH) conjugation (Figure 3) expecting a weak response to oxaliplatin-treatment. CRC classified as MSI tumors showed higher mutation frequency and expression of TYMS than microsatellite-stable (MSS) tumors [101, 102] suggesting a link between MSI status, mucinous profile and chemoresistance. The

overexpression of *O*-glycosylated membrane-bound mucins can generate steric hindrance and mask surface antigens or decrease absorption of chemotherapy [103] (Figure 4A). In normal colon, there is no or a faint detection by monoclonal antibodies of the polypeptidic backbone of MUC1 which is masked by high density of long and complex mucin-type *O*-glycan chains. However, in CRC cells, MUC1 exhibits much shorter carbohydrate side-chains such as Tn and sTn allowing its immunodetection [104]. This aberrant glycosylation leads to MUC1 clathrin-mediated endocytosis [105]. It is also thought that MUC1 hypoglycosylation unmasks its polypeptidic core promoting MUC1 amino-terminal (N-ter) (MUC1-N) subunit proteolytic cleavage and release by extracellular proteases [105, 106]. The internalization of MUC1 carboxy-terminal (C-ter) (MUC1-C) subunit may initiate oncogenic signaling [105, 106]. Moreover, an increase in negatively charged sialic acid residues on MUC1 may contribute to metastasis progression by interfering with cell-cell adhesion. MUC1 confers resistance to reactive oxygen species (ROS)-induced apoptosis [107], hypoxia [108] and chemotherapeutic drugs [109]. Outer mitochondrial membrane localization of MUC1-C downregulates cisplatin-induced release of mitochondrial pro-apoptotic factors, activation of caspase-3 and of the intrinsic apoptotic pathway *in vitro* and *in vivo*, in part, by stabilization of the mitochondrial membrane potential [109] (Figure 4C). MUC13 is also overexpressed in the cytoplasmic compartment of CRC carcinomas [110]. Its silencing sensitizes colon cancer cell lines to different DNA damaging agents including 5-FU, oxaliplatin, vincristine and doxorubicin *in vitro*, and suppresses tumor growth *in vivo* by decreasing subsequent activation of the nuclear factor-kappa B (NF- κ B) survival pathway [110]. However, the *O*-glycosylation profile of these mucins in CRC tumors has not been studied yet. Like for MUC1, an aberrant *O*-glycosylation of MUC13 may affect its subcellular localization and favor to activate oncogenic pathways. In this sense, it was speculated that overexpression of ppGalNAcT-14 contributes to ovarian carcinoma migration through truncated *O*-glycosylation of its substrates including MUC13 [111].

ppGalNAcTs: key enzymes involved in multidrug resistance

Treatment of CRC cells with benzyl-2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside (benzyl- α -GalNAc), a structural analog of α -GalNAc linked to serine or threonine residue which competitively inhibits core 1 *O*-glycans extension, or benzyl- α -GalNAc-derived oligosaccharides has been shown to induce apoptosis [112] and reduce sensitivity to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [113]. While knockdown of ppGalNAcT-3 decreases sensitivity of CRC cells to TRAIL (Table 1), expression of ppGalNAcT-14 correlates with responsiveness in pancreatic carcinoma, non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) and melanoma.

Notably, it was shown that ppGalNAcT-14 catalyzes the *O*-glycosylation of death receptors 4 and 5 (DR4 and DR5) in PSN-1 pancreatic cancer cells leading to TRAIL-induced receptors clustering and apoptosis. This *O*-glycosylation may stabilize death receptors in the plasma membrane or enhance their ligand-binding properties. In hepatocellular carcinoma, the single nucleotide polymorphism (SNP) marker rs9679162 “TT” genotype located in the ppGalNAcT-14 gene is associated with a favorable outcome in 5-FU, mitoxantrone and cisplatin combination chemotherapy treated patients [114]. It is suggested that ppGalNAcT-14 enhances sensitivity to therapy linked to TRAIL-mediated apoptosis through modulation of DR4 and/or DR5 *O*-glycosylation. However, biological effect of this genotype on the expression or activity of ppGalNAcT-14 is not yet known. In contrast, ppGalNAcT-14 “TT” genotype is correlated with poor outcome and tumor invasion in advanced CRC patients treated with oxaliplatin-based chemotherapy [115] (Table 1). The prognostic value of ppGalNAcT-14 “TT” genotype seems to be tissue and/or chemotherapy-dependent reflecting likely the involvement of different

target glycoproteins.

Altered fucosylation/sialylation profile of Lewis antigens associated with drug resistance in colorectal cancer

Lewis carbohydrate determinants reside in glycolipids and glycoproteins at the surface of most epithelia (Figure 1) and are overexpressed in many carcinomas [12] including colon cancer [116]. Normal colon mucosa expresses complex glycans such as disialyl-Lea and sialyl-6-sulfo-Lex at higher levels whereas the expression of sLea and sLex is quite low [117, 118]. The expression of these structures is inverted in CRC where increase of sLea and sLex amounts is associated with advanced tumors, metastasis occurrence and poor prognosis [119, 120]. The interaction of these antigens with the adhesion molecule E-selectin in cytokine-activated endothelial cells has been proposed to play a role in the invasion and metastasis of cancer cells [121]. Leb and Ley are considered as typical oncofetal antigens in CRC (Figure 2) due to increased activity of $\alpha 2$ FucT

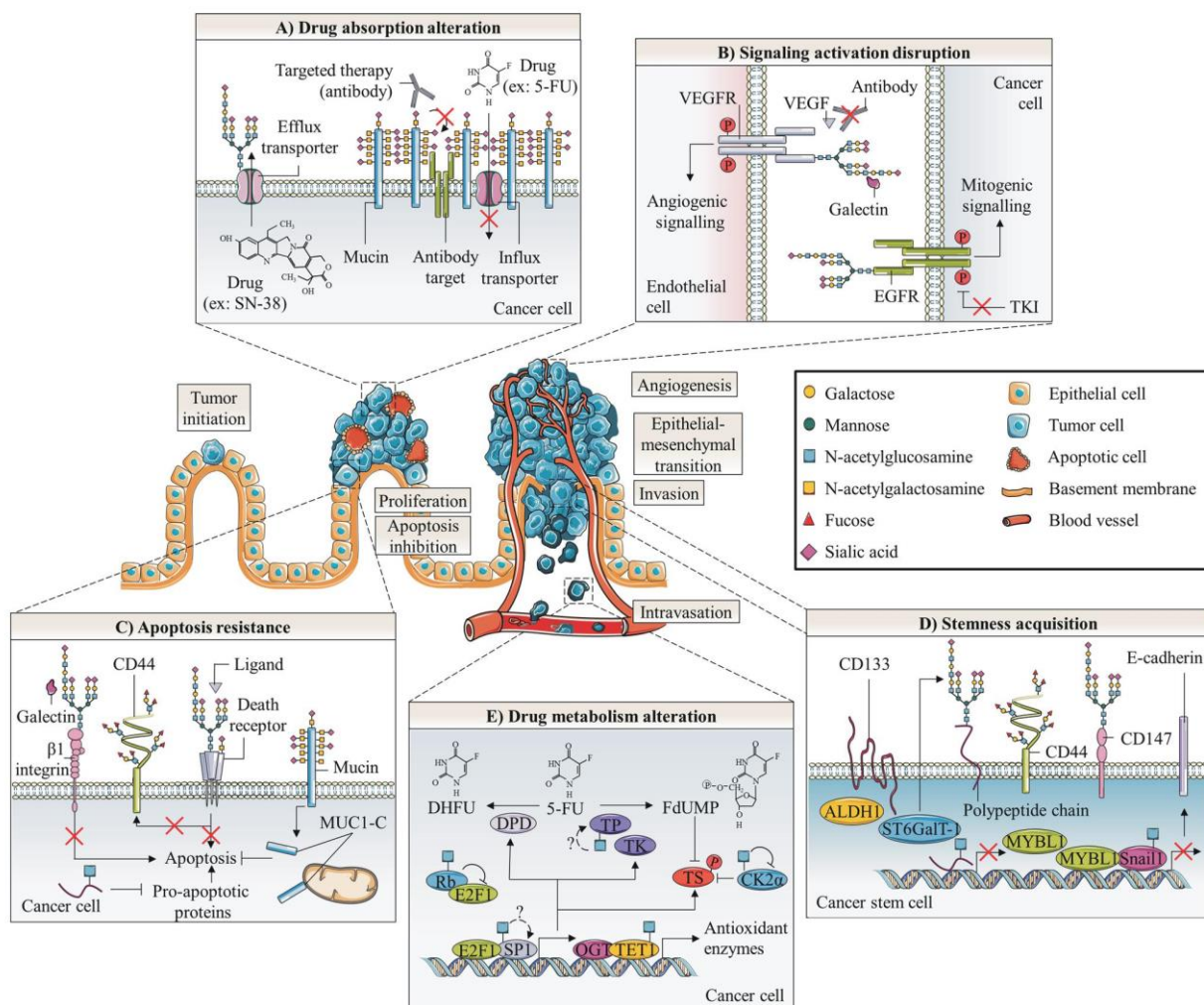


Figure 4: Glycosylation roles in anticancer therapy resistance of colorectal cancer. Abnormal glycosylation associated with colorectal cancer is involved in cancer emergence and progression as well as in different anticancer therapy resistance mechanisms. These later include altered drug absorption (A), signaling activation disruption (B), apoptosis resistance (C), cell stemness acquisition (D) and altered drug metabolism (E). A) Mucins could generate steric hindrance, mask surface antigen of targeted therapy and decrease absorption of chemotherapy. In contrast, *N*-glycosylation can stabilize transporters responsible for efflux of chemotherapy drugs. B) On endothelial cells, aberrant β 1,6-GlcNAc bearing-*N*-glycans of VEGFR could promote its interaction with galectins and activate angiogenic signaling in the absence of ligand resulting in decreased efficacy of anti-VEGF treatment. In tumor cells, the presence of α 2,6-sialylated terminal structure on EGFR could also decreased activity of the receptor and efficacy of TKI. C) Abnormal glycosylation of β 1 integrin prevents binding and pro-apoptotic activity of Gal. Both altered *N*- and *O*-glycosylation of cell death receptors TNFR1, FasR, DR4 and DR5 inhibit induction of apoptosis. Fucosylation of Lewis antigen structures on CD44 could protect this CSC biomarker from proteolytic cleavage occurring in early steps of apoptosis. Truncated *O*-glycosylation of mucins promotes their intracellular accumulation and outer mitochondrial localization of MUC1-C could affect activation of the intrinsic apoptotic pathway. *O*-GlcNAcylation regulates expression of pro-apoptotic proteins. Altered *O*-GlcNAcylation could therefore induce resistance to apoptosis. D) The EMT process is supposed to generate CSC which have a slow proliferation rate and are thus less sensitive to chemotherapies. CRC CSC biomarkers CD44 and CD147 can be glycosylated. Expression of ST6GalT-1 is correlated with expression of ALDH1 and CD133 stem cell markers and proportion of CSC. The CRC CSC compartment could be regulated by the *O*-GlcNAcylation mediated-epigenetic down-regulation of MYBL1, a transcription activator of E-cadherin. *O*-GlcNAcylation also stabilizes the E-cadherin suppressor Snail1, essential for the loss of adherens junctions associated with EMT. E) *O*-GlcNAcylation may take fundamental part in regulation of 5-FU metabolism in colon cancer cells. OGT interacts with TET1 on promoter regions to activate transcription of antioxidant enzymes such as Nrf2. *O*-GlcNAcylation regulates both transcription factors Sp1 and E2F-1, which regulate a myriad of genes involved in nucleotide synthesis including enzymes involved in 5-FU catabolism and anabolism such as DHFR, TK and TS. E2F-1 is sequestered and inactivated by binding to hypo-phosphorylated and *O*-GlcNAcyated Rb during early G1 phase of cell cycle. On the other hand, *O*-GlcNAcylation of E2F-1 was found to regulate its stability and its transcriptional activity but the specific biological effect in colon cancer cells has not been reported yet. TP was also found to be *O*-GlcNAcyated in breast tumors but the functional role of this glycosylation has not been studied. Finally, a Yin-Yang relation between phosphorylation and *O*-GlcNAcylation is expected to affect activity of TS, the target of active metabolite FdUMP. *O*-GlcNAcylation at Ser347 appears to decrease Thr344 phosphorylation and stability of CK2 α . CK2 α is responsible for the phosphorylation at Ser124 and the decrease of catalytic activity of TS.

[35, 36].

Several studies describe a link between expression of fucosylated antigens and sensitivity of cancer cells to apoptosis. First, Goupille et al. showed that ectopic expression of rat α 2FucT FTA or FTB cDNA, respectively homologous to human FucT-1 and FucT-2, increased levels of α 1,2-fucosylated structures, tumorigenicity and resistance to apoptosis in spontaneously regressing REG rat colon adenocarcinoma cell clone [122]. Inversely, transfection of spontaneously tumorigenic PRO cells forming progressive tumors and presenting surface α 1,2-fucosylated antigens with FTA antisense cDNA sensitized PRO cells to cell death (Table 1). An interplay between expression of H2 structures, the synthesis intermediates for Ley and Lex antigens (Figure 1), and cell response to 5-FU has also been observed [123]. In one hand, 5-FU treatment induces an increase of both α 2FucT activity and H2-type structures *in vitro* and *in vivo*. On the other hand, FTA knockdown and overexpression respectively increased and decreased cells sensitivity to 5-FU (Table 1). The involvement of α 1,2-fucosylated antigens in the resistance to 5-FU treatment was further confirmed [124] (Table 1). One of the major identified glycoproteins carrying the H2-type determinant is the CD44 adhesion molecule, a putative cancer stem cell marker [55, 123]. Normal colon cells express the standard form of CD44 (CD44s) whereas cancer cells may also express CD44 variants (CD44v) bearing supplementary domains underlying new oncogenic functions. In colon cancer, expression of CD44s is linked to EMT [125] and expression of

CD44v3 and v6 is associated with metastatic phenotype [126]. Depletion of the CD44s by proteolytic cleavage in early steps of Fas-triggered apoptosis contributes to loss of cell-cell and cell-matrix anchorage [127]. Moreover, resistant HT-29 and HCT-116 colon cancer cells to 5-FU, oxaliplatin and SN-38 showed a highest expression of CD44s compared to sensitive parental cells [128]. Cordell and collaborators speculated that increased expression of α 2FucT could participate in acquired-drug resistance by fucosylating CD44 and protecting it from proteolytic cleavage or strengthening cell adhesion [123] (Figure 4C). Yazawa et al. also found that 5-FU resistant DLD-1 colon carcinoma human cells have α 2FucT and α 3FucT higher activities and less of α 4FucT activity [124]. Treatment of these cells with the α 2FucT substrate phenyl β -galactoside decreased immunodetection of Ley, Leb and H2-type structures with YB-2 anti-fucosylated antibody and increased sensitivity to 5-FU suggesting the involvement of Leb and/or Ley antigens in the resistance mechanism. In parallel, expression of α 3/4FucT FucT-3 and α 3FucT FucT-6 correlates with TRAIL sensitivity and it was shown that FucT-6 knockdown reduced DISC activation of pro-apoptotic caspase-8 in DLD-1 cells [113] (Table 1). Moreover, it was demonstrated that interferon gamma (IFN γ) and anti-Fas antibody treatment-mediated apoptosis induce an increase of transcript level of FucT-4, of α 2FucT and α 3FucT activities, and of Lex and Ley antigens at the cell surface [129]. Contradictory results showed that expression of Lex and Ley antigens was significantly diminished in colon cells treated by anti-Fas apoptosis

inducers [130]. Finally, Yanagisawa et al. revealed that responder CRC patients to modified irinotecan/5-FU/LV therapy harbor significant lower expression of sLex on core 2 branched mucin-type *O*-glycans [131] (Table 1). The nature of the fucosylated-antigens expressed at the cell surface of colorectal cancer cells might impact differently the mechanism of drug-induced apoptosis.

***O*-GlcNAcylation and drug resistance in cancer: TERRA INCOGNITA**

O-GlcNAcylation is a recently discovered glycosylation whose role in cancer has been well studied in contrast to its involvement in drug response. In the following section, we will give a brief overview of what is known about *O*-GlcNAcylation in cancer before discussing the link with drug resistance.

Upregulation of OGT and *O*-GlcNAcylation: impact in cancer

An increased *O*-GlcNAcylation has been observed in many cancers [28, 132] including colon [133]. In colon cancer cells, the increased level of *O*-GlcNAcylation correlates with an overexpression of nucleocytoplasmic OGT [134, 135]. Contradictory findings are published concerning OGA expression. While Mi et al. did not report any change in OGA expression between colon cancer cells and normal adjacent tissues [133], Phueaouan et al. [136] and us [134, 135] observed instead an overexpression of OGA *in vitro* and *in vivo*. A fine cross-regulation between OGT and OGA expression was reported by different groups but the underlying mechanism by which each enzyme regulates the expression of the other is not fully understood. *O*-GlcNAcylation is an important regulator of cell proliferation, survival and migration especially through its interplay with phosphorylation [137]. *O*-GlcNAcylation targets and regulates the activity or the fate of oncoproteins such as β -catenin [134, 138–140], c-Myc [141, 142] and forkhead box protein M1 (FoxM1) [143], and of tumor suppressors like p53 [144] and the retinoblastoma protein (Rb) [145]. *O*-GlcNAcylation is known to promote EMT in CRC. Beta-catenin is mutated in 10% of CRC [146] and its *O*-GlcNAcylation is suggested to participate in colorectal tumorigenesis in a context of glucose metabolism deregulation [147]. An elevation of *O*-GlcNAcylation in colon cancer cells reduced phosphorylation and ubiquitination of β -catenin increasing therefore its stability, reducing its localization to adherens junctions and enhancing its nuclear accumulation and activation [134, 138, 139]. Snail1 is a transcriptional repressor of epithelial cadherin (E-cadherin) whose expression is associated with EMT. Snail1 is also stabilized by *O*-GlcNAcylation in colon cancer cells [148]. Reduced levels of *O*-GlcNAcylation diminished the colorectal CSC compartment *in vivo* by overexpression of the epigenetic regulation of MYB proto-oncogene like

1 (MYBL1), a transcriptional activator of E-cadherin [149] (Figure 4D). The key role of *O*-GlcNAcylation of other EMT actors has also been well highlighted [150, 151]. The comprehension of the mechanisms underlying the role of *O*-GlcNAcylation in cell apoptosis remains at its beginnings. However, some data give evidence that OGA and OGT isoforms play different roles in cell death signaling [152]. Thus, very few studies have examined specifically the role of *O*-GlcNAcylation in regulation of CRC cell death signaling. Elements of answer may be suggested according to studies in other cell types. First, an increase of global *O*-GlcNAcylation level was observed in Cos-7 green monkey kidney cells in response to cellular stresses strengthening the idea that *O*-GlcNAcylation enhances survival by regulating several cell death pathways [153, 154]. Reducing *O*-GlcNAcylation in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cell lines inhibits constitutive NF- κ B activity and induces apoptosis [155] while, increased *O*-GlcNAcylation protects BxPC-3 pancreatic adenocarcinoma cells against death [155]. Interestingly, OGT knockdown did not trigger apoptosis in non-transformed pancreatic duct epithelial (HPDE) cells. Similarly, OGT knockdown induces apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells but not in MCF-10A immortalized mammary epithelial cells through hypoxia-inducible factor 1- α (HIF-1 α) degradation, decrease of glycolysis and ER stress pathway activation [156]. Yang et al. showed that p53 - the guardian of the genome - is stabilized by *O*-GlcNAcylation in MCF-7 breast carcinoma cells [144]. Fardini et al. suggested a dual impact of *O*-GlcNAcylation on p53 depending upon the physiopathological context. The glycosylation promotes tumor suppressor activity of wild-type p53 and amplifies the pro-oncogenic activity of gain-of-function mutant form of p53 [28]. TP53 mutation status has been correlated to CRC response to drug therapy. In particular, the non-synonymous exonic SNP rs1042522 resulting in Pro substitution at codon 72 (P72) enhances the function of the protein. In fact, p53-P72 mutant has an increased capability to DNA binding and transcription activation of target genes. Interestingly, CRC patients carrying this gain-of-function mutation benefited most from 5-FU-based chemotherapies [157]. Recently, Gokare et al. demonstrated that p53-P72 repressed expression of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), the rate-limiting enzyme in the 5-FU catabolism (Figure 3), following TS inhibition [158]. Thus, *O*-GlcNAcylation might play a role in 5-FU sensitivity by modulating activity of p53 wild-type and mutants.

The increasing number of evidences pointing out the crucial role of *O*-GlcNAcylation in the biological processes underlying tumorigenesis led to consider and then analyze this glycosylation and its related enzymes as potential actors of drug resistance.

O-GlcNAcylation and chemotherapy sensitivity

Several studies have correlated expression of OGT and chemotherapy sensitivity. OGT silencing increases the sensitivity to 5-FU of BCG-823 gastric cancer cell line by enhancing expression of p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA) and caspase-3 pro-apoptotic proteins [159]. In this sense, Pepe et al. showed in HepG2 hepatoblastoma cells that OGT stabilizes the transcriptional complex β -catenin/upstream stimulatory factor 1 (USF1) at the promoter of miR-483-3p, a microRNA responsible for transcription downregulation of PUMA [160]. Treatment with 2-deoxy-D-glucose (2-DG), a glucose-mimic inhibitor of glycolysis, reduces miR-483-3p expression and increases sensitivity to 5-FU-induced apoptosis. In 5-FU resistant SNUC5 colon cancer cells, OGT is overexpressed and interacts strongly with oxidative stress-activated ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1 (TET1) and histone H3 lysine 4 (H3K4) methyltransferase SET1/COMPASS (complex proteins associated with SET1) complex involved in the activation of gene expression [161]. O-GlcNAcylation is known to modulate recruitment, stability and activity of some chromatin regulators [162]. Particularly, OGT-mediated O-GlcNAcylation stabilizes TET1 [163] and OGT interacts preferentially with TET1 at gene promoters in close proximity of CpG-rich transcription start sites [164]. The multiprotein complex is recruited at the promoter region of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), a major transcription factor driving antioxidant enzymes expression; the upregulation of the transcription factor would be responsible for 5-FU resistance [161] (Figure 4E; Table 1). A genome-wide mRNA expression profiling of the National Cancer Institute NCI-60 human tumor cell lines screen, comprising seven different colon cancer cell lines, revealed that OGT expression is negatively correlated with sensitivity to fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP), the active metabolite of 5-FU responsible for TS inhibition (Figure 3; Table 1). However the authors did not find any correlation with fluorodeoxyuridine (FdUR), 5-FU, topotecan or irinotecan sensitivity [165]. In parallel, Temmink et al. analyzed gene expression of H630 colon cancer cell line resistant to trifluorothymidine (TFT), another thymidine analogue which shares the same 5-FU metabolic pathway to inhibit TS [166]. These resistant cells underexpressed thymidine kinase (TK) (Figure 3), human equilibrative nucleoside transporter (hENT also known as SLC29A) involved in anabolism of 5-FU and also OGT. A link between OGT expression and activation of anabolic pathways leading to formation of active FdUMP seems to occur. Inhibiting O-GlcNAcylation is a promising approach to improve the sensitivity of cancer cells to anti-cancer drugs. In the context of breast cancer, it has been shown that O-GlcNAcylation-increasing treatments reduce estrogen receptor α (ER α) expression and protect MCF-7 cells from death induced by tamoxifen, a chemical largely used as a

partial antagonist of the estrogen receptor in ER positive breast cancers [167].

O-GlcNAc regulation of resistance biomarkers

No mechanistic studies have been carried out to understand precisely the role of OGT in chemotherapy cell response. However, several studies revealed that clinical biomarkers of drug resistance [41, 42] can be either directly or indirectly regulated by O-GlcNAcylation. Specificity protein 1 (Sp1) and E2F transcription factor-1 (E2F-1), two key transcription factors that regulate a myriad of genes involved in nucleotide synthesis such as those coding dihydrofolate reductase (DHFR), TK and TS are controlled by O-GlcNAcylation (Figures 3 and 4E). E2F-1 is sequestered and inactivated by binding to hypo-phosphorylated and O-GlcNAcylated Rb during early G1 phase of cell cycle [145]. On the other hand, Sp1 was found to be O-GlcNAcylated in HT-29 colon cancer cells but the biological effect of the glycosylation was not reported [168] (Figure 4E). In breast cancer cells, O-GlcNAcylation of Sp1 regulates its stability and its transcriptional activity [169, 170]. In parallel, phosphorylation of TS at Ser124 by casein kinase 2 α subunit (CK2 α) decreases its catalytic activity [171] but by interacting with CK2 α Thr344 phosphorylation, O-GlcNAcylation at Ser347 decreases the stability of the kinase [172] (Figure 4E). Therefore, O-GlcNAcylation of CK2 α should indirectly increase catalytic activity of TS. Recently, O-GlcNAcylation of thymidine phosphorylase (TP), a key enzyme of 5-FU anabolism which catalyzes the formation of FdUR from 5-FU and deoxyribose-1-phosphate (dRib-1-P) (Figure 3), was highlighted by mass spectrometry analysis of O-GlcNAcylated proteins enriched on succinyl-wheat germ agglutinin (sWGA) beads. TP was found to be O-GlcNAcylated only in breast tumors compared to adjacent healthy tissues but the role of this glycosylation has not been studied yet [173] (Figure 4E). Finally, DNA topoisomerase 1 (Top1), the target of the irinotecan active metabolite SN-38 (Figure 3), is also modified by O-GlcNAcylation *in vitro* and *in vivo*; this PTM increases its supercoiled DNA helix relaxation activity [174]. Since it was reported a positive correlation between Top1 activity and irinotecan sensitivity [175], O-GlcNAcylation may increase irinotecan sensibility through modification of Top1.

CONCLUSIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

While the percentages of obese and diabetic individuals are progressing rapidly in industrialized countries, epidemiological data show these patients display an increased risk of colorectal cancer (CRC) [176] and relapse after chemotherapy treatment [177–179]. These disorders may increase the availability of precursors involved in the biosynthesis of the nucleotide

sugar donor uridine-5'-diphosphate-N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) through the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) and deregulate glycosylation processes. Oppositely, physical activity which has a blood glucose lowering effect appears to reduce risk of CRC recurrence following surgery combined with adjuvant chemotherapy [180]. However, glycosylation is a wide group of post-translational modifications and aberrant protein glycosylation is a common feature associated with cancer status and progression [27]. Thus, sialyl lewis x (sLea also referred to carbohydrate antigen CA 19-9) glycan and carcinoembryonic antigen (CEA) glycoprotein are serological tumor markers used actually to monitor CRC progression and disease recurrence [38].

The perspectives on emerging *N*-glycan-related anticancer therapies, along with new insights and challenges, are also currently being studied [181]. Recently, lectins have emerged as important biomedical tools that have been used in the development of anticancer agents. Several lectins have been shown to have the ability to discriminate between normal and tumor cells as a result of their different glycosylation patterns. Furthermore, the specific binding of lectins to cancer cells was shown to trigger mechanisms that promote the death of these abnormal cells. The review of de Oliveira Figueirôa and co-authors details the importance of lectins-carbohydrates interactions in cancer therapy and diagnosis [182]. They examine the use of nanoparticles exhibiting lectins (liposomes, solid lipid nanoparticles and other polymers) for anticancer drug delivery. They also discuss the development of drug delivery systems (alginate/chitosan microcapsules, alginate beads) carrying some antitumor lectins. In both cases (lectin-conjugated polymers or encapsulated lectins), these new pharmaceutical strategies improve intracellular delivery, bioavailability and cell targetability leading to enhanced therapeutic index and less side effects. In a very recent work, as sialoglycans overexpose the surface of cancer cells, sialic acid binding lectins have been explored for targeting cancer cells specifically. The potential of magnetic nanoparticles functionalized with wheat germ lectin (WGA) conjugates, so-called nanomagnetolectins, was thus successfully used as apoptotic targetable agents *in vitro* and *in vivo* for prostate cancer [183]. In addition to conventional drug therapy, lectin-based nanoparticles could specifically deliver to cancer cells gene or RNA interference (RNAi)-based therapies targeting key enzymes involved in therapy response [184]. In parallel, therapeutic carbohydrate-based vaccines approaches [185] are developed to target cancer-associated glycans in CRC, such as CEA [186–188] or Thomsen-nouvelle antigens on mucin 1 (Tn-MUC1) [189]. Same innovative strategies are under development to break the immunotolerance linked to their embryonic origin and/or low expression level in normal tissues. Consequently, immune effectors can be recruited to kill cancer cells overexpressing these aberrant glycans. As

highlighted in this review, because of evidences linking altered glycosylation and drug resistance in CRC, one could imagine to combine immunotherapy with standard drug therapy treatments to improve their efficiency. Targeting oncofetal glycans such as Leb, Ley or Thomsen-Friedenreich antigen (T antigen) could also be a promising approach because of their high cancer-specificity.

However, it was widely described that the success of chemotherapies collides with the appearance of highly drug-resistant cancer stem cells (CSC) carrying numerous molecular changes conferring them a capability to relapse as chemoresistant tumors [56]. A set of CSC biomarkers has been discovered but fail to be used in clinic because of their expression in adult stem cells. Therefore, identification and characterization of oncofetal stem cell markers, not expressed in adult tissue, becomes one of the more promising therapeutic strategy challenges for the highly specific CSC targeting. As previously reviewed [56], several studies that explored differential glycoproteins and glycolipids patterns between CSC and other cancer cells strongly suggest that the expression of short-chain *O*-glycans is correlated with CSC phenotypes. Ferreira et al., therefore came up with a novel model that includes evaluation of glycomics and glycoproteomics in comprehensive pan-omics approaches envisaging more effective treatment strategy incorporating accurate patient classification and therapy design.

The literature findings summarized in this review provide evidence that abnormal glycosylation is also involved in diverse anticancer therapy resistance mechanisms including apoptosis failure, signaling activation disruption, altered drug absorption and metabolism, and cell stemness acquisition. However, our knowledge on this field remains limited. Understanding specific glycosylation alterations involved in resistance to CRC therapy can lead to the development of better therapeutic strategies with new predictive biomarkers and targets combined with an adapted diet.

Abbreviations

5-FU: 5-fluorouracil; α 2FucT: α 1,2-fucosyltransferase; α 3/4FucT: α 1,3/4-fucosyltransferase; β 3GnT: β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase; ABC: ATP binding cassette; C2GnT: core 2 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase; C3GnT: core 3 β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase; C4GnT: core 4 N-acetylglucosaminyltransferase; CA: carbohydrate antigen; CEA: carcinoembryonic antigen; CMP-Neu5Ac: cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid; CRC: colorectal cancer; CSC: cancer stem cell; DISC: death inducing signaling complex; EGFR: epidermal growth factor receptor; EMT: epithelial-mesenchymal transition; ER: *endoplasmic reticulum*; Gal: galectin; GalNAc: N-acetylgalactosamine; GlcNAc: N-acetylglucosamine; GnT: N-acetylglucosaminyltransferase; HBP: hexosamine biosynthetic pathway; Le: Lewis; OGA: *O*-GlcNAcase;

OGT: O-GlcNAc transferase; poly-LacNAc: poly-N-acetyllactosamine; ppGalNAcT: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase; PTM: post-translational modification; s: sialyl; SN-38: 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin; ST3GalT: α 2,3-sialyltransferase; ST6GalNAcT: α -GalNAc α 2,6-sialyltransferase; ST6GalT: β -galactoside α 2,6-sialyltransferase; T antigen: Thomsen-Friedenreich antigen; Tn antigen: Thomsen-nouvelle antigen; TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand; TS: thymidylate synthetase; UDP-GalNAc: uridine-5'-diphosphate-N-acetylgalactosamine; UDP-GlcNAc: uridine-5'-diphosphate-N-acetylglucosamine; VEGF: vascular endothelial growth factor.

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

This work was supported by the “Ligue Contre le Cancer/Comité du Nord” the “Fondation ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer),” the Région Nord-Pas de Calais (Cancer Regional Program), the University of Lille and the “Centre National de la Recherche Scientifique”. The authors are also grateful to the “Site de Recherche Intégré sur le Cancer” (SIRIC) ONCOLille and to FR 3688 FRABio. N.V. is the recipient of a fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”.

CONFLICTS OF INTEREST

None.

REFERENCES

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136:E359–86.
2. Tsikitis VL, Malireddy K, Green EA, Christensen B, Whelan R, Hyder J, Marcello P, Larach S, Lauter D, Sargent DJ, Nelson H. Postoperative surveillance recommendations for early stage colon cancer based on results from the clinical outcomes of surgical therapy trial. *J Clin Oncol*. 2009; 27:3671–6.
3. Yaffee P, Osipov A, Tan C, Tuli R, Hendifar A. Review of systemic therapies for locally advanced and metastatic rectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2015; 6:185–200.
4. Ychou M, Rivoire M, Thezenas S, Quenet F, Delpero JR, Rebischung C, Letoublon C, Guimbaud R, Francois E, Ducreux M, Desseigne F, Fabre JM, Assenat E. A Randomized Phase II Trial of Three Intensified Chemotherapy Regimens in First-Line Treatment of Colorectal Cancer Patients with Initially Unresectable or Not Optimally Resectable Liver Metastases. The METHEP Trial. *Ann Surg Oncol*. 2013; 20:4289–97.
5. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64:9–29.
6. Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012; 13:448–62.
7. Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1473:4–8.
8. Xu C, Ng DTW. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015; 16:742–52.
9. Vasconcelos-dos-Santos A, Oliveira IA, Lucena MC, Mantuano NR, Whelan SA, Dias WB, Todeschini AR. Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs Against Cancer. *Front Oncol*. 2015; 5.
10. Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, Tabak LA. Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology*. 2012; 22:736–56.
11. Duarte HO, Freitas D, Gomes C, Gomes J, Magalhães A, Reis CA. Mucin-Type O-Glycosylation in Gastric Carcinogenesis. *Biomolecules*. 2016; 6.
12. Le Pendu J, Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Clément M. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. *APMIS*. 2001; 109:9–31.
13. Yang X, Qian K. Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017; 18:452–65.
14. 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; 45:365–70.
15. Hardivillé S, Hart GW. Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation. *Cell Metab*. 2014; 20:208–13.
16. Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem*. 2011; 80:825–58.
17. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956; 123:309–14.
18. Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956; 124:269–70.
19. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab*. 2008; 7:11–20.
20. Schulze A, Harris AL. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature*. 2012; 491:364–73.
21. de Geus-Oei LF, Vriens D, van Laarhoven HWM, van der Graaf WTA, Oyen WJG. Monitoring and predicting response to therapy with 18F-FDG PET in colorectal cancer: a systematic review. *J Nucl Med*. 2009; 50 Suppl 1:43S–54S.
22. Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced

- desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem.* 1991; 266:4706–12.
23. Kornfeld R. Studies on L-glutamine D-fructose 6-phosphate amidotransferase. I. Feedback inhibition by uridine diphosphate-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem.* 1967; 242:3135–41.
 24. Clausen H, Bennett EP. A family of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation. *Glycobiology.* 1996; 6:635–46.
 25. Sasai K, Ikeda Y, Fujii T, Tsuda T, Taniguchi N. UDP-GlcNAc concentration is an important factor in the biosynthesis of beta1,6-branched oligosaccharides:regulation based on the kinetic properties of N-acetylglucosaminyltransferase V. *Glycobiology.* 2002; 12:119–27.
 26. 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.
 27. Pinho SS, Reis CA. Glycosylation in cancer:mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer.* 2015; 15:540–55.
 28. Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. O-GlcNAcylation:A New Cancer Hallmark? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4:99.
 29. Murata K, Miyoshi E, Kameyama M, Ishikawa O, Kabuto T, Sasaki Y, Hiratsuka M, Ohigashi H, Ishiguro S, Ito S, Honda H, Takemura F, Taniguchi N, et al. Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000; 6:1772–7.
 30. Ishida H, Togayachi A, Sakai T, Iwai T, Hiruma T, Sato T, Okubo R, Inaba N, Kudo T, Gotoh M, Shoda J, Tanaka N, Narimatsu H. A novel beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta3Gn-T8), which synthesizes poly-N-acetylglucosamine, is dramatically upregulated in colon cancer. *FEBS Lett.* 2005; 579:71–8.
 31. Hung JS, Huang J, Lin YC, Huang MJ, Lee PH, Lai HS, Liang JT, Huang MC. C1GALT1 overexpression promotes the invasive behavior of colon cancer cells through modifying O-glycosylation of FGFR2. *Oncotarget.* 2014; 5:2096–106. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1815>.
 32. Iwai T, Kudo T, Kawamoto R, Kubota T, Togayachi A, Hiruma T, Okada T, Kawamoto T, Morozumi K, Narimatsu H. Core 3 synthase is down-regulated in colon carcinoma and profoundly suppresses the metastatic potential of carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:4572–7.
 33. Vavasseur F, Dole K, Yang J, Matta KL, Myerscough N, Corfield A, Paraskeva C, Brockhausen I. O-glycan biosynthesis in human colorectal adenoma cells during progression to cancer. *Eur J Biochem.* 1994; 222:415–24.
 34. Abe K, Hakomori S, Ohshiba S. Differential expression of difucosyl type 2 chain (LeY) defined by monoclonal antibody AH6 in different locations of colonic epithelia, various histological types of colonic polyps, and adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1986; 46:2639–44.
 35. Muinelo-Romay L, Gil-Martín E, Fernández-Briera A. $\alpha(1,2)$ fucosylation in human colorectal carcinoma. *Oncol Lett.* 2010; 1:361–6.
 36. Yazawa S, Nakamura J, Asao T, Nagamachi Y, Sagi M, Matta KL, Tachikawa T, Akamatsu M. Aberrant alpha 1->2fucosyltransferases found in human colorectal carcinoma involved in the accumulation of Leb and Y antigens in colorectal tumors. *Jpn J Cancer Res.* 1993; 84:989–95.
 37. Yuan M, Itzkowitz SH, Palekar A, Shamsuddin AM, Phelps PC, Trump BF, Kim YS. Distribution of blood group antigens A, B, H, Lewisia, and Lewisb in human normal, fetal, and malignant colonic tissue. *Cancer Res.* 1985; 45:4499–511.
 38. Bagaria B, Sood S, Sharma R, Lalwani S. Comparative study of CEA and CA19-9 in esophageal, gastric and colon cancers individually and in combination (ROC curve analysis). *Cancer Biol Med.* 2013; 10:148–57.
 39. Venkitachalam S, Revoredo L, Varadan V, Fecteau RE, Ravi L, Lutterbaugh J, Markowitz SD, Willis JE, Gerken TA, Guda K. Biochemical and functional characterization of glycosylation-associated mutational landscapes in colon cancer. *Scientific Reports.* 2016; 6:srep23642.
 40. Hamaguchi J, Nakagawa H, Takahashi M, Kudo T, Kamiyama N, Sun B, Oshima T, Sato Y, Deguchi K, Todo S, Nishimura SI. Swainsonine reduces 5-fluorouracil tolerance in the multistage resistance of colorectal cancer cell lines. *Mol Cancer.* 2007; 6:58.
 41. Hammond WA, Swaika A, Mody K. Pharmacologic resistance in colorectal cancer:a review. *Ther Adv Med Oncol.* 2016; 8:57–84.
 42. Mohelnikova-Duchonova B, Melichar B, Soucek P. FOLFOX/FOLFIRI pharmacogenetics:the call for a personalized approach in colorectal cancer therapy. *World J Gastroenterol.* 2014; 20:10316–30.
 43. Nakagawa H, Wakabayashi-Nakao K, Tamura A, Toyoda Y, Koshiha S, Ishikawa T. Disruption of N-linked glycosylation enhances ubiquitin-mediated proteasomal degradation of the human ATP-binding cassette transporter ABCG2. *FEBS J.* 2009; 276:7237–52.
 44. Santos FM, Latorre AO, Hueza IM, Sanches DS, Lippi LL, Gardner DR, Spinoza HS. Increased antitumor efficacy by the combined administration of swainsonine and cisplatin *in vivo*. *Phytomedicine.* 2011; 18:1096–101.
 45. Fernandes B, Sagman U, Auger M, Demetrio M, Dennis JW. Beta 1-6 branched oligosaccharides as a marker of tumor progression in human breast and colon neoplasia. *Cancer Res.* 1991; 51:718–23.
 46. Yamamoto H, Swoger J, Greene S, Saito T, Hurh J, Sweeley C, Leestma J, Mkrdichian E, Cerullo L, Nishikawa A, Ihara Y, Taniguchi N, Moskal JR. Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas:implications for a role in regulating invasivity. *Cancer Res.* 2000; 60:134–42.
 47. Kim YS, Hwang SY, Kang HY, Sohn H, Oh S, Kim JY, Yoo JS, Kim YH, Kim CH, Jeon JH, Lee JM, Kang HA, Miyoshi E, et al. Functional proteomics study reveals that

- N-Acetylglucosaminyltransferase V reinforces the invasive/metastatic potential of colon cancer through aberrant glycosylation on tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *Mol Cell Proteomics*. 2008; 7:1–14.
48. Croci DO, Cerliani JP, Dalotto-Moreno T, Méndez-Huergo SP, Mascanfroni ID, Dergan-Dylon S, Toscano MA, Caramelo JJ, García-Vallejo JJ, Ouyang J, Mesri EA, Junttila MR, Bais C, et al. Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors. *Cell*. 2014; 156:744–58.
 49. Cagnoni AJ, Pérez Sáez JM, Rabinovich GA, Mariño KV. Turning-Off Signaling by Siglecs, Selectins, and Galectins:Chemical Inhibition of Glycan-Dependent Interactions in Cancer. *Front Oncol*. 2016; 6.
 50. García-Alfonso P, Grande E, Polo E, Afonso R, Reina JJ, Jorge M, Campos JM, Martínez V, Ángeles C, Montagut C. The role of antiangiogenic agents in the treatment of patients with advanced colorectal cancer according to K-RAS status. *Angiogenesis*. 2014; 17:805–21.
 51. Ni J, Jiang Z, Shen L, Gao L, Yu M, Xu X, Zou S, Hua D, Wu S. β 3GnT8 regulates the metastatic potential of colorectal carcinoma cells by altering the glycosylation of CD147. *Oncol Rep*. 2014; 31:1795–801.
 52. Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res*. 2001; 61:2276–81.
 53. Shen L, Yu M, Xu X, Gao L, Ni J, Luo Z, Wu S. Knockdown of β 3GnT8 reverses 5-fluorouracil resistance in human colorectal cancer cells via inhibition the biosynthesis of poly-lactosamine-type N-glycans. *Int J Oncol*. 2014; 45:2560–8.
 54. Chen J, Pan Y, He B, Ying H, Wang F, Sun H, Deng Q, Liu X, Lin K, Peng H, Cho WC, Wang S. Inhibition of CD147 expression by RNA interference reduces proliferation, invasion and increases chemosensitivity in cancer stem cell-like HT-29 cells. *Int J Oncol*. 2015; 47:1476–84.
 55. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:10158–63.
 56. Ferreira JA, Peixoto A, Neves M, Gaiteiro C, Reis CA, Assaraf YG, Santos LL. Mechanisms of cisplatin resistance and targeting of cancer stem cells:Adding glycosylation to the equation. *Drug Resistance Updates*. 2016; 24:34–54.
 57. Lin Q, Yun Z. Impact of the Hypoxic Tumor Microenvironment on the Regulation of Cancer Stem Cell Characteristics. *Cancer Biol Ther*. 2010; 9:949–56.
 58. Xu T, Zhou M, Peng L, Kong S, Miao R, Shi Y, Sheng H, Li L. Upregulation of CD147 promotes cell invasion, epithelial-to-mesenchymal transition and activates MAPK/ERK signaling pathway in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7:7432–41.
 59. Brabletz T, Hlubek F, Spaderna S, Schmalhofer O, Hiendlmeyer E, Jung A, Kirchner T. Invasion and metastasis in colorectal cancer:epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition, stem cells and beta-catenin. *Cells Tissues Organs*. 2005; 179:56–65.
 60. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, Rimm DL, Wong H, Rodriguez A, Herschkowitz JI, Fan C, Zhang X, He X, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:13820–5.
 61. Peng L, Zhu H, Wang J, Sui H, Zhang H, Jin C, Li L, Xu T, Miao R. MiR-492 is functionally involved in Oxaliplatin resistance in colon cancer cells LS174T via its regulating the expression of CD147. *Mol Cell Biochem*. 2015; 405:73–9.
 62. Garza-Treviño EN, Said-Fernández SL, Martínez-Rodríguez HG. Understanding the colon cancer stem cells and perspectives on treatment. *Cancer Cell Int*. 2015; 15.
 63. Fanali C, Lucchetti D, Farina M, Corbi M, Cufino V, Cittadini A, Sgambato A. Cancer stem cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy:Controversies and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2014; 20:923–42.
 64. Dall’Olio F, Malagolini N, di Stefano G, Minni F, Marrano D, Serafini-Cessi F. Increased CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues. *Int J Cancer*. 1989; 44:434–9.
 65. Lu J, Gu J. Significance of β -Galactoside α 2,6 Sialyltransferase 1 in Cancers. *Molecules*. 2015; 20:7509–27.
 66. Seales EC, Jurado GA, Singhal A, Bellis SL. Ras oncogene directs expression of a differentially sialylated, functionally altered beta1 integrin. *Oncogene*. 2003; 22:7137–45.
 67. Park JJ, Yi JY, Jin YB, Lee YJ, Lee JS, Lee YS, Ko YG, Lee M. Sialylation of epidermal growth factor receptor regulates receptor activity and chemosensitivity to gefitinib in colon cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83:849–57.
 68. Seales EC, Jurado GA, Brunson BA, Wakefield JK, Frost AR, Bellis SL. Hypersialylation of beta1 integrins, observed in colon adenocarcinoma, may contribute to cancer progression by up-regulating cell motility. *Cancer Res*. 2005; 65:4645–52.
 69. Swindall AF, Londoño-Joshi AI, Schultz MJ, Fineberg N, Buchsbaum DJ, Bellis SL. ST6Gal-I protein expression is upregulated in human epithelial tumors and correlates with stem cell markers in normal tissues and colon cancer cell lines. *Cancer Res*. 2013; 73:2368–78.
 70. Lise M, Belluco C, Perera SP, Patel R, Thomas P, Ganguly A. Clinical correlations of alpha2,6-sialyltransferase expression in colorectal cancer patients. *Hybridoma*. 2000; 19:281–6.
 71. Isaji T, Im S, Gu W, Wang Y, Hang Q, Lu J, Fukuda T, Hashii N, Takakura D, Kawasaki N, Miyoshi H, Gu J. An oncogenic protein Golgi phosphoprotein 3 up-regulates cell migration via sialylation. *J Biol Chem*. 2014; 289:20694–705.

72. Zhao Y, Li Y, Ma H, Dong W, Zhou H, Song X, Zhang J, Jia L. Modification of sialylation mediates the invasive properties and chemosensitivity of human hepatocellular carcinoma. *Mol Cell Proteomics*. 2014; 13:520–36.
73. Zhuo Y, Chammas R, Bellis SL. Sialylation of beta1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 2008; 283:22177–85.
74. Liu YC, Yen HY, Chen CY, Chen CH, Cheng PF, Juan YH, Chen CH, Khoo KH, Yu CJ, Yang PC, Hsu TL, Wong CH. Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:11332–7.
75. Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, Marrapese G, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Gambacorta M, Siena S, Bardelli A. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. *Lancet Oncol*. 2005; 6:279–86.
76. Sartore-Bianchi A, Moroni M, Veronese S, Carnaghi C, Bajetta E, Luppi G, Sobrero A, Barone C, Cascinu S, Colucci G, Cortesi E, Nichelatti M, Gambacorta M, et al. Epidermal growth factor receptor gene copy number and clinical outcome of metastatic colorectal cancer treated with panitumumab. *J Clin Oncol*. 2007; 25:3238–45.
77. Swindall AF, Bellis SL. Sialylation of the Fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against Fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2011; 286:22982–90.
78. Liu Z, Swindall AF, Kesterson RA, Schoeb TR, Bullard DC, Bellis SL. ST6Gal-I regulates macrophage apoptosis via α 2-6 sialylation of the TNFR1 death receptor. *J Biol Chem*. 2011; 286:39654–62.
79. Hu T, Li Z, Gao CY, Cho CH. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J Gastroenterol*. 2016; 22:6876–89.
80. Zhang L, Yu J. Role of apoptosis in colon cancer biology, therapy, and prevention. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2013; 9.
81. Bates DJP, Lewis LD. Manipulating the apoptotic pathway: potential therapies for cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2013; 76:381–95.
82. Capon C, Maes E, Michalski JC, Leffler H, Kim YS. Sd(a)-antigen-like structures carried on core 3 are prominent features of glycans from the mucin of normal human descending colon. *Biochem J*. 2001; 358:657–64.
83. Malagolini N, Santini D, Chiricolo M, Dall'Olio F. Biosynthesis and expression of the Sda and sialyl Lewis x antigens in normal and cancer colon. *Glycobiology*. 2007; 17:688–97.
84. Itzkowitz SH, Yuan M, Montgomery CK, Kjeldsen T, Takahashi HK, Bigbee WL, Kim YS. Expression of Tn, sialosyl-Tn, and T antigens in human colon cancer. *Cancer Res*. 1989; 49:197–204.
85. González-Vallinas M, Vargas T, Moreno-Rubio J, Molina S, Herranz J, Cejas P, Burgos E, Aguayo C, Custodio A, Reglero G, Felio J, Ramírez de Molina A. Clinical relevance of the differential expression of the glycosyltransferase gene GCNT3 in colon cancer. *Eur J Cancer*. 2015; 51:1–8.
86. Huang MC, Chen HY, Huang HC, Huang J, Liang JT, Shen TL, Lin NY, Ho CC, Cho IM, Hsu SM. C2GnTM is downregulated in colorectal cancer and its re-expression causes growth inhibition of colon cancer cells. *Oncogene*. 2006; 25:3267–76.
87. Audie JP, Janin A, Porchet N, Copin MC, Gosselin B, Aubert JP. Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by *in situ* hybridization. *J Histochem Cytochem*. 1993; 41:1479–85.
88. Ho SB, Niehans GA, Lyflogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res*. 1993; 53:641–51.
89. Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX. Mucins in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1994; 17:153–80.
90. Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirotani K, Irimura T. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology*. 1994; 106:353–61.
91. Blank M, Klussmann E, Krüger-Krasagakes S, Schmitt-Gräff A, Stolte M, Bornhoeft G, Stein H, Xing PX, McKenzie IF, Verstijnen CP. Expression of MUC2-mucin in colorectal adenomas and carcinomas of different histological types. *Int J Cancer*. 1994; 59:301–6.
92. Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004; 23:77–99.
93. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *Gastrointest Cancer Res*. 2012; 5:19–27.
94. Walsh MD, Clendenning M, Williamson E, Pearson SA, Walters RJ, Nagler B, Packenas D, Win AK, Hopper JL, Jenkins MA, Haydon AM, Rosty C, English DR, et al. Expression of MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 mucins in colorectal cancers and their association with the CpG island methylator phenotype. *Mod Pathol*. 2013; 26:1642–56.
95. Renaud F, Vincent A, Mariette C, Crépin M, Stechly L, Truant S, Copin MC, Porchet N, Leteurtre E, Van Seuning I, Buisine MP. MUC5AC hypomethylation is a predictor of microsatellite instability independently of clinical factors associated with colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2015; 136:2811–21.
96. Renaud F, Mariette C, Vincent A, Wacrenier A, Maunoury V, Leclerc J, Coppin L, Crépin M, Van Seuning I, Leteurtre E, Buisine MP. The serrated neoplasia pathway of colorectal tumors: Identification of MUC5AC hypomethylation as an early marker of polyps with malignant potential. *Int J Cancer*. 2016; 138:1472–81.
97. Perrais M, Pigny P, Copin MC, Aubert JP, Van Seuning I. Induction of MUC2 and MUC5AC mucins by factors of the epidermal growth factor (EGF) family is mediated by EGF receptor/Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase cascade and Sp1. *J Biol Chem*. 2002; 277:32258–67.

98. Lesuffleur T, Porchet N, Aubert JP, Swallow D, Gum JR, Kim YS, Real FX, Zweibaum A. Differential expression of the human mucin genes MUC1 to MUC5 in relation to growth and differentiation of different mucus-secreting HT-29 cell subpopulations. *J Cell Sci.* 1993; 106:771–83.
99. Choi SR, Cho M, Kim HR, Ahn DH, Slesinger MH, Kim YS. Biological properties and expression of mucins in 5-fluorouracil resistant HT29 human colon cancer cells. *Int J Oncol.* 2000; 17:141–7.
100. Glasgow SC, Yu J, Carvalho LP, Shannon WD, Fleshman JW, McLeod HL. Unfavourable expression of pharmacologic markers in mucinous colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2005; 92:259–64.
101. Tian S, Roepman P, Popovici V, Michaut M, Majewski I, Salazar R, Santos C, Rosenberg R, Nitsche U, Mesker WE, Bruin S, Tejpar S, Delorenzi M, et al. A robust genomic signature for the detection of colorectal cancer patients with microsatellite instability phenotype and high mutation frequency. *J Pathol.* 2012; 228:586–95.
102. Vilar E, Mukherjee B, Kuick R, Raskin L, Misek DE, Taylor JMG, Giordano TJ, Hanash SM, Fearon ER, Rennert G, Gruber SB. Gene expression patterns in mismatch repair-deficient colorectal cancers highlight the potential therapeutic role of inhibitors of the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:2829–39.
103. Kalra AV, Campbell RB. Mucin overexpression limits the effectiveness of 5-FU by reducing intracellular drug uptake and antineoplastic drug effects in pancreatic tumours. *Eur J Cancer.* 2009; 45:164–73.
104. Krishn SR, Kaur S, Smith LM, Johansson SL, Jain M, Patel A, Gautam SK, Hollingsworth MA, Mandel U, Clausen H, Lo WC, Fan WTL, Manne U, et al. Mucins and associated glycan signatures in colon adenoma-carcinoma sequence: Prospective pathological implication(s) for early diagnosis of colon cancer. *Cancer Lett.* 2016; 374:304–14.
105. Altschuler Y, Kinlough CL, Poland PA, Bruns JB, Apodaca G, Weisz OA, Hughey RP. Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state. *Mol Biol Cell.* 2000; 11:819–31.
106. Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med.* 2014; 20:332–42.
107. Yin L, Huang L, Kufe D. MUC1 oncoprotein activates the FOXO3a transcription factor in a survival response to oxidative stress. *J Biol Chem.* 2004; 279:45721–7.
108. Yin L, Kharbanda S, Kufe D. Mucin 1 oncoprotein blocks hypoxia-inducible factor 1 α activation in a survival response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2007; 282:257–66.
109. Ren J, Agata N, Chen D, Li Y, Yu W, Huang L, Raina D, Chen W, Kharbanda S, Kufe D. Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell.* 2004; 5:163–75.
110. Sheng YH, He Y, Hasnain SZ, Wang R, Tong H, Clarke DT, Lourie R, Oancea I, Wong KY, Lumley JW, Florin TH, Sutton P, Hooper JD, et al. MUC13 protects colorectal cancer cells from death by activating the NF- κ B pathway and is a potential therapeutic target. *Oncogene.* 2017; 36:700–13.
111. Wang R, Yu C, Zhao D, Wu M, Yang Z. The mucin-type glycosylating enzyme polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 promotes the migration of ovarian cancer by modifying mucin 13. *Oncol Rep.* 2013; 30:667–76.
112. Patsos G, Hebbe-Viton V, Robbe-Masselot C, Masselot D, Martin RS, Greenwood R, Paraskeva C, Klein A, Graessmann M, Michalski JC, Gallagher T, Corfield A. O-Glycan inhibitors generate aryl-glycans, induce apoptosis and lead to growth inhibition in colorectal cancer cell lines. *Glycobiology.* 2009; 19:382–98.
113. Wagner KW, Punnoose EA, Januario T, Lawrence DA, Pitti RM, Lancaster K, Lee D, von Goetz M, Yee SF, Totpal K, Huw L, Katta V, Cavet G, et al. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nat Med.* 2007; 13:1070–7.
114. Yeh CT, Liang KH, Lin CC, Chang ML, Hsu CL, Hung CF. A single nucleotide polymorphism on the GALNT14 gene as an effective predictor of response to chemotherapy in advanced hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer.* 2014; 134:1214–24.
115. Lin WR, Chiang JM, Liang KH, Lim SN, Lai MW, Tsou YK, Hsieh TY, Hsu CK, Yeh CT. GALNT14 Genotype Predicts Postoperative Outcome of Stage III Colorectal Cancer With Oxaliplatin as Adjuvant Chemotherapy. *Medicine (Baltimore).* 2016; 95:e3487.
116. Sakamoto J, Furukawa K, Cordon-Cardo C, Yin BW, Rettig WJ, Oettgen HF, Old LJ, Lloyd KO. Expression of Lewis_x, Lewis_y, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines. *Cancer Res.* 1986; 46:1553–61.
117. Izawa M, Kumamoto K, Mitsuoka C, Kanamori C, Kanamori A, Ohmori K, Ishida H, Nakamura S, Kurata-Miura K, Sasaki K, Nishi T, Kannagi R. Expression of sialyl 6-sulfo Lewis X is inversely correlated with conventional sialyl Lewis X expression in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 2000; 60:1410–6.
118. Miyazaki K, Ohmori K, Izawa M, Koike T, Kumamoto K, Furukawa K, Ando T, Kiso M, Yamaji T, Hashimoto Y, Suzuki A, Yoshida A, Takeuchi M, et al. Loss of disialyl Lewis(a), the ligand for lymphocyte inhibitory receptor sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-7 (Siglec-7) associated with increased sialyl Lewis(a) expression on human colon cancers. *Cancer Res.* 2004; 64:4498–505.
119. Konno A, Hoshino Y, Terashima S, Motoki R, Kawaguchi T. Carbohydrate expression profile of colorectal cancer cells is relevant to metastatic pattern and prognosis. *Clin Exp Metastasis.* 2002; 19:61–70.
120. Nakayama T, Watanabe M, Katsumata T, Teramoto T, Kitajima M. Expression of sialyl Lewis(a) as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer.* 1995; 75:2051–6.

121. Takada A, Ohmori K, Yoneda T, Tsuyuoka K, Hasegawa A, Kiso M, Kannagi R. Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res.* 1993; 53:354–61.
122. Goupille C, Marionneau S, Bureau V, Hallouin F, Meichenin M, Rocher J, Le Pendu J. α 1,2Fucosyltransferase increases resistance to apoptosis of rat colon carcinoma cells. *Glycobiology.* 2000; 10:375–82.
123. Cordel S, Goupille C, Hallouin F, Meflah K, Le Pendu J. Role for α 1,2-fucosyltransferase and histo-blood group antigen H type 2 in resistance of rat colon carcinoma cells to 5-fluorouracil. *Int J Cancer.* 2000; 85:142–8.
124. Yazawa S, Nishimura T, Ide M, Asao T, Okamura A, Tanaka S, Takai I, Yagihashi Y, Saniabadi AR, Kochibe N. Tumor-related expression of α 1,2fucosylated antigens on colorectal carcinoma cells and its suppression by cell-mediated priming using sugar acceptors for α 1,2fucosyltransferase. *Glycobiology.* 2002; 12:545–53.
125. Mashita N, Yamada S, Nakayama G, Tanaka C, Iwata N, Kanda M, Kobayashi D, Fujii T, Sugimoto H, Koike M, Nomoto S, Fujiwara M, Kodera Y. Epithelial to mesenchymal transition might be induced via CD44 isoform switching in colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2014; 110:745–51.
126. Bánky B, Rásó-Barnett L, Barbai T, Timár J, Becságh P, Rásó E. Characteristics of CD44 alternative splice pattern in the course of human colorectal adenocarcinoma progression. *Mol Cancer.* 2012; 11:83.
127. Günthert AR, Sträter J, von Reyher U, Henne C, Joos S, Koretz K, Moldenhauer G, Krammer PH, Möller P. Early detachment of colon carcinoma cells during CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis. I. De-adhesion from hyaluronate by shedding of CD44. *J Cell Biol.* 1996; 134:1089–96.
128. Ayadi M, Bouygues A, Ouaret D, Ferrand N, Chouaib S, Thiery JP, Muchardt C, Sabbah M, Larsen AK. Chronic chemotherapeutic stress promotes evolution of stemness and WNT/beta-catenin signaling in colorectal cancer cells: implications for clinical use of WNT-signaling inhibitors. *Oncotarget.* 2015; 6:18518–33. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3934>.
129. Akamatsu S, Yazawa S, Zenita K, Matsumoto H, Tachikawa T, Kannagi R. Elevation of an α (1,3)fucosyltransferase activity correlated with apoptosis in the human colon adenocarcinoma cell line, HT-29. *Glycoconj J.* 1996; 13:1021–9.
130. Rapoport E, Pendu JL. Glycosylation alterations of cells in late phase apoptosis from colon carcinomas. *Glycobiology.* 1999; 9:1337–45.
131. Yanagisawa Y, Maruta F, Inuma N, Ishizone S, Koide N, Nakayama J, Miyagawa S. Modified Irinotecan/5FU/Leucovorin therapy in advanced colorectal cancer and predicting therapeutic efficacy by expression of tumor-related enzymes. *Scand J Gastroenterol.* 2007; 42:477–84.
132. Baldini SF, Lefebvre T. O-GlcNAcylation and the Metabolic Shift in High-Proliferating Cells: All the Evidence Suggests that Sugars Dictate the Flux of Lipid Biogenesis in Tumor Processes. *Front Oncol.* 2016; 6:6.
133. 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.* 2011; 1812:514–9.
134. Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir AM, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski JC, Lefebvre T. The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of β -catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012; 302:E417-424.
135. Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, Baldini SF, Dehennaut V, Toillon RA, 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 (Lausanne).* 2016; 7:46.
136. Phueaouan T, Chaiyawat P, Netsirisawan P, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Srisomsap C, Svasti J, Champattanachai V. Aberrant O-GlcNAc-modified proteins expressed in primary colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2013; 30:2929–36.
137. Hart GW, Greis KD, Dong LY, Blomberg MA, Chou TY, Jiang MS, Roquemore EP, Snow DM, Kreppel LK, Cole RN. O-linked N-acetylglucosamine: the “yin-yang” of Ser/Thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 376:115–23.
138. Olivier-Van Stichelen S, Dehennaut V, Buzy A, Zachary JL, Guinez C, Mir AM, El Yazidi-Belkoura I, Copin MC, Boureme D, Loyaux D, Ferrara P, Lefebvre T. O-GlcNAcylation stabilizes β -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J.* 2014; 28:3325–38.
139. Olivier-Van Stichelen S, Drougat L, Dehennaut V, El Yazidi-Belkoura I, Guinez C, Mir AM, Michalski JC, Vercoutter-Edouart AS, Lefebvre T. Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis.* 2012; 1:e36.
140. Zhou F, Huo J, Liu Y, Liu H, Liu G, Chen Y, Chen B. Elevated glucose levels impair the WNT/ β -catenin pathway via the activation of the hexosamine biosynthesis pathway in endometrial cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016; 159:19–25.
141. Itkonen HM, Minner S, Guldvik IJ, Sandmann MJ, Tsourlakis MC, Berge V, Svindland A, Schlomm T, Mills IG. O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2013; 73:5277–87.
142. 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; 277:19229–35.

143. Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, Vosseller K, Reginato MJ. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene*. 2010; 29:2831–42.
144. Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, Cho JW. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol*. 2006; 8:1074–83.
145. 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.
146. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 1997; 275:1787–90.
147. Chaiyawat P, Netsirisawan P, Svasti J, Champattanachai V. Aberrant O-GlcNAcylated Proteins: New Perspectives in Breast and Colorectal Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014; 5:193.
148. Park SY, Kim HS, Kim NH, Ji S, Cha SY, Kang JG, Ota I, Shimada K, Konishi N, Nam HW, Hong SW, Yang WH, Roth J, et al. Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *EMBO J*. 2010; 29:3787–96.
149. Guo H, Zhang B, Nairn AV, Nagy T, Moremen KW, Buckhaults P, Pierce M. 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.
150. Taparra K, Tran PT, Zachara NE. Hijacking the Hexosamine Biosynthetic Pathway to Promote EMT-Mediated Neoplastic Phenotypes. *Front Oncol*. 2016; 6.
151. Carvalho-Cruz P, Alisson-Silva F, Todeschini AR, Dias WB. Cellular glycosylation senses metabolic changes and modulates cell plasticity during epithelial to mesenchymal transition. *Dev Dyn*. 2017.
152. Bond MR, Hanover JA. A little sugar goes a long way: The cell biology of O-GlcNAc. *J Cell Biol*. 2015; 208:869–80.
153. Zachara NE, Molina H, Wong KY, Pandey A, Hart GW. The dynamic stress-induced “O-GlcNAc-ome” highlights functions for O-GlcNAc in regulating DNA damage/repair and other cellular pathways. *Amino Acids*. 2011; 40:793–808.
154. Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *J Biol Chem*. 2004; 279:30133–42.
155. Ma Z, Vocadlo DJ, Vosseller K. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF- κ B activity in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*. 2013; 288:15121–30.
156. Ferrer CM, Lynch TP, Sodi VL, Falcone JN, Schwab LP, Peacock DL, Vocadlo DJ, Seagroves TN, Reginato MJ. O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Mol Cell*. 2014; 54:820–31.
157. Godai T, Suda T, Sugano N, Tsuchida K, Shiozawa M, Sekiguchi H, Sekiyama A, Yoshihara M, Matsukuma S, Sakuma Y, Tsuchiya E, Kameda Y, Akaike M, et al. Identification of colorectal cancer patients with tumors carrying the TP53 mutation on the codon 72 proline allele that benefited most from 5-fluorouracil (5-FU) based postoperative chemotherapy. *BMC Cancer*. 2009; 9:420.
158. Gokare P, Finnberg NK, Abbosh PH, Dai J, Murphy ME, El-Deiry WS. P53 represses pyrimidine catabolic gene dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) expression in response to thymidylate synthase (TS) targeting. *Scientific Reports*. 2017; 7:9711.
159. Wen T, Hou K, Li Z, Li L, Yu H, Liu Y, Li Y, Yin Z. Silencing β -linked N-acetylglucosamine transferase induces apoptosis in human gastric cancer cells through PUMA and caspase-3 pathways. *Oncol Rep*. 2015; 34:3140–6.
160. Pepe F, Pagotto S, Soliman S, Rossi C, Lanuti P, Braconi C, Mariani-Costantini R, Visone R, Veronese A. Regulation of miR-483-3p by the O-linked N-acetylglucosamine transferase links chemosensitivity to glucose metabolism in liver cancer cells. *Oncogenesis*. 2017; 6:e328.
161. Kang KA, Piao MJ, Ryu YS, Kang HK, Chang WY, Keum YS, Hyun JW. Interaction of DNA demethylase and histone methyltransferase upregulates Nrf2 in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells. *Oncotarget*. 2016; 7:40594–620. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9745>.
162. Leturcq M, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS. O-GlcNAcylation and chromatin remodeling in mammals: an up-to-date overview. *Biochem Soc Trans*. 2017; 45:323–38.
163. Shi FT, Kim H, Lu W, He Q, Liu D, Goodell MA, Wan M, Songyang Z. 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; 288:20776–84.
164. Vella P, Scelfo A, Jammula S, Chiacchiera F, Williams K, Cuomo A, Roberto A, Christensen J, Bonaldi T, Helin K, Pasini D. Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol Cell*. 2013; 49:645–56.
165. Gmeiner WH, Reinhold WC, Pommier Y. Genome-wide mRNA and microRNA profiling of the NCI 60 cell-line screen and comparison of FdUMP[10] with fluorouracil, floxuridine, and topoisomerase 1 poisons. *Mol Cancer Ther*. 2010; 9:3105–14.
166. Temmink OH, Bijnsdorp IV, Prins HJ, Losekoot N, Adema AD, Smid K, Honeywell RJ, Ylstra B, Eijk PP, Fukushima M, Peters GJ. Trifluorothymidine resistance is associated with decreased thymidine kinase and equilibrative nucleoside transporter expression or increased secretory phospholipase A2. *Mol Cancer Ther*. 2010; 9:1047–57.
167. Kanwal S, Fardini Y, Pagesy P, N'tumba-Byn T, Pierre-Eugène C, Masson E, Hampe C, Issat T. O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor α expression

- and confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PLoS One*. 2013; 8:e69150.
168. 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-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J Biol Chem*. 1998; 273:3611–7.
 169. Han I, Kudlow JE. Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol*. 1997; 17:2550–8.
 170. Yang X, Su K, Roos MD, Chang Q, Paterson AJ, Kudlow JE. O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:6611–6.
 171. Fraczyk T, Kubiński K, Maslyk M, Cieśla J, Hellman U, Shugar D, Rode W. Phosphorylation of thymidylate synthase from various sources by human protein kinase CK2 and its catalytic subunits. *Bioorg Chem*. 2010; 38:124–31.
 172. Tarrant MK, Rho HS, Xie Z, Jiang YL, Gross C, Culhane JC, Yan G, Qian J, Ichikawa Y, Matsuoka T, Zachara N, Etkorn FA, Hart GW, et al. Regulation of CK2 by phosphorylation and O-GlcNAcylation revealed by semisynthesis. *Nat Chem Biol*. 2012; 8:262–9.
 173. Champattanachai V, Netsirisawan P, Chaiyawat P, Phueaouan T, Charoenwattanasatien R, Chokchaichamnankit D, Punyarit P, Srisomsap C, Svasti J. Proteomic analysis and abrogated expression of O-GlcNAcylated proteins associated with primary breast cancer. *Proteomics*. 2013; 13:2088–99.
 174. Noach N, Segev Y, Levi I, Segal S, Priel E. Modification of topoisomerase I activity by glucose and by O-GlcNAcylation of the enzyme protein. *Glycobiology*. 2007; 17:1357–64.
 175. Jansen WJ, Zwart B, Hulscher ST, Giaccone G, Pinedo HM, Boven E. CPT-11 in human colon-cancer cell lines and xenografts: characterization of cellular sensitivity determinants. *Int J Cancer*. 1997; 70:335–40.
 176. Peeters PJHL, Bazelier MT, Leufkens HGM, de Vries F, De Bruin ML. The risk of colorectal cancer in patients with type 2 diabetes: associations with treatment stage and obesity. *Diabetes Care*. 2015; 38:495–502.
 177. Dignam JJ, Polite BN, Yothers G, Raich P, Colangelo L, O'Connell MJ, Wolmark N. Body mass index and outcomes in patients who receive adjuvant chemotherapy for colon cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006; 98:1647–54.
 178. Meyerhardt JA, Sato K, Niedzwiecki D, Ye C, Saltz LB, Mayer RJ, Mowat RB, Whittom R, Hantel A, Benson A, Wigler DS, Venook A, Fuchs CS. Dietary glycemic load and cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer: findings from CALGB 89803. *J Natl Cancer Inst*. 2012; 104:1702–11.
 179. Stein KB, Snyder CF, Barone BB, Yeh HC, Peairs KS, Derr RL, Wolff AC, Brancati FL. Colorectal cancer outcomes, recurrence, and complications in persons with and without diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Dig Dis Sci*. 2010; 55:1839–51.
 180. Meyerhardt JA, Heseltine D, Niedzwiecki D, Hollis D, Saltz LB, Mayer RJ, Thomas J, Nelson H, Whittom R, Hantel A, Schilsky RL, Fuchs CS. Impact of physical activity on cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer: findings from CALGB 89803. *J Clin Oncol*. 2006; 24:3535–41.
 181. de Freitas Junior JC, Morgado-Diaz JA. The role of N-glycans in colorectal cancer progression: potential biomarkers and therapeutic applications. *Oncotarget*. 2016; 7:19395–413. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6283>.
 182. de Oliveira Figueirôa E, da Cunha CRA, Albuquerque PBS, de Paula RA, Aranda-Souza MÂ, da Silva MA, Zagmignan A, Carneiro-da-Cunha MG, da Silva LCN, Dos Santos Correia MT. Lectin-carbohydrate interactions: implications for the development of new anticancer agents. *Curr Med Chem*. 2017.
 183. AlSadek DMM, Badr HA, Al-Shafie TA, El-Bahr SM, El-Houseini ME, Djansugurova LB, Li CZ, Ahmed H. Cancer cell death induced by nanomagnetoelectin. *Eur J Cell Biol*. 2017.
 184. Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2017; 17:20–37.
 185. Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation—potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov*. 2005; 4:477–88.
 186. Balint JP, Gabitzsch ES, Rice A, Latchman Y, Xu Y, Messerschmidt GL, Chaudhry A, Morse MA, Jones FR. Extended evaluation of a phase 1/2 trial on dosing, safety, immunogenicity, and overall survival after immunizations with an advanced-generation Ad5 [E1-, E2b-]-CEA(6D) vaccine in late-stage colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2015; 64:977–87.
 187. Duggan MC, Jochems C, Donahue RN, Richards J, Karpa V, Foust E, Paul B, Brooks T, Tridandapani S, Olencki T, Pan X, Lesinski GB, Schlom J, et al. A phase I study of recombinant (r) vaccinia-CEA(6D)-TRICOM and rFowlpox-CEA(6D)-TRICOM vaccines with GM-CSF and IFN- α -2b in patients with CEA-expressing carcinomas. *Cancer Immunol Immunother*. 2016; 65:1353–64.
 188. Morse MA, Hobeika A, Gwin W, Osada T, Gelles J, Rushing C, Niedzwiecki D, Lysterly HK. Phase I study of alphaviral vector (AVX701) in colorectal cancer patients: comparison of immune responses in stage III and stage IV patients. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2015; 3:P444.
 189. Nemunaitis J, Bedell C, Klucher K, Vo A, Whiting S. Phase 1 dose escalation of ONT-10, a therapeutic MUC1 vaccine, in patients with advanced cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer*. 2013; 1:P240.

IV. ANNEXES

Partie II :

Régulation croisée entre la
O-GlcNAcylation et la voie de
signalisation PhosphoInositide
3-Kinase (PI3K)/AKT/mammalian
Target Of Rapamycin (mTOR) dans
les maladies chroniques

Partie II

Régulation croisée entre la *O*-GlcNAcylation et la voie de signalisation PhosphoInositide 3-Kinase (PI3K)/AKT/mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) dans les maladies chroniques

En marge de mes travaux de thèse principaux, j'ai étudié la relation croisée entre les deux senseurs métaboliques, la *O*-N-acétylglucosaminylation et la voie de signalisation mitogène mTOR dans le CCR. Ces travaux ont mené à la publication d'un article original (en page 321) puis d'une mini-revue (en page 333) faisant l'état de l'art de cette thématique plus largement dans les maladies chroniques.

[Very N, Steenackers A, Dubuquoy C, Vermuse J, Dubuquoy L, Lefebvre Tand El Yazidi-Belkoura I. \(2018\). Cross regulation between mTOR signaling and O-GlcNAcylation. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 50 \(3\) : 213-222.](#)

[Very N, Vercoutter-Edouart AS, Lefebvre T, Hardivillé S, El Yazidi-Belkoura I. \(2018\). Cross-Dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR Axis in Human Chronic Diseases. *Front Endocrinol \(Lausanne\)*. 9:602.](#)

1. Contexte de l'étude

A travers la voie HBP, la *O*-GlcNAcylation est une MPT dynamique et réversible modulatrice des mécanismes cellulaires fondamentaux en réponse aux nutriments (cf. 4 page 138). Une dérégulation du métabolisme du glucose associée à l'obésité, au DT2 et au cancer est corrélée à une augmentation des niveaux de l'OGT et de la *O*-GlcNAcylation globale des protéines. De nombreuses voies de signalisation sont alors régulées par la *O*-GlcNAcylation dont plusieurs acteurs de la voie mitogène PI3K/AKT (cf. 7.5 page 175). En retour, l'expression de l'OGT est augmentée après activation de la voie PI3K par l'insuline et les facteurs de croissance (Olivier-Van Stichelen, Drougat, et al., 2012; Perez-Cervera et al., 2013).

Peu d'études se sont focalisées sur la relation croisée entre la *O*-GlcNAcylation et mTOR, une kinase en aval de la voie PI3K/AKT. mTOR est un senseur de l'état énergétique cellulaire activé en réponse aux acides aminés et aux facteurs mitogènes. Cette kinase favorise alors le métabolisme, la synthèse protéique, la croissance, l'angiogenèse et l'autophagie cellulaires. Récemment, Park et collaborateurs (2014) ont montré que l'inhibition pharmacologique de mTOR réduit la *O*-GlcNAcylation globale dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2 par diminution de l'expression de l'OGT et augmentation de celle de l'OGA (Park et al., 2014). D'autre part, Sodi et collaborateurs (2015) révèlent que mTOR augmente l'expression de la chaperon moléculaire Hsp90A qui stabilise l'OGT dans les cellules cancéreuses mammaires (Sodi et al., 2015). Les données actuelles, discutées dans notre mini-revue, sur le dialogue

entre *O*-GlcNAcylation et voie de signalisation mitogène PI3K/AKT/mTOR portent sur des maladies chroniques humaines autres que le cancer à savoir le DT2, les maladies neurologiques et cardiovasculaires.

2. Hypothèse de travail et objectifs

Dans ce contexte et pour aller plus loin dans l'analyse de la relation croisée entre les deux senseurs métaboliques, la *O*-GlcNAcylation et la voie de signalisation mTOR, en conditions physiopathologiques du cancer, nous nous sommes fixés plusieurs objectifs :

1. Déterminer l'effet de la dérégulation du métabolisme sur l'activation de la voie de signalisation mTOR *in vitro* et *in vivo* dans le côlon-rectum de souris obèses prédisposées au diabète
2. Déterminer l'effet de la signalisation de mTOR sur la *O*-GlcNAcylation *in vitro* dans des cellules coliques non cancéreuses et cancéreuses
3. Déterminer l'effet de la *O*-GlcNAcylation sur l'activation de mTOR *in vitro*

3. Résultats

3.1. Stimulation de la *O*-GlcNAcylation et de la signalisation mTOR au cours de la dérégulation du métabolisme

Dans un premier temps, nous nous sommes demandés quel était l'effet de la dérégulation globale du métabolisme sur la signalisation mTOR dans le côlon. Nous montrons que mTOR est suractivé par phosphorylation activatrice sur la Ser²⁴⁴⁸ dans les tissus colorectaux de souris obèses ob/ob, déficientes en hormone de satiété leptine, par rapport aux souris non obèses C57BL/6. De plus, l'activation de mTOR est corrélée à une augmentation des niveaux d'OGT et de *O*-GlcNAcylation globale des protéines. En parallèle, nous montrons que les niveaux d'OGT, de *O*-GlcNAcylation globale ainsi que la voie mTOR (phosphorylations activatrices de mTOR sur la Ser²⁴⁴⁸ et de sa cible S6K1 sur la Thr³⁸⁹) sont également augmentés dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 issues d'un carcinome primaire hautement métaboliquement très actives comparées aux cellules coliques fœtales non cancéreuses CCD 841 CoN. **Ces résultats soutiennent l'hypothèse qu'une perturbation du métabolisme associée à l'obésité et au phénotype cancéreux induit une augmentation de la *O*-GlcNAcylation corrélée à l'activation de la voie mTOR *in vitro* et *in vivo*.**

3.2. Augmentation des niveaux de l'OGT et de la *O*-GlcNAcylation globale après activation de mTOR dans le CCR

Dans un second temps, nous avons analysé l'effet de la régulation pharmacologique de mTOR sur les niveaux d'OGT et de *O*-GlcNAcylation globale *in vitro*. Le traitement des cellules CCD 841 CoN et HCT116 avec l'agoniste MHY1485 et l'inhibiteur allostérique rapamycine de mTOR a respectivement augmenté et diminué la phosphorylation activatrice de S6K1 sur la Thr³⁸⁹ ainsi que les niveaux d'OGT et de *O*-GlcNAcylation globale. **Ces résultats démontrent que les niveaux d'OGT et de *O*-GlcNAcylation globale sont dépendants du statut d'activation de mTOR.**

3.3. Activation de la signalisation mTOR par la O-GlcNAcylation dans le CCR

Enfin, nous avons analysé l'effet réciproque de la O-GlcNAcylation sur l'activation de mTOR *in vitro*. Nous montrons que les niveaux de O-GlcNAcylation et d'activation de la voie mTOR (phosphorylations de mTOR sur la Ser²⁴⁴⁸ et de S6K1 sur la Thr³⁸⁹) sont diminués après traitement par l'azasérine, un inhibiteur de l'enzyme GFAT limitante de la voie HBP, mais restaurés après co-traitement avec de la glucosamine dans les cellules HCT116 mais pas dans les cellules CCD 841 CoN. A l'inverse, nous montrons que l'augmentation de la O-GlcNAcylation globale par *knock-down* de MGEA5 codant l'OGA active la voie mTOR dans les cellules HCT116. **Ces résultats démontrent que la O-GlcNAcylation participe à l'activation de la signalisation mTOR dans un contexte physiopathologique du cancer colique.**

4. Discussion

L'obésité et le DT2, dont l'incidence ne cesse de progresser dans les pays industrialisés, ont principalement pour origine la suralimentation et la sédentarité. Le glucose et les acides gras libres circulants peuvent être métabolisés dans la voie HBP et induire une augmentation de la O-GlcNAcylation des protéines (Ruan, Singh, et al., 2013). **Une augmentation significative du niveau de O-GlcNAcylation globale est ainsi détectée dans de nombreux tissus diabétiques** humains et d'animaux tels que le foie (Ruan et al., 2012; Baldini et al., 2016), dans les leucocytes (Springhorn et al., 2012) et les érythrocytes (K. Park et al., 2010). **Nous montrons que les niveaux d'OGT et de O-GlcNAcylation globale sont également augmentés dans les tissus colorectaux de souris obèses ob/ob comparés à ceux de souris non obèses C57BL/6.** L'hyper-O-GlcNAcylation peut, à son tour, favoriser l'obésité induite par la suralimentation ainsi que la résistance à l'insuline associée au DT2. En effet, il a été récemment montré que la O-GlcNAcylation stimule l'accumulation de graisses viscérales en ciblant la PérLipINE 1 (PLIN1) sur les résidus Ser⁴⁹² et Ser⁵¹⁷ et en inhibant la lipolyse dans le tissu adipeux (Y. Yang et al., 2020). D'autre part, en inhibant la protéine adaptatrice IRS-1 ainsi que les kinases PI3K et AKT en aval du récepteur de l'insuline (cf. 7.5 page 175), la O-GlcNAcylation contribue à la résistance à l'insuline des tissus insulino-sensibles.

Nous montrons que les niveaux d'OGT et de O-GlcNAcylation globale sont corrélés à une suractivation de mTOR dans les tissus colorectaux des souris ob/ob par rapport aux souris non obèses. De manière intéressante, il a également été montré que l'hyperactivation chronique de la voie mTOR induite par la suralimentation et l'obésité participe au mécanisme de résistance à l'insuline. En effet, Saha et collaborateurs (2010) révèlent que l'incubation du muscle squelettique de rat avec des niveaux élevés de glucose et de leucine diminue l'activité de l'AMPK et activent mTOR (Saha et al., 2010). L'hyperactivation de la signalisation mTOR peut alors aboutir à une réduction de la signalisation de l'insuline par une boucle de rétroaction négative sur IRS-1 (Berg et al., 2002; Shah et al., 2004; Tremblay et al., 2005; Tzatsos and Kandrour, 2006). Actuellement, aucune étude n'a déterminé que mTOR était une cible directe de la O-GlcNAcylation. En revanche, plusieurs régulateurs en amont le sont tels que IRS-1 (Patti et al., 1999; Federici et al., 2002; Park et al., 2005; Klein et al., 2009; Whelan et al., 2010), PI3K (Federici et al., 2002),

Phosphoinositide-dependent Kinase 1 (PDK1) (Whelan et al., 2010), AKT (Park et al., 2005; Kang et al., 2008, p.473; Wang et al., 2012; Shi et al., 2015) et AMPK (Bullen et al., 2014; Ishimura et al., 2017). **En stimulant mTOR, la O-GlcNAcylation pourrait favoriser la résistance à l'insuline dans les tissus insulino-sensibles et la progression de l'obésité vers le DT2.**

Physiologiquement, le côlon-rectum est un tissu peu ou pas exposé à l'insuline. Néanmoins, ce tissu en possède le récepteur et une surexposition à l'insuline déclenche l'activation des voies mitogènes (Olivier et al., 2011). Ainsi, l'obésité (Bostick et al., 1994) et le DT2 (Yang et al., 2005) sont des facteurs de risque prépondérant dans le développement du cancer colorectal (CCR) avec un risque augmenté d'un facteur 1,4. Une hyper-O-GlcNAcylation (Mi et al., 2011; Olivier-Van Stichelen et al., 2014; Steenackers et al., 2016; Yu et al., 2019, p.5) et une suractivation de la signalisation PI3K/AKT/mTOR (Danielsen et al., 2015) sont reportées dans les cancers dont le CCR. De manière intéressante, Ishimura et collaborateurs (2017) montrent que la O-GlcNAcylation active la voie mTOR en inhibant l'AMPK par compétition avec la phosphorylation activatrice du résidu Thr¹⁷² dans les cellules cancéreuses coliques LoVo (Ishimura et al., 2017). **Nous montrons, pour notre part, une augmentation des niveaux d'OGT, de O-GlcNAcylation globale et d'activation de la voie mTOR dans les cellules cancéreuses coliques HCT116 comparées aux cellules non cancéreuses coliques CCD 841 CoN. Ainsi, en stimulant la voie mTOR, la O-GlcNAcylation pourrait participer au développement de cancers associés à l'obésité.**

Afin de mieux comprendre la corrélation entre O-GlcNAcylation des protéines et activation de mTOR, nous avons étudié les effets réciproques de la modulation de ces deux senseurs métaboliques. **Dans un premier temps, nous avons montré que les niveaux d'OGT et de O-GlcNAcylation globale sont dépendants du statut d'activation de mTOR dans les cellules CCD 841 CoN et HCT116.** Cependant, le mécanisme moléculaire sous-jacent à cette régulation reste à définir. Comme démontré par Sodi et collaborateurs (2015), mTOR pourrait stabiliser l'OGT *via* l'augmentation de l'expression de Hsp90A (Sodi et al., 2015). mTOR est un régulateur central de la croissance, la différenciation et la survie cellulaires.

Par conséquent, sa dérégulation joue également un rôle crucial dans la prolifération, la migration, l'invasion et la métastase du cancer (Zhou and Huang, 2011). **En ce sens, la régulation de la O-GlcNAcylation par la voie mTOR pourrait être un mécanisme conservé entre cellules normales et cancéreuses.**

Dans un second, nous avons montré que la O-GlcNAcylation participe à l'activation de mTOR et ce, dans les cellules HCT116 mais pas dans les cellules CCD 841 CoN. Les travaux de notre équipe (2016) puis ceux de Xu et collaborateurs (2019) ont démontré l'implication de la O-GlcNAcylation dans la prolifération, la survie, l'adhésion, la migration et l'invasion des cellules HCT116 (Steenackers et al., 2016; Xu et al., 2019). L'activation par O-GlcNAcylation des kinases en amont de mTOR (PI3K et AKT) stimule la croissance et l'invasion du cancer (cf. 8.4.4 page 203). Récemment, Wu et collaborateurs (2019) révèlent que le *knock-down* de l'OGT ralentit la prolifération, la formation de colonies et la migration des cellules cancéreuses coliques SW480 *in vitro*, et leur croissance tumorale *in vivo*. La diminution de la O-GlcNAcylation dans ces cellules inhibe de manière significative la voie AKT/mTOR par déstabilisation de

DEAD-boX helicase 5 (DDX5) (Wu et al., 2019), un co-activateur transcriptionnel qui augmente l'expression de AKT (Sarkar et al., 2015). De ce fait, la surexpression de *DDX5* ou l'utilisation de l'agoniste de mTOR MHY1485 réverse en partie la réduction de la prolifération et de la capacité métastatique des cellules sous-exprimant l'*OGT* (Wu et al., 2019). **En ce sens, nous supposons que la dérégulation de la O-GlcNAcylation participe à l'oncogenèse du côlon-rectum, en partie, en régulant les propriétés biologiques des cellules cancéreuses via la signalisation mTOR.**

5. Conclusion et perspectives

Ensemble, nos données indiquent qu'il existe une régulation croisée entre la O-GlcNAcylation et la signalisation mTOR dans des contextes de dérégulation métabolique associée à l'obésité et au CCR. Les travaux de Wani et collaborateurs (2017) confortent nos résultats dans les neurones corticaux primaires de rat. En effet, l'inhibition pharmacologique de l'OGA par le Thiamet-G augmente le niveau de O-GlcNAcylation des protéines et l'activation de la signalisation mTOR, atténue le flux autophagique et provoque l'accumulation de l' α -synucléine caractéristique de la maladie de Parkinson. De plus, le *knock-down* de l'*OGT* ralentit la croissance tumorale des cellules SW480 *in vitro* et *in vivo* en partie par diminution de l'activation de mTOR (Wu et al., 2019). Réciproquement, l'inhibition de mTOR par la rapamycine diminue le niveau basal de O-GlcNAcylation (Wani et al., 2017). En raison de l'implication de la O-GlcNAcylation et de mTOR dans le développement tumoral et de leur régulation croisée, le ciblage de l'un et/ou l'autre de ces acteurs pourrait améliorer l'efficacité des traitements anti-cancéreux dans le CCR. Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs allostériques de mTOR tels que la rapamycine ou ses analogues, les rapalogues évérolimus (Afinitor®) et temsirolimus (Torisel®), qui inhibent spécifiquement mTORC1 a montré un bénéfice limité en monothérapie avec la survenue de résistance (Tian et al., 2019). Notamment, les tumeurs colorectales métastatiques traitées par évérolimus pendant 4 semaines présentent des niveaux plus élevés d'AKT activé par rapport aux tumeurs non traitées (O'Reilly et al., 2006). D'une part, l'inhibition de mTORC1 supprime la boucle de rétroaction négative sur IRS-1 et stimule la signalisation anti-apoptotique PI3K/AKT. D'autre part, la rapamycine et ses analogues sont inefficaces pour inhiber mTORC2, la kinase qui catalyse la phosphorylation activatrice de AKT sur la Ser⁴⁷³. De ce fait, une nouvelle génération d'inhibiteurs compétitifs du site de liaison à l'ATP de mTOR, ciblant mTORC1 et mTORC2, surmonte la résistance à la rapamycine et devrait être plus efficace en clinique. Ainsi, l'inhibition de mTOR par la Torin-1 supprime la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* de cellules cancéreuses souches isolées de tumeurs colorectales métastatiques (Francipane and Lagasse, 2013). La Torin-2, synthétisée avec une voie de synthèse améliorée et possédant de meilleures propriétés pharmacologiques (Liu et al., 2011), pourrait être utilisée avec plus d'efficacité. Récemment, un bénéfice de la combinaison irinotécan/AZD2014 (Vistusertib®) sur la migration, l'invasion et la métastase des cellules cancéreuses coliques SW480 a été montré *in vitro* et *in vivo* (Reita et al., 2019).

Dans la lutte contre le CCR, la poursuite des recherches dans ce domaine pourrait conduire au développement de meilleures stratégies thérapeutiques anti-mTOR combinant des inhibiteurs pharmacologiques plus efficaces et un inhibiteur de l'OGT et/ou une alimentation adaptée

Publication N°1



Cross regulation between mTOR signaling and O-GlcNAcylation

Ninon Very¹ · Agata Steenackers² · Caroline Dubuquoy³ · Jeanne Vermuse¹ · Laurent Dubuquoy³ · Tony Lefebvre¹ · Ikram El Yazidi-Belkoura¹

Received: 19 October 2017 / Accepted: 15 February 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

The hexosamine biosynthetic pathway (HBP) integrates glucose, amino acids, fatty acids and nucleotides metabolisms for uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) synthesis. UDP-GlcNAc is the nucleotide sugar donor for O-linked β -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) processes. O-GlcNAc transferase (OGT) is the enzyme which transfers the N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) residue onto target proteins. Several studies previously showed that glucose metabolism dysregulations associated with obesity, diabetes or cancer correlated with an increase of OGT expression and global O-GlcNAcylation levels. Moreover, these diseases present an increased activation of the nutrient sensing mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. Other works demonstrate that mTOR regulates protein O-GlcNAcylation in cancer cells through stabilization of OGT. In this context, we studied the cross-talk between these two metabolic sensors in vivo in obese mice predisposed to diabetes and in vitro in normal and colon cancer cells. We report that levels of OGT and O-GlcNAcylation are increased in obese mice colon tissues and colon cancer cells and are associated with a higher activation of mTOR signaling. In parallel, treatments with mTOR regulators modulate OGT and O-GlcNAcylation levels in both normal and colon cancer cells. However, deregulation of O-GlcNAcylation affects mTOR signaling activation only in cancer cells. Thus, a crosstalk exists between O-GlcNAcylation and mTOR signaling in contexts of metabolism dysregulation associated to obesity or cancer.

Keywords O-GlcNAcylation · mTOR signaling · Metabolism · Colon · Cancer · Obesity

Introduction

O-linked β -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) is a dynamic post-translational modification which occurs on serine (Ser) and threonine (Thr) residues of cytoplasmic, nuclear and mitochondrial proteins. OGT (O-GlcNAc transferase) transfers the N-acetylglucosamine (GlcNAc) residue from UDP-GlcNAc onto target proteins and OGA (O-GlcNAcase) removes it. The nucleotide sugar donor uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc) is synthesized through

the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) at the crossroad of glucose, amino acids, fatty acids and nucleotides metabolisms (Hart and Akimoto 2009). O-GlcNAcylation competes with phosphorylation at the same or proximal sites to control many signaling pathways regulating cell proliferation and survival (Butkinaree et al. 2010; Hart et al. 2011). O-GlcNAcylation is modulator of cellular processes in response to nutrients and stress; therefore this modification is considered a nutritional sensor. Dysregulation in O-GlcNAcylation processes was reported in neurodegeneration, cardiovascular diseases, diabetes and cancers (Hart and Akimoto 2009). Many studies involve O-GlcNAcylation in cancer biology by its critical roles in cell cycle, transcription, translation, ubiquitin-proteasomal degradation and cellular nutrient/stress responses. Thus, this PTM is a pivotal regulator of cell proliferation, survival, migration and epithelial-mesenchymal transition in a context of oncogenesis (Ferrer et al. 2016).

Many signaling pathways are controlled by O-GlcNAcylation in response to nutrients and mitogenic signals. Under insulin stimulation, OGT O-GlcNAcylates insulin receptor substrate 1 (IRS1) (Park et al. 2005; Ball et al. 2006),

✉ Ikram El Yazidi-Belkoura
ikram.el-yazidi@univ-lille1.fr

¹ CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Université de Lille, F 59000 Lille, France

² Laboratory of Cell Biochemistry and Biology, NIDDK, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

³ INSERM, U995, LIRIC – Lille Inflammation Research International Center, CHU Lille, Université de Lille, F 59000 Lille, France

phosphoinositide 3-kinase (PI3K) (Federici et al. 2002) and AKT (Park et al. 2005). OGT is also required for expression of the insulin receptor (Perez-Cervera et al. 2013). In turn, OGT expression is increased in response to insulin (Perez-Cervera et al. 2013) and its synthesis is controlled by the PI3K pathway (Olivier-Van Stichelen et al. 2012). The increase in *O*-GlcNAcylation content results in mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway activation (Dehennaut et al. 2008); also the extracellular signal-regulated kinase 2 (Erk2) is *O*-GlcNAcylated during G2/M transition of cell cycle (Dehennaut et al. 2008). In colorectal cancer (CRC), the Wnt/ β -catenin pathway is also under OGT control since β -catenin expression correlates with *O*-GlcNAcylation status (Olivier-Van Stichelen et al. 2012). *O*-GlcNAcylation stabilizes β -catenin through direct competition with phosphorylation at Thr41 and decreases global *O*-GlcNAcylation reduced β -catenin/ α -catenin interaction and localization of β -catenin at the level of adherens junctions. Thus, one suggests that this glycosylation may regulate mucosa integrity and consequently play an important role in epithelial cancer development (Olivier-Van Stichelen et al. 2014).

Recently, teams of Cho (Park et al. 2014) and Reginato (Sodi et al. 2015) demonstrated that mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling regulates protein *O*-GlcNAcylation in hepatic and breast cancer cells respectively through adjustment of OGT stability. In hepatic cancer cells, pharmacological inhibition of mTOR activity reduced global *O*-GlcNAcylation consequently to decreased OGT and increased OGA proteins (Park et al. 2014). In breast cancer cells, mTOR activation resulted in elevated OGT/*O*-GlcNAcylation levels through the control by the mTOR downstream transcription factor c-MYC in an RNA-independent manner (Sodi et al. 2015). mTOR senses the cell energy status in response to amino acids and growth factors. Once induced, mTOR increases cell growth and proliferation through phosphorylation of two downstream effectors: p70 ribosomal S6 protein kinase (p70S6K), a kinase implicated in ribosome biogenesis, and eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein (4EBP1).

To push forward these observations, we aimed to draw a comparative view of the cross-talk between two metabolic state sensors, the *O*-GlcNAcylation and the mTOR signaling pathway in vivo in obese mice predisposed to diabetes and in vitro in normal and colon cancer cells.

Materials and methods

Reagents, antibodies and chemicals

Rapamycin (Santa Cruz, sc-3504), MHY1485 (Sigma, SML0810) and azaserine (Sigma, A4142) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 1 mM, 5 mM and 20 mM as

stock solutions, respectively. Glucosamine was obtained from Sigma (G1514). Mouse monoclonal anti-*O*-GlcNAc (RL2) was purchased from Thermo Scientific (MA1-072), rabbit polyclonal anti-OGT (Ti-14) was purchased from Sigma-Aldrich (#O6014) and rabbit polyclonal anti-mTOR (#2983), rabbit polyclonal anti-phospho-mTOR (Ser2448, #5536), rabbit polyclonal anti-p70S6K (#2708), rabbit polyclonal anti-phospho-p70S6K (Thr389, #9234) and mouse clonal anti-GAPDH (#47724) were purchased from Cell Signaling. Rabbit monoclonal anti-OGA was from Abcam. Scrambled control siRNA (siCtrl) was obtained from Sigma (MISSION siRNA universal negative control #1) and siRNA targeting human OGA (siOGA) was purchased from Dharmacon (siGenome Smart Pool, Human MGEA5, M-012805-01).

Cell culture and synchronization

Human fetal colon CCD841CoN and colon carcinoma HCT116 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). CCD841CoN were cultured in Eagle's minimum essential medium (EMEM, Lonza) with 5 mM glucose and HCT116 were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Lonza) supplemented with 25 mM glucose. Both cell lines were maintained in medium supplemented with 10% (v/v) heat inactivated fetal calf serum (FCS) and 2 mM L-glutamine at 37 °C, in a 5% (v/v) CO₂-enriched, humidified atmosphere. After been plated for 24 h, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and then were synchronized in serum-free medium for 24 h.

mTOR regulators treatment

Twenty-four hours synchronized CCD841CoN and HCT116 cells were treated for 48 h with rapamycin (10 or 50 nM) or MHY1485 (10 μ M) in DMEM medium containing 10% (v/v) FCS, 5 mM glucose and 1% (v/v) MACS bovine serum albumin (BSA) Stock Solution (Miltenyi Biotec). For time course experiments, cells were pre-treated 1 h with rapamycin (50 nM) before stimulation with 10% (v/v) FCS.

Hexosamine biosynthetic pathway (HBP) regulators treatment

CCD841CoN and HCT116 cells were synchronized for 30 h and then treated with DMEM medium containing 25 mM glucose and 10% (v/v) FCS with or without azaserine (75 μ M) and/or glucosamine (5 mM) for 24 h.

Small interfering RNA (siRNA) reverse transfection

SiCtrl or siOGA (5 nM) were administered for 78 h to CCD841CoN and HCT116 cells with Lipofectamine™

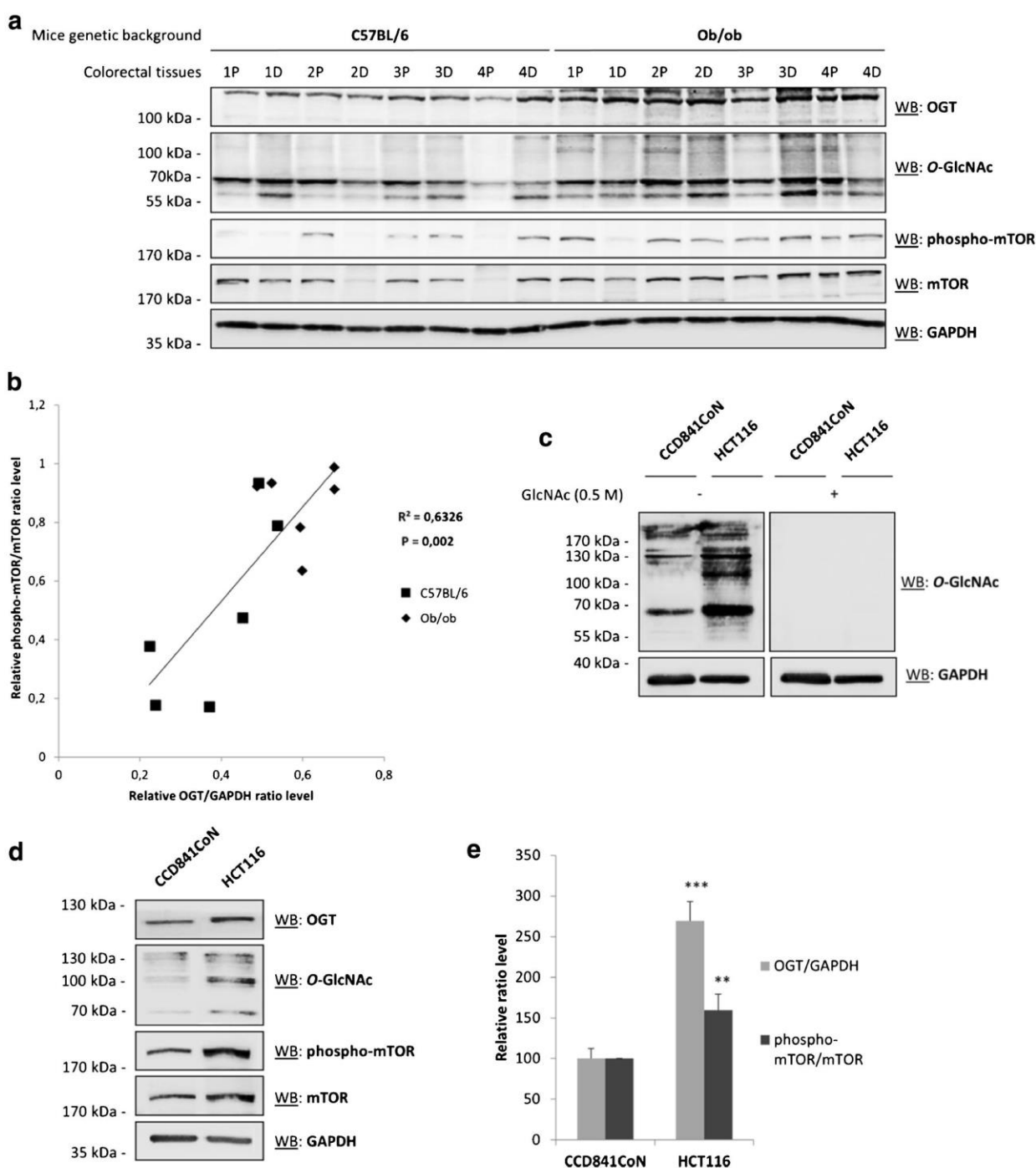


Fig. 1 Metabolism disruption induces *O*-GlcNAcylation increase correlated with activation of mTOR signaling in vivo and in vitro. **a** OGT, *O*-GlcNAcylation, phospho-mTOR and mTOR levels were analyzed by Western blot in proximal (P) and distal (D) tissues of four C57BL/6 and four ob/ob mice. **b** A correlation between ratios of phospho-mTOR/mTOR and OGT/GAPDH is found. The linear regression line, the R-square and the *P* value for the F-test are shown on. **c** Specificity of *O*-GlcNAc antibody (RL2) was confirmed by binding

competition of the antibody with 0.5 M free-GlcNAc prior to use on synchronized CCD841CoN and HCT116 proteins in WB analyses. **d** Synchronized normal CCD841CoN and cancer HCT116 colon cells were analyzed by using the same antibodies and **e** histograms of OGT/GAPDH and phospho-mTOR/mTOR ratios are represented. Data shown are the average \pm standard derivation (SD) of three independent experiments. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 Student's t-test

RNAiMAX reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Twenty four hours later, cells were synchronized for 30 h and then stimulated with DMEM containing 25 mM glucose and 10% (v/v) FCS.

Cells lysis and western blot analysis

One hour before lysis, cells were incubated with 100 μ M sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich) to inhibit tyrosine phosphatases. Then, cells were washed with 10 mL cold PBS, then lysed on ice for 20 min in cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% SDS (w/v), 1% Triton-X100 (v/v), pH 7.4) containing the complete proteases inhibitors (protease cocktail inhibitors from Roche Diagnostics, Meylan, France), 50 mM sodium fluoride (Sigma-Aldrich), 100 μ M orthovanadate; pH 7.4). The cell lysates were centrifuged at 20,000 \times g for 10 min at 4 $^{\circ}$ C. The supernatants were collected and protein concentrations were measured using the microBCA protein assay kit (Pierce, Fisher Scientific, Illkirch, France). Proteins (30 μ g) were resolved by 8% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (HybondTM-C EXTRA, GE Healthcare Technology, Orsay, France). Membranes were blocked in 5% (w/v) nonfat dry milk or BSA in Tris-Buffered Saline (TBS) containing 0.05% Tween 20 (v/v) (TBS-T) and probed overnight at 4 $^{\circ}$ C with primary antibodies diluted in milk blocking solution: anti-RL2 (1:4000), anti-Ti14 (1:2000) and anti-GAPDH (1:5000) or BSA blocking solution: anti-OGA (1:10000), anti-mTOR (1:1000), anti-phospho-mTOR (1:1000), anti-p70S6K (1:1000) and anti-phospho-p70S6K (1:1000). After 3 TBS-T washes, membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-mouse/rabbit IgG-HRP linked, 1:10000, GE Healthcare) for 1 h at room temperature. After 4 washes in TBS-T, blots were developed using enhanced chemiluminescence (ECL plus Reagent, GE Healthcare). After detection of phosphoproteins, blots were stripped in the antibody stripping buffer (Gene Bio-Application LTD, Euromedex, Souffelweyersheim, France) for 15 min at room temperature, extensively washed in TBS-T and re-probed using the antibodies against the non-phosphorylated corresponding protein forms. Densitometry measurements were obtained using a chemiluminescence imaging system Fusion Solo (Vilber Lourmat) including the Fusion-Capt[®] software for image acquisition and analysis.

In vivo experiments

Four C57BL/6 and four ob/ob obese male mice were purchased from the provider Charles River Elevage (Saint-Germain sur l'Arbresle, France). Procedures were carried out according to the French guidelines for the care of experimental animals. Mice were adapted to the

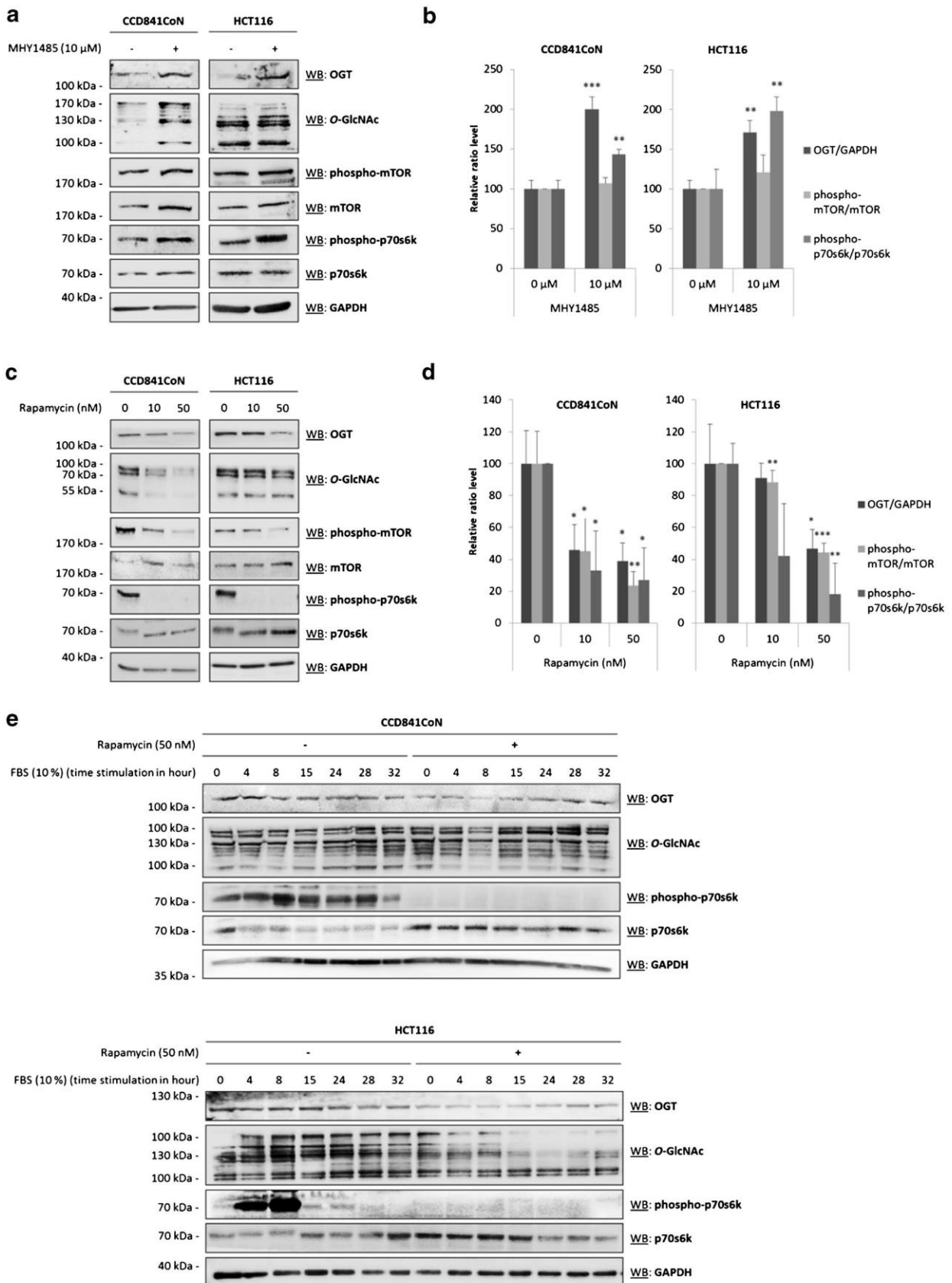
environment for 1 week prior to study and maintained in a 12 h light/dark cycle with water and standard diet (65% carbohydrate, 11% fat and 24% protein; SAFE, Augy, France). After three weeks, animals were sacrificed and proximal/distal colon tissues were flash-frozen and stored at -80° C until protein extraction.

Results

Effect of metabolism disruption on mTOR signaling activation in vivo and in vitro

First, we questioned whether a global metabolism disruption can modulate mTOR signaling in colons of the obese ob/ob mice model in comparison with normal C57BL/6. Proximal and distal colons were isolated, and levels of *O*-GlcNAc, OGT, phospho-mTOR and mTOR were analyzed by Western Blot (Fig. 1a). Western Blot analysis of phosphorylation of mTOR was monitored to evaluate the activation status of the mTOR pathway. As we expected, compared to C57BL/6 mice, ob/ob mice express higher levels of OGT and *O*-GlcNAcylation. However, there is no correlation between these expression levels and proximal or distal tissue localization (Fig. 1a). On the other hand, there is a strong positive correlation ($p = 0,002$) between phospho-mTOR/mTOR and OGT/GAPDH ratios (Fig. 1a and b). Thus, C57BL/6 mice with low levels of OGT exhibit weakly activated mTOR signaling. On the contrary, ob/ob mice with higher levels of OGT show increased activation of the mTOR pathway. We confirmed the specificity of the RL2 antibody against the *O*-GlcNAcylation modification by preincubating it with free GlcNAc (Fig. 1c). In parallel, in vitro experiments were performed in normal CCD841CoN and in highly metabolically active HCT116 colon cancer cells (Steenackers et al. 2016). HCT116 cells exhibits higher levels of OGT and *O*-GlcNAc when compared to CCD841CoN cells (Fig. 1d and e). Furthermore, aberrant *O*-GlcNAcylation in cancer cells is also associated with an increased expression of phospho-mTOR (Fig. 1d and e). These data support the hypothesis that a

Fig. 2 Activated mTOR signaling increases OGT and *O*-GlcNAc levels in colon cell lines. **a** OGT, *O*-GlcNAcylation, phospho-mTOR, mTOR, phospho-p70S6K and p70S6K levels were measured by Western Blot in synchronized normal CCD841CoN and HCT116 colon cancer cells treated for 48 h with **a** MHY1485 (10 μ M) or **c** rapamycin (10 or 50 nM). **b** and **d** Histograms of OGT/GAPDH, phospho-mTOR/mTOR and phospho-p70s6k/p70s6k ratios are represented. Data shown are the average \pm standard derivation (SD) of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ Student's t-test. **e** OGT, *O*-GlcNAcylation, phospho-p70S6K and p70S6K levels were measured by Western Blot in synchronized CCD841CoN and HCT116 cells pretreated with or without rapamycin (50 nM) and stimulated by fetal calf serum (FCS 10% (v/v), from 4 to 32 h)



disruption in metabolism associated with obesity or cancer phenotype induces an increase in *O*-GlcNAcylation correlated with activation of the mTOR pathway *in vivo* and *in vitro*.

Effect of mTOR signaling on *in vitro* *O*-GlcNAcylation

We next studied the effect of pharmacological regulation of mTOR pathway on OGT and *O*-GlcNAc levels *in vitro*. CCD841CoN and HCT116 cells were treated with vehicle control or the mTOR pharmacological activator (MHY1485) (Fig. 2a) or inhibitor (Rapamycin) (Fig. 2c and e). Western Blot analyses of phosphorylation of mTOR and of its target p70S6K were monitored to evaluate the activation status of mTOR pathway. Treatment with MHY1485 results in mTOR pathway activation with a slight increased phosphorylation of mTOR and a significant increased phosphorylation of p70S6K in CCD841CoN and HCT116 cells (Fig. 2a and b). Furthermore, this signaling activation was accompanied by increased levels of OGT and *O*-GlcNAcylation (Fig. 2a and b). On the contrary, cell treatment with increasing concentrations of rapamycin (10 or 50 nM) decreases phosphorylation of mTOR in a dose-dependent manner and totally inhibits phosphorylation of p70S6K in both cell lines (Fig. 2c and d). At the same time, rapamycin induced a dose-dependent decrease of OGT expression and of global *O*-GlcNAcylation in both cell lines but with a different sensitivity to the inhibitor: 50 nM are required for HCT116 cells to reach a significant diminution of OGT and *O*-GlcNAc levels, whereas 10 nM is sufficient for normal cells (Fig. 2c and d). A time-course experiment of mTOR signaling induces by stimulation with 10% (v/v) FCS shows that FCS activates mTOR signaling in a time-dependent manner in both cell lines with a maximum of p70S6K phosphorylation reaches at 8 h (Fig. 2e). This signaling activation was accompanied by increased levels of OGT and *O*-GlcNAcylation up to 4 h for CCD841CoN cells and 15 h for HCT116 cells. In parallel, rapamycin treatment inhibits activation of mTOR (as shown by total inhibition of p70S6K phosphorylation) and diminished OGT and *O*-GlcNAcylation global levels compared to non-treated cells (Fig. 2e). Together, these results indicate that activated mTOR signaling increases OGT and *O*-GlcNAcylation levels in normal and colon cancer cells.

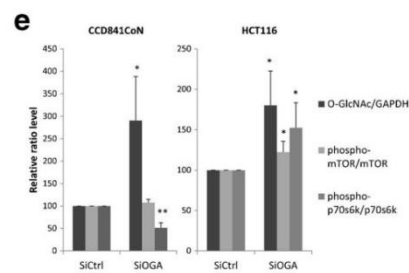
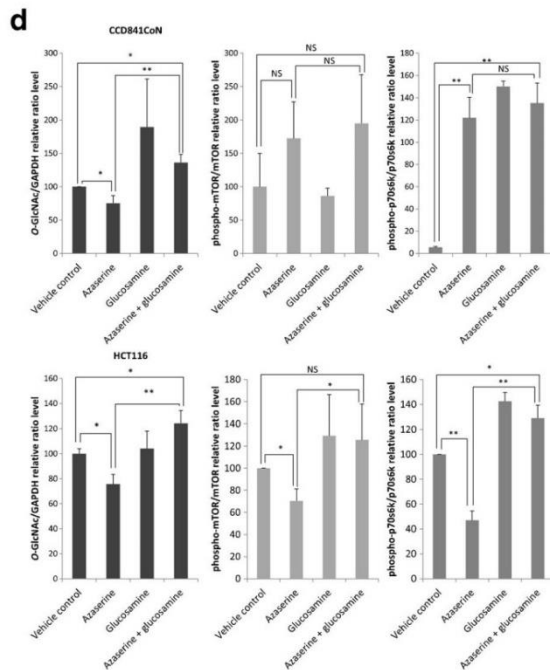
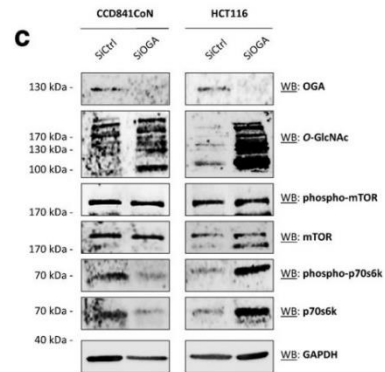
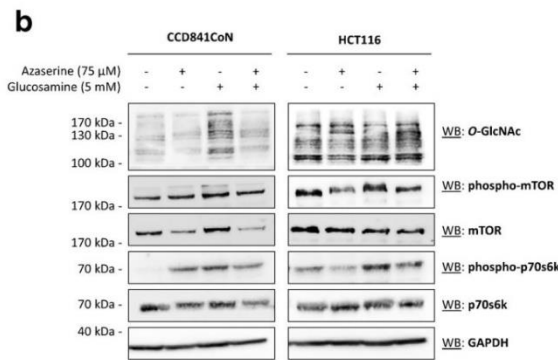
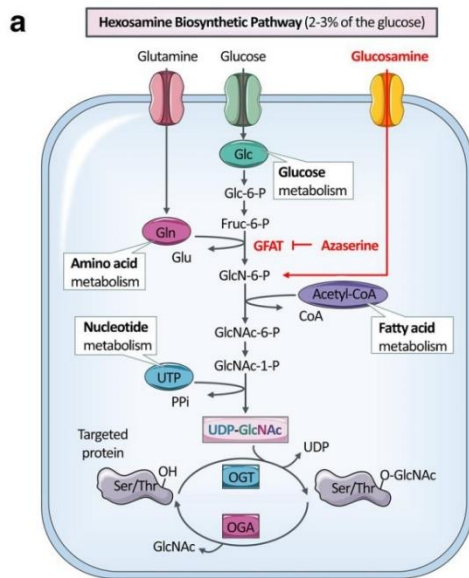
Effect of *O*-GlcNAcylation on mTOR activation *in vitro*

Lastly, we studied the effect of *O*-GlcNAcylation on mTOR activation *in vitro*. In the one hand, we wondered whether the activation of mTOR signaling is dependent on HBP flux. The HBP pathway was explored using azaserine, an inhibitor of its rate-limiting enzyme glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT), and glucosamine that upregulates HBP by bypassing GFAT

(Fig. 3a). We note that *O*-GlcNAc levels are decreased in CCD841CoN and HCT116 cells treated with azaserine and are rescued after co-treatment with glucosamine (Fig. 3b). In CCD841CoN cells, azaserine does not significantly affect phosphorylation of mTOR but decreases the total level of mTOR protein. In the same time, azaserine increases activation of p70S6K (phospho-p70S6K). However, co-treatment with azaserine and glucosamine does not modify the regulation induced by azaserine alone. In contrast, in HCT116 cancer cells, azaserine induces a decrease in phosphorylation of mTOR and p70S6K which are rescued after conjunction treatment with glucosamine (Fig. 3b and d). These results support a role of HBP flux and likely *O*-GlcNAcylation in activation of mTOR signaling in cancer cells. To confirm this hypothesis, we next up-regulated *O*-GlcNAcylation levels by transfecting cells with siRNA to down-regulate OGA expression. In normal CCD841CoN cells, increased *O*-GlcNAcylation has no significant effect on expression of total and phosphorylated forms of mTOR while phosphorylated form and total p70S6K protein levels are diminished (Fig. 3c and e). On the contrary, in cancer HCT116 cells, OGA knockdown enhances phosphorylation of mTOR and p70S6K as well as corresponding total protein levels (Fig. 3c and e). These results demonstrate that *O*-GlcNAcylation participates in mTOR signaling activation in a pathological context of colon cancer cells.

Fig. 3 *O*-GlcNAcylation activates mTOR signaling in colon cancer cells. ▶

a Schematic representation of the HBP and *O*-GlcNAcylation dynamic. GFAT is the rate-limiting step of the HBP and can be pharmacologically inhibited by azaserine or bypassed by glucosamine. The nucleotide sugar UDP-GlcNAc is synthesized through the HBP at the crossroad of glucose, amino acids, fatty acids and nucleotides metabolisms. UDP-GlcNAc is used by OGT as substrate to add GlcNAc to serine and threonine residues of target proteins and OGA removes *O*-GlcNAc moiety. Glc-6-P: glucose-6-phosphate; Fruc-6-P: fructose-6-phosphate, GlcN-6-P: glucosamine-6-phosphate; GlcNAc-6-P: N-acetylglucosamine-6-phosphate, GlcNAc-1-P: N-acetylglucosamine-1-phosphate. **b** *O*-GlcNAcylation, phospho-mTOR, mTOR, phospho-p70S6K and p70S6K levels were analyzed by Western blot in synchronized normal CCD841CoN and HCT116 colon cancer cells treated for 24 h with or without azaserine (75 μ M) and/or glucosamine (5 mM). **d** Histograms of *O*-GlcNAc/GAPDH, phospho-mTOR/mTOR and phospho-p70s6k/p70s6k ratios are represented. Data shown are the average \pm standard deviation (SD) of three independent experiments. NS $P > 0.5$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ one-way ANOVA test. **c** OGA, *O*-GlcNAcylation, phospho-mTOR, mTOR, phospho-p70S6K and p70S6K levels were monitored by Western blot in synchronized CCD841CoN and HCT116 cells transfected with siCtrl or siOGA (5 nM) for 78 h. **e** Histograms of *O*-GlcNAc/GAPDH, phospho-mTOR/mTOR and phospho-p70s6k/p70s6k ratios are represented. Data shown are the average \pm SD of three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ Student's t-test



Discussion

Nutrient excess is mainly responsible for obesity and diabetes whose incidences are progressing rapidly in industrialized countries. Notably, after being metabolized by HBP, increasing concentrations of circulating glucose and free fatty acids can participate to insulin resistance associated with type 2 diabetes (Ruan et al. 2013). In diabetic humans and animals, a significant increase in *O*-GlcNAcylation level is detected in many tissues including liver (Ruan et al. 2012; Baldini et al. 2016), heart (Fricovsky et al. 2012), leukocytes (Springhorn et al. 2012) and erythrocytes (Park et al. 2010). Here, we show that levels of OGT and *O*-GlcNAcylation are increased in ob/ob mice colon tissues and are associated with a higher activation of the nutrient sensing pathway mTOR. Several studies showed that activation of mTOR signaling can contribute to the development of insulin resistance (Tremblay and Marette 2001; Berg et al. 2002; Shah et al. 2004; Tremblay et al. 2005; Tzatsos and Kandror 2006). Elevated levels of glucose and leucine decrease AMP-activated protein kinase (AMPK) activity and activate mTOR signaling that leads to phosphorylation of IRS-1 by a negative feedback loop and reduction of insulin signaling (Saha et al. 2010). Moreover, Ishimura et al. demonstrated that AMPK is *O*-GlcNAcylation in colon cancer cells and that increase of this PTM reduces AMPK phosphorylation and results in mTOR pathway activation (Ishimura et al. 2017). Thus, by this way and by targeting several other actors of insulin signaling (Federici et al. 2002; Park et al. 2005; Ball et al. 2006), *O*-GlcNAcylation could directly contribute to insulin resistance.

In addition, we show here that OGT, *O*-GlcNAcylation and mTOR signaling are also increased in HCT116 colon cancer cells compared to CCD841CoN normal cells. A glucose metabolism dysregulation is also described in cancer (Ruan et al. 2013). The Warburg effect, an adaptive metabolic shift from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis, allows cancer cells to favor energy production and macromolecules biosynthesis by increasing glucose and glutamine consumption (Warburg 1956a, b). Two-to-3 % of glucose entering the cell is metabolized by HBP to produce the nucleotide sugar UDP-GlcNAc (Marshall et al. 1991). Elevation of OGT and *O*-GlcNAcylation levels was described in many cancer types including colorectal (Mi et al. 2011), breast (Caldwell et al. 2010) or hepatic (Zhu et al. 2012) tumors. *O*-GlcNAcylation can target several tumor suppressors such as p53 (Yang et al. 2006) and the retinoblastoma protein (Rb) (Wells et al. 2011), or oncoproteins like β -catenin (Olivier-Van Stichelen et al. 2012; a; 2014; Zhou et al. 2016), c-Myc (Kamemura et al. 2002; Itkonen et al. 2013) and forkhead box protein M1 (FoxM1) (Caldwell et al. 2010). We show that OGT and

O-GlcNAcylation levels are under mTOR control in both normal and colon cancer cells. The underlying molecular mechanism of such a regulation has to be further deciphered. mTOR is a central regulator of cell growth, differentiation and survival and consequently its dysregulation plays a critical role in cancer proliferation, migration, invasion and metastasis (Zhou and Huang 2011). In this sense, *O*-GlcNAc regulation by mTOR signaling could be a conserved mechanism between normal and cancer cells.

Finally, we show that down-regulation and up-regulation of *O*-GlcNAcylation by GFAT inhibition or OGA knock-down respectively decreases and increases mTOR signaling activation. Our team (Steenackers et al. 2016) previously demonstrated that OGT expression is necessary for proliferation, survival, adhesion and migration of CCD841CoN and HCT116 cells. In this sense, we speculate that *O*-GlcNAcylation participate in colon oncogenesis, in part, by regulating biological properties of cancer cells via mTOR signaling. Actually, no study has proved that mTOR is directly targeted by *O*-GlcNAcylation; however some up-stream regulators such as IRS-1 (Park et al. 2005; Ball et al. 2006), PI3K (Federici et al. 2002) and AKT (Park et al. 2005) are *O*-GlcNAcylation. Moreover, p70S6K is also modified by *O*-GlcNAc (Zeidan et al. 2010). *O*-GlcNAcylation of these proteins could interplay with their phosphorylation status and therefore modify their folding, stability, subcellular localization, partners interaction or biological activity. Together our data indicate that a crosstalk between *O*-GlcNAcylation and mTOR signaling exists in contexts of metabolism dysregulation associated to obesity or cancer. Recently, Wani et al. described this crosstalk in primary neurons (Wani et al. 2017). These authors demonstrate that enhanced *O*-GlcNAcylation by pharmacological inhibition of OGA with Thiamet-G increases mTOR signaling activation, attenuates autophagic flux and increases α -synuclein accumulation characteristic in neurodegenerative diseases such as Parkinson. Reciprocally, mTOR inhibition by rapamycin decreased basal levels of protein *O*-GlcNAcylation. Because of evidence of *O*-GlcNAcylation and mTOR implications in cancer development and their established cross-regulation, one could propose targeting one or these two components to enhance efficiency of drug therapy treatments in CRC. Thus, inhibition of mTOR with pharmacological inhibitor Torin-1 (Francipane and Lagasse 2013) or reduced OGT level with RNA interference (Caldwell et al. 2010) have been shown to suppress tumor growth in vivo. Investigation in this field could lead to the development of better anti-mTOR therapeutic strategies such as more effective pharmacological inhibitors in combination with adapted diet. Indeed, Torin-2, which is synthesized with improved synthetic route and which has better pharmacokinetic properties (Liu et al. 2011), could be used more successfully in cancer than current clinical anti-mTOR treatments.

Acknowledgements This work was supported by the “Ligue Contre le Cancer/Comité du Nord” the “Fondation ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer),” the Région Nord-Pas de Calais (Cancer Regional Program), the University of Lille and the “Centre National de la Recherche Scientifique”. The authors are also grateful to the “Site de Recherche Intégré sur le Cancer” (SIRIC) ONCOLille and to FR 3688 FRABio. N.V. is the recipient of a fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche”.

References

- Baldini SF, Wavelet C, Hainault I et al (2016) The nutrient-dependent O-GlcNAcylation controls the expression of liver fatty acid synthase. *J Mol Biol* 428:3295–3304. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.035>
- Ball LE, Berkaw MN, Buse MG (2006) Identification of the major site of O-linked β -N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. *Mol Cell Proteomics* 5:313–323. <https://doi.org/10.1074/mcp.M500314-MCP200>
- Berg CE, Lavan BE, Rondinone CM (2002) Rapamycin partially prevents insulin resistance induced by chronic insulin treatment. *Biochem Biophys Res Commun* 293:1021–1027. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00333-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00333-9)
- Butkinaree C, Park K, Hart GW (2010) O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta* 1800:96–106. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.018>
- Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS et al (2010) Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 29:2831–2842. <https://doi.org/10.1038/ncr.2010.41>
- Dehennaut V, Hanouille X, Bodart J-F et al (2008) Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates *Xenopus* oocytes M-phase entry. *Biochem Biophys Res Commun* 369:539–546. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.063>
- Dehennaut V, Slomianny M-C, Page A et al (2008) Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in *Xenopus laevis* oocyte. *Mol Cell Proteomics* 7:2229–2245. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700494-MCP200>
- Federici M, Menghini R, Mauriello A et al (2002) Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* 106:466–472. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000023043.02648.51>
- Ferrer CM, Sodi VL, Reginato MJ (2016) O-GlcNAcylation in cancer biology: linking metabolism and signaling. *J Mol Biol* 428:3282–3294. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.028>
- Francipane MG, Lagasse E (2013) Selective targeting of human colon cancer stem-like cells by the mTOR inhibitor Torin-1. *Oncotarget* 4:1948–1962. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1310>
- Fricovsky ES, Suarez J, Ihm S-H et al (2012) Excess protein O-GlcNAcylation and the progression of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Phys* 303:R689–R699. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00548.2011>
- Hart GW, Akimoto Y (2009) The O-GlcNAc modification. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD et al (eds) *Essentials of Glycobiology*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O (2011) Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* 80:825–858. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060608-102511>
- Ishimura E, Nakagawa T, Moriwaki K et al (2017) Augmented O-GlcNAcylation of AMP-activated kinase promotes the proliferation of LoVo cells, a colon cancer cell line. *Cancer Sci*. <https://doi.org/10.1111/cas.13412>
- Itkonen HM, Minner S, Guldvik IJ et al (2013) O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 73:5277–5287. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0549>
- Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, Hart GW (2002) 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* 277:19229–19235. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201729200>
- Liu Q, Wang J, Kang SA et al (2011) Discovery of 9-(6-aminopyridin-3-yl)-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1H)-one (Torin2) as a potent, selective, and orally available mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for treatment of cancer. *J Med Chem* 54:1473–1480. <https://doi.org/10.1021/jm101520v>
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR (1991) Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* 266:4706–4712
- Mi W, Gu Y, Han C et al (2011) O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim Biophys Acta* 1812:514–519. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.01.009>
- Olivier-Van Stichelen S, Dehennaut V, Buzy A et al (2014) O-GlcNAcylation stabilizes β -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB J* 28:3325–3338. <https://doi.org/10.1096/fj.13-243535>
- Olivier-Van Stichelen S, Drougat L, Dehennaut V et al (2012) Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogene* 31:e36. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2012.36>
- Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir A-M et al (2012) The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of β -catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E417–E424. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00390.2011>
- Park K, Saudek CD, Hart GW (2010) Increased expression of β -N-Acetylglucosaminidase in erythrocytes from individuals with pre-diabetes and diabetes. *Diabetes* 59:1845–1850. <https://doi.org/10.2337/db09-1086>
- Park S, Pak J, Jang I, Cho J (2014) Inhibition of mTOR affects protein stability of OGT. *Biochem Biophys Res Commun* 453:208–212. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.047>
- Park SY, Ryu J, Lee W (2005) O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Exp Mol Med* 37:220–229. <https://doi.org/10.1038/emmm.2005.30>
- Perez-Cervera Y, Dehennaut V, Gil MA et al (2013) Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *FASEB J*. <https://doi.org/10.1096/fj.12-217984>
- Ruan H-B, Han X, Li M-D et al (2012) O-GlcNAc transferase/host cell factor C1 complex regulates gluconeogenesis by modulating PGC-1 α stability. *Cell Metab* 16:226–237. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.006>
- Ruan H-B, Singh JP, Li M-D et al (2013) Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 24:301–309. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.02.002>
- Saha AK, Xu XJ, Lawson E et al (2010) Downregulation of AMPK accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes* 59:2426–2434. <https://doi.org/10.2337/db09-1870>
- Shah OJ, Wang Z, Hunter T (2004) Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin

- resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol* 14:1650–1656. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.08.026>
- Sodi VL, Khaku S, Krutilina R et al (2015) mTOR/MYC Axis regulates O-GlcNAc transferase (OGT) expression and O-GlcNAcylation in breast cancer. *Mol Cancer Res* 13:923–933. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-14-0536>
- Springhorn C, Matsha TE, Erasmus RT, Essop MF (2012) Exploring leukocyte O-GlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 97:4640–4649. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2229>
- Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, Baldini SF et al (2016) Silencing the nucleocytoplasmic O-GlcNAc transferase reduces proliferation, adhesion, and migration of cancer and fetal human colon cell lines. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7:46. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00046>
- Tremblay F, Gagnon A, Veilleux A et al (2005) Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology* 146:1328–1337. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0777>
- Tremblay F, Marette A (2001) Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 276:38052–38060. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106703200>
- Tzatsos A, Kandror KV (2006) Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 26:63–76. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.1.63-76.2006>
- Wani WY, Ouyang X, Benavides GA et al (2017) O-GlcNAc regulation of autophagy and α -synuclein homeostasis; implications for Parkinson's disease. *Mol Brain* 10:32. <https://doi.org/10.1186/s13041-017-0311-1>
- Warburg O (1956a) On the origin of cancer cells. *Science* 123:309–314
- Warburg O (1956b) On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124:269–270
- Wells L, Slawson C, Hart GW (2011) The E2F-1 associated retinoblastoma-susceptibility gene product is modified by O-GlcNAc. *Amino Acids* 40:877–883. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0709-x>
- Yang WH, Kim JE, Nam HW et al (2006) Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol* 8:1074–1083. <https://doi.org/10.1038/ncb1470>
- Zeidan Q, Wang Z, De Maio A, Hart GW (2010) O-GlcNAc cycling enzymes associate with the translational machinery and modify Core ribosomal proteins. *Mol Biol Cell* 21:1922–1936. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-11-0941>
- Zhou F, Huo J, Liu Y et al (2016) Elevated glucose levels impair the WNT/ β -catenin pathway via the activation of the hexosamine biosynthesis pathway in endometrial cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 159:19–25. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.02.015>
- Zhou H, Huang S (2011) Role of mTOR signaling in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Curr Protein Pept Sci* 12:30–42
- Zhu Q, Zhou L, Yang Z et al (2012) O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med Oncol* 29:985–993. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-9912-1>

Revue N°2



Cross-Dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR Axis in Human Chronic Diseases

Ninon Very, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Tony Lefebvre, Stéphan Hardivillé and Ikram El Yazidi-Belkoura*

Université Lille, CNRS, UMR 8576—UGSF—Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, Lille, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Peter Blume-Jensen,
XTuit Pharmaceuticals, United States

Reviewed by:

Jonas Thue Treebak,
University of Copenhagen, Denmark
Edgar Zenteno,
Universidad Nacional Autónoma de
México, Mexico

*Correspondence:

Ikram El Yazidi-Belkoura
ikram.el-yazidi@univ-lille.fr

Specialty section:

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

Received: 20 July 2018

Accepted: 21 September 2018

Published: 09 October 2018

Citation:

Very N, Vercoutter-Edouart A-S,
Lefebvre T, Hardivillé S and El
Yazidi-Belkoura I (2018)
Cross-Dysregulation of
O-GlcNAcylation and
PI3K/AKT/mTOR Axis in Human
Chronic Diseases.
Front. Endocrinol. 9:602.
doi: 10.3389/fendo.2018.00602

The hexosamine biosynthetic pathway (HBP) and the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway are considered as nutrient sensors that regulate several essential biological processes. The hexosamine biosynthetic pathway produces uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), the substrate for O-GlcNAc transferase (OGT), the enzyme that O-GlcNAcyates proteins on serine (Ser) and threonine (Thr) residues. O-linked β -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) and phosphorylation are highly dynamic post-translational modifications occurring at the same or adjacent sites that regulate folding, stability, subcellular localization, partner interaction, or activity of target proteins. Here we review recent evidence of a cross-regulation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and protein O-GlcNAcylation. Furthermore, we discuss their co-dysregulation in pathological conditions, e.g., cancer, type-2 diabetes (T2D), and cardiovascular, and neurodegenerative diseases.

Keywords: O-GlcNAcylation, PI3K/AKT/mTOR, cancer, diabetes, cardiovascular, neurodegenerative diseases

INTRODUCTION

O-linked β -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) is a dynamic modification of serine (Ser) and threonine (Thr) amino acids of cytoplasmic, nuclear (1), and mitochondrial (2) proteins with a single residue of N-acetylglucosamine (GlcNAc). This post-translational modification is controlled by two single antagonist enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and O-GlcNAcase (OGA), which transfer and remove the GlcNAc moiety, respectively. The nucleotide sugar donor, uridine diphosphate N-acetylglucosamine (UDP-GlcNAc), is the final product of the hexosamine biosynthetic pathway that is at the nexus of glucose, amino acid, lipid, and nucleotide metabolisms (Figure 1). Consequently, O-GlcNAcylation is considered as a cellular nutrient sensor linking nutrient availability to intracellular signaling and biological responses. To date, thousands of O-GlcNAcyated proteins endowing a wide range of functions have been identified and most of them are also phosphoproteins (3). In fact, O-GlcNAcylation and phosphorylation can modulate each other at the same or adjacent sites (4).

Over the last decade, emerging evidence has indicated that a cross-talk exists between O-GlcNAcylation and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway (5). The PI3K/AKT/mTOR signaling pathway is a key transducer of metabolic and mitogen signals (such as energy, amino acids, insulin or growth factors) that modulate gene expression, protein translation and cellular metabolism, thus regulating cell growth and proliferation (Figure 1). Aberrant activation of this signaling pathway as well as altered protein O-GlcNAcylation have both described in several types of cancer, cardiovascular and metabolic diseases, aging, and neurodegeneration in human (6–8). This mini-review summarizes and discusses recent evidence linking cross-regulation and co-dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in physiological conditions and in human chronic diseases, respectively.

THE PI3K/AKT/MTOR SIGNALING PATHWAY AND ITS CROSS-REGULATION WITH PROTEIN O-GLCNACYLATION

Binding of insulin or growth factors to their plasma membrane tyrosine kinase receptors (RTK) triggers the phosphorylation of PI3K, either directly by the RTK or indirectly *via* phosphorylation of adapter signaling proteins such as insulin receptor substrate-1 or 2 (IRS-1/2; Figure 1). Phospho-PI3K catalyzes the formation of membrane phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) which drives the activation of the phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK-1) and the recruitment of AKT. The latter is partially activated through initial phosphorylation at Thr308 by PDK-1 and fully activated after phosphorylation at Ser473 by the mTOR complex 2 (mTORC2) (9). Once activated, AKT phosphorylates several downstream effectors [e.g., mTOR, forkhead box proteins O (FoxO), glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), BCL-2-associated agonist of cell death (BAD) or endothelial nitric oxide synthase (eNOS)] that in return regulate and coordinate a variety of cellular responses including cell proliferation, survival and growth, glucose metabolism, and angiogenesis (9). Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2), inhibited by AKT-dependent phosphorylation, is a critical negative regulator of mTOR complex 1 (mTORC1). mTORC1 induces protein synthesis through phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein-1 (4E-BP1) and ribosomal

protein S6 kinase (p70S6K) (9). mTORC1 also regulates nucleotide, lipid and glucose metabolisms, angiogenesis and autophagy processes by regulating alpha-activating transcription factor 4 (ATF4), lipin-1, hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) or Unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1) (10, 11). In response to amino acid stimulation, mTORC1 is recruited to the lysosomal surface where it is activated by Ras homolog enriched in brain (Rheb) (9). Upon elevated AMP/ATP ratio, AMP-activated protein kinase (AMPK) phosphorylates, and activates TSC2 leading to inhibition of mTORC1 activity (10, 11).

In parallel, O-GlcNAcylation targets proteins involved in transcription, translation, ubiquitin-proteasomal degradation, signal transduction, stress response, cellular trafficking and architecture, cell cycle, apoptosis, and development (12). OGT activity is sensitive to UDP-GlcNAc levels, thus, addition of glucose or glucosamine globally increases levels of O-GlcNAcylation (13).

Many studies have established a complex interplay between PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and protein O-GlcNAcylation (Figure 1). After insulin stimulation, the C-terminal PIP-binding domain of OGT (PPO) allows its translocation from the nucleus to the plasma membrane in murine 3T3-L1 adipocytes (14) and African green monkey COS-7 fibroblasts (15), and possibly to lipid rafts as observed in the human hepatic cancer cell line HepG2 (16). This translocation possibly facilitates the tyrosine phosphorylation of OGT by the insulin receptor (IR), which increases its enzymatic activity (17). The cellular energy sensor AMPK also regulates OGT. AMPK phosphorylates OGT at Thr444, which induces its nuclear translocation in differentiated C2C12 skeletal muscle myotubes (18) and promotes its dissociation from chromatin in human embryonic kidney 293T cells (19). In HepG2 cells, it has been further shown that OGT phosphorylation by AMPK inhibits histone H2B O-GlcNAcylation and gene transcription (19). In contrast, OGT targets several actors from the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, including IRS-1 (17, 20–24), PI3K (23), PDK1 (17), AKT (21, 25–27), AMPK (18, 19), 4E-BP1 (28), and p70S6K (29). Indeed, these proteins are O-GlcNAc-modified in IR and insulin growth factor-1 receptor (IGF-1R) expressing cell types including adipocytes, myocytes, hepatocytes, pancreatic beta (β) cells, endothelial cells, kidney and retina cells (30). However, only few studies have investigated the molecular impacts of O-GlcNAcylation on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and the subsequent biological effects under physiological conditions. O-GlcNAc modification of IRS-1 and AKT inhibits their activity either by disruption of their interaction with PI3K and PDK1 kinases, respectively, in 3T3-L1 adipocytes and MCF-7 breast cancer cell lines (17, 26), either by a “Yin-Yang” competition mechanism with activating phosphorylation as described in rat primary adipocytes and INS-1 pancreatic β cell lines (25, 27). O-GlcNAcylation also enhances 4E-BP1 stability *in vitro* in rat retinal TR-MUL Müller cells an *in vivo* in murine retinal cells, potentially by preventing its phosphorylation-dependent ubiquitin-mediated degradation (28). Protein O-GlcNAcylation could hence potentiate cellular nutrient sensing capacity of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in order to regulate crucial intracellular processes.

Abbreviations: 4E-BP1, eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein-1; AD, Alzheimer's disease; AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; BAD, BCL-2-associated agonist of cell death; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; FoxO, forkhead box protein O; GlcNAc, N-acetylglucosamine; GLUT, glucose transporter; GSK3 β , glycogen synthase kinase 3 β ; HBP, hexosamine biosynthetic pathway; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1 α ; IR, insulin receptor; IRS-1, insulin receptor substrate-1; mTOR, mammalian target of rapamycin; mTORC, mTOR complex; O-GlcNAcylation, O-linked β -N-acetylglucosaminylation; OGA, O-GlcNAcase; OGT, O-GlcNAc transferase; p70S6K, ribosomal protein S6 kinase; PDK-1, phosphoinositide-dependent protein kinase-1; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PIP3, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; T2D, type-2 diabetes; Tau, tubulin-associated unit; UDP-GlcNAc, uridine diphosphate N-acetylglucosamine.

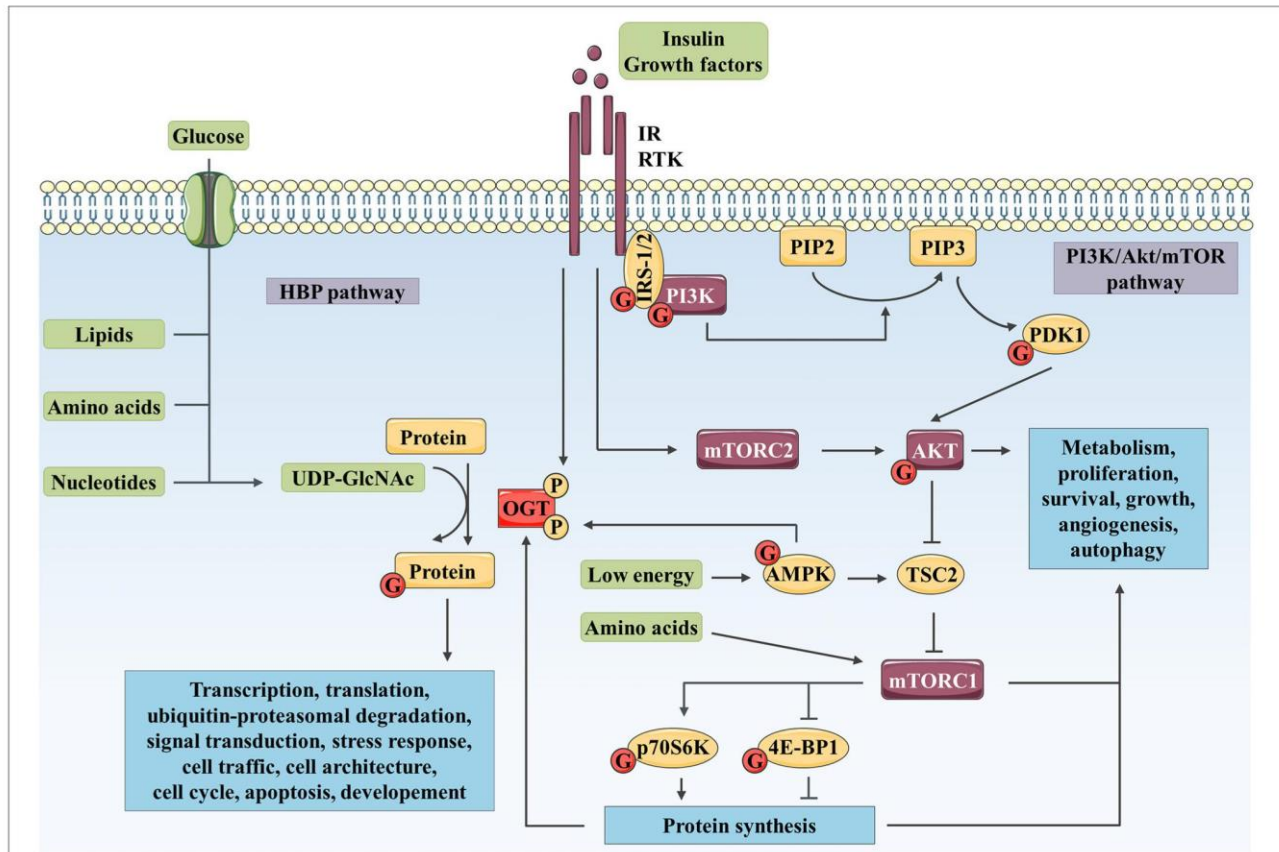


FIGURE 1 | Complex interplay between O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway controls numerous biological processes. The HBP integrates a fraction of the glucose entering the cell as well as lipid, nucleotide, and amino acid metabolites to produce UDP-GlcNAc. Then, OGT uses UDP-GlcNAc as a nucleotide sugar donor substrate to add a GlcNAc group on serine and threonine residues of target proteins. Like phosphorylation, O-GlcNAcylation is a dynamic and reversible post-translational modification. Its targets are involved in a wide range of biological processes such as transcription, translation, ubiquitin-proteasomal degradation, signal transduction, cell traffic and architecture, cell cycle, apoptosis or development. In parallel, binding of insulin or growth factor to their RTK leads to receptor activation and recruitment of IRS-1/2 and PI3K. PI3K produces PIP3 (from PIP2), which recruits AKT and PDK1 to the plasma membrane. PDK1 and mTOR in mTORC2 activate AKT through phosphorylation. mTORC1 is activated by AKT through TSC2 inhibition and upon amino acid stimulation and, is inhibited in response to low energy by AMPK. mTORC1 promotes protein synthesis via direct phosphorylation of p70S6K and 4E-BP1. By phosphorylating key substrates, AKT and mTORC1 regulate metabolism, cell cycle, proliferation, survival, growth, angiogenesis and autophagy. OGT localization and activity are regulated through phosphorylation by IR and AMPK. OGT stability is indirectly regulated at the protein synthesis level via mTORC1. Reciprocally, several actors of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway are modified by O-GlcNAcylation such as IRS-1, PI3K, PDK1, AKT, AMPK, p70S6K, and 4E-BP1.

O-GLCNACYLATION AND PI3K/AKT/MTOR SIGNALING PATHWAY CROSS-DYSREGULATION IN HUMAN DISEASES

Cancer

The Warburg effect is a metabolic reprogramming of the cell from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis that allows energy production and *de novo* macromolecule synthesis required to sustain cancer cells proliferation and growth. Enhanced glucose and glutamine uptake observed in the Warburg effect would lead to an increased flux through HBP and the hyper-O-GlcNAcylation that has been observed in many cancers (31). Aberrantly activated PI3K/AKT/mTOR signaling

pathway is known to play a central role in aerobic glycolytic reprogramming, tumor growth, and survival (32), and a cross-talk between PI3K/AKT/mTOR signaling and O-GlcNAcylation has been observed in several cancers.

Insulin or serum growth factors stimulation lead to increased OGT expression in a PI3K-dependent manner in HepG2 and MCF-7 cell lines (16, 33). Although it was not investigated in these studies, it is likely that this effect could be related to mTOR activation. Since it was observed that pharmacological inhibition of mTOR enhances proteasomal and autophagic degradation of OGT in HepG2 cells (34). We have also demonstrated that inhibition of mTOR affects OGT protein level and overall O-GlcNAcylation levels in HCT116 colon cancer cell line (35). In breast cancer cell lines the positive regulation of OGT

expression through mTOR is dependent on c-Myc-induced heat shock protein 90A (HSP90A) transcription (36). This chaperone binds to OGT and prevents its proteasomal degradation (36). Additionally, the transcriptional regulator Yes-associated protein (YAP) strongly activates the OGT promoter in hepatic cancer cell lines. In turn, O-GlcNAcylation of YAP promotes its stability, and its tumorigenic activity both *in vitro* and *in vivo* in liver cancer mouse models showing that a positive feedback is set up in liver tumorigenesis (37). YAP is activated by PI3K in hepatocellular (38) and mammary carcinoma (39), but has been shown to regulate PI3K/AKT/mTOR signaling in the MCF 10A human immortalized mammary epithelial cell line (40). These recent works highlight once more the tight link that exists in cancer cells between PI3K/AKT/mTOR axis and OGT activity.

O-GlcNAcylation impacts PI3K/AKT and mTOR axis in cancer cells. Pre-B acute lymphocytic leukemia (pre-B-ALL) cells overexpress OGT and exhibit a higher O-GlcNAcylation levels and an overactivation of PI3K, AKT and c-Myc compared to normal B cells. This dysregulation is associated with the overexpression of the transcription factor *HIF-1 α* and its target glycolytic genes such as *glucose transporter 1 (GLUT1)*, *hexokinase 2 (HK2)*, *phosphofructokinase-1 (PFK-1)* and *lactate dehydrogenase A (LDHA)*. OGT knockdown, in pre-B-ALL cells, decreases PI3K and AKT activation and glycolysis, resulting in a reduced cell proliferation and apoptosis. These inhibitory effects can be partly rescued by IGF-1 mediated stimulation of PI3K/AKT, indicating that effect of OGT on glycolysis is, in part, PI3K/AKT-dependent (41). Similarly, in 3D cultures of T4-2 breast cancer cells, OGT inhibition or silencing suppresses AKT signaling and glycolytic activity (42) (Figure 2).

In addition to glycolysis, regulation of PI3K/AKT signaling by O-GlcNAcylation was shown to modulate proliferation, growth and invasion properties of cancer cells (32, 42–47). We have demonstrated that knockdown or pharmacological inhibition of OGT decreases PI3K activation and prevents serum-stimulated cyclin D1 synthesis, leading to a delay in proliferation of MCF-7 cells (33). Since AKT prevents ubiquitin-mediated degradation of cyclin D1 by inhibiting GSK3 β activity in the murine NIH/3T3 fibroblast cell line (43), it is likely that the decrease in cyclin D1 level could result from an increase of its proteasomal degradation under low O-GlcNAcylation levels. Reciprocally, enhanced O-GlcNAcylation level stimulates PIP3 production and AKT phosphorylation in MCF-7 cells (44). Similar results showed that hyper-O-GlcNAcylation induced by OGA down-regulation in 8305C thyroid anaplastic tumor cell line stimulates proliferation through increased phosphorylation of AKT at Ser473 and cyclin D1 amount (45). Additionally, glucose deprivation in osteosarcoma U2OS cell line attenuates protein O-GlcNAcylation, phosphorylation of IRS-1 and AKT, production of PIP3 and suppresses cell growth (46). Importantly, in these cell line, insulin signaling pathway, and tumor growth can be rescued by glucosamine-mediated increased HBP flux and O-GlcNAcylation (46). In parallel, increased O-GlcNAcylation promotes gastric and thyroid cancer cells invasion in a PI3K/AKT dependent manner, since the pro-invasion effect of O-GlcNAcylation is suppressed by PI3K inhibition or AKT silencing (47, 48).

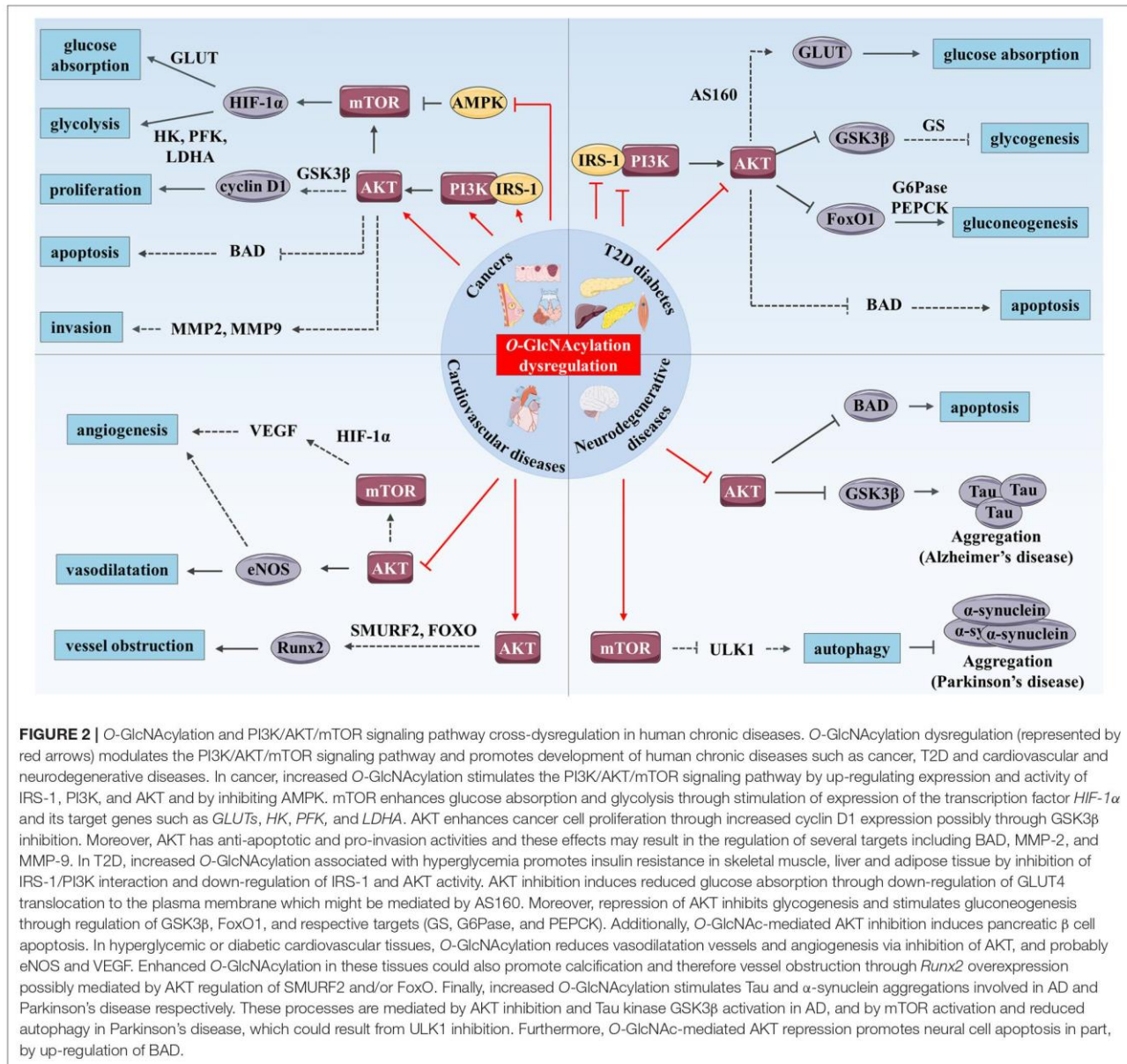
This may result from the regulation that O-GlcNAcylation exerts on AKT-mediated control of a myriad of downstream substrates, such as matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9 (49) (Figure 2). However, other studies report contradictory results regarding the effect of O-GlcNAcylation on the activation of AKT signaling pathway (26, 50). OGA overexpression reduces AKT O-GlcNAcylation and promotes its activation, albeit in a PI3K-independent manner, both in HepG2 cells and in liver of euglycemic mice (50). Our group also demonstrated that OGT silencing prevents AKT Ser473 phosphorylation in HepG2 (16) and MCF-7 (33) cell lines. More recently, this effect has also been described in cholangiocarcinoma cell lines (51). Furthermore, AKT O-GlcNAcylation at Thr305 and Thr312 reduces MCF-7 cell proliferation and migration *via* inhibition of AKT phosphorylation at Thr308 and disruption of its interaction with PDK1 (26).

Finally, it was shown that O-GlcNAcylation regulates the mitogenic mTOR signaling pathway through targeting the mTOR inhibitor AMPK (35, 52, 53). Increased O-GlcNAcylation in colon cancer cells, either by OGT overexpression or OGA inhibition, reduces phosphorylation of AMPK at Thr172, activates mTOR and induces cell growth *in vitro* in LoVo cell line and *in vivo* in LoVo cell-derived tumors of BALB/c-nu/nu mice (52). We have confirmed that O-GlcNAcylation activates mTOR in HCT116 colon cancer cell line but not in CCD841CoN normal cells (35). Reciprocally, OGT silencing or inhibition increases phosphorylation of AMPK, decreases phosphorylation of mTOR downstream effectors 4E-BP1 and p70S6K, decreases *HIF-1 α* , *GLUT1*, and *LDHA* expression and impairs glucose uptake and growth in breast cancer cell lines (53) (Figure 2).

Together, these studies establish the involvement of O-GlcNAcylation in cancer biology (increased glycolysis, proliferation, growth, and invasion) through direct activation of the PI3K/AKT/mTOR axis. One may consider this post-translational modification as a key node between metabolism and cell signaling. However, intricate ties linking metabolism and cancer are not completely elucidated and need further investigations. In parallel, anti-cancer inhibitors targeting mTOR axis are currently in clinical development and must be encouraged (54). Tumor cells resistant to GDC-0941, a PI3K inhibitor, exhibit an increased activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and OGT expression in comparison to GDC-0941-sensitive cells. Interestingly, OGT silencing sensitizes these cells to GDC-0941 (55). In this sense, targeting OGT in cancer cells and/or adapting patients to low caloric diet could increase the efficiency of anti-PI3K/AKT/mTOR therapeutic strategies and foil drug resistance.

Type 2 Diabetes

Insulin resistance, a hallmark of type 2 diabetes (T2D), refers to impaired insulin sensitivity and glucose uptake of target tissues (liver, skeletal muscle, and adipose tissue). PI3K/AKT signaling pathway plays a key role in the regulation of glucose homeostasis by inhibiting gluconeogenesis and activating glycolysis *via* the inhibition of FoxO1 and GSK3 β respectively



(9) (Figure 2). Some studies have also established a link between dysregulation of O-GlcNAcylation cycling and insulin resistance.

Interestingly, single nucleotide polymorphisms (SNPs) on *OGA* (also called *MGEA5* for *meningioma expressed antigen 5*) gene and *GFPT2* (for *GFAT isomerizing 2*) gene, coding the glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) rate-limiting enzyme controlling the production of UDP-GlcNAc, are associated with increased T2D risk in American-Mexican and Caucasian populations, respectively (56, 57). These mutations may lead to reduced *OGA* expression and increased *GFPT2* expression respectively (56, 57), and an up-regulation of cellular O-GlcNAcylation levels. O-GlcNAcylation levels are

significantly increased in skeletal muscle, liver, heart, colon-rectum, erythrocytes, and leukocytes of diabetic animals and humans (35, 58–62). Consistent with these epidemiologic data, *db/db* mice overexpressing *Oga* showed improved hepatic insulin sensitivity (63), whereas *Ogt* overexpression and subsequent elevation of global O-GlcNAcylation level inhibits insulin signaling pathway, both *in vitro* in 3T3-L1 adipocyte and Fao hepatic cell lines, and *in vivo* in skeletal muscle and adipose tissue in mice (15, 64, 65). Skeletal muscle-specific *Ogt* knockout mice have increased glucose uptake, insulin signaling and whole-body insulin sensitivity (62). Likewise, inhibition of *OGA* with O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc) induces insulin resistance in

3T3-L1 and rat primary adipocytes by perturbing both insulin-signaling pathway and glucose absorption (17, 21). Indeed, blockade of OGA increases O-GlcNAcylation of IRS-1 and AKT while decreasing their phosphorylation (17, 21). Consequently, a reduction of insulin-stimulated PI3K/IRS-1 interaction, GSK3 β phosphorylation (15, 17, 64) and GLUT4 translocation to the plasma membrane is observed (17, 21). This reduced translocation of GLUT4 might be related to the decrease in AKT phosphorylation since phosphorylation of AKT substrate of 160 kDa (AS160) is required for insulin-stimulated translocation of GLUT4 to the plasma membrane (66). Reciprocally, in euglycemic HepG2 and mice hepatic cells, the reduced global O-GlcNAcylation levels induced by OGA overexpression is associated with an increase of AKT activation but not of PI3K (50). This results in inhibition by phosphorylation of GSK3 β (Ser9) and FoxO1 (Ser166), leading to a decrease of gluconeogenic genes transcription, including *glucose-6-phosphatase (G6Pase)* and *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)* (50). In addition, glycogen synthase (GS), substrate of GSK3 β , is also O-GlcNAc-modified in 3T3-L1 cells and this modification blocks its activation, which is associated with insulin resistance (67). These data clearly establish the impact of O-GlcNAcylation in the etiology of insulin resistance and, thus, potentially in metabolic related diseases such as diabetes.

However, there are studies showing that OGA inhibition does not cause insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes, rat liver and muscle (68, 69), while others show that OGA inhibition induces insulin resistance in rat skeletal muscle in an AKT and GSK3 β -independent manner (70). In these studies, authors suggest that conflicting primary results might result from the use of the non-selective OGA inhibitor PUGNAc which has been shown to also inhibit lysosomal hexosaminidases and alter plasma membrane oligosaccharide structures that are critical in signal transduction (71, 72). These contradictory findings could also be due to supraphysiological concentrations of insulin (12 nmol/L) used for stimulation (70). These findings raise the question of whether high O-GlcNAcylation levels are responsible for insulin resistance and show to what extent the understanding of the role of O-GlcNAcylation in cell signaling regulation in such multifactorial disease needs to be deepened.

In addition to its role in insulin resistance, O-GlcNAcylation could also take part in pancreatic islet β cell dysfunction. Pancreatic β cells are the cells in the body in charge of producing, storing and releasing insulin upon increased blood glucose concentration; its dysregulation is a cause of diabetes. OGT and global O-GlcNAcylation levels are increased in pancreatic islets of Goto-Kakizaki diabetic rats (73). In murine pancreatic β cells, glucosamine-mediated hyperglycemia increases O-GlcNAcylation of AKT and concomitantly reduces its Ser473 phosphorylation (27). Glucosamine induces β cells apoptosis likely through O-GlcNAc-mediated inhibition of AKT (27) (Figure 2). In contrast, β cell-specific *Ogt* knockout mice develop β cell failure and diabetes. In this model, a reduction of AKT phosphorylation at Ser473 was observed (74). These data suggest that the phospho/O-GlcNAc interplay on AKT may play a pivotal role as a regulator of downstream signaling cascades in response to nutrient conditions. The impact of

O-GlcNAcylation dysregulation may be tissue-specific (75). In conclusion, increased O-GlcNAcylation in diabetes toward PI3K/AKT-mediated insulin resistance in target tissues could contribute to the maintenance of the pathology.

Cardiovascular Diseases

Many studies suggest that elevated protein O-GlcNAcylation levels contribute to cardiovascular complications (76). Chronic hyperglycemia is a risk factor for cardiovascular diseases and patients with diabetes may develop atherosclerotic carotid plaques with a marked increase of O-GlcNAcylation levels (23). Aorta from streptozotocin-induced hyperglycemic mice exhibits high levels of O-GlcNAcylation and impaired vascular sprouting (77). Endothelial dysfunction is a feature of cardiovascular diseases that is characterized by reduced bioavailability of nitric oxide (NO) produced by endothelial nitric oxide synthase (eNOS). Endothelial production of NO plays indeed a key role in preventing vascular diseases by preventing thrombosis, inflammation, vascular tone, and remodeling (78). O-GlcNAc modification is known to modulate NO production in endothelial cells, promoting macro- and microvascular complications. In response to insulin, AKT induces vasodilatation in primary human aortic endothelial cells (HAEC), and it may exert anti-atherogenic effects by increasing activating phosphorylation of eNOS at Ser615 and Ser1177 (79) (Figure 2). Federici and collaborators showed that hyperglycemia or HBP activation decreases eNOS activity through a reduction of AKT and eNOS phosphorylation in human coronary artery endothelial cells (HCAEC) (23). *In vitro*, glucosamine-induced protein O-GlcNAcylation also modulates the angiogenic properties of EA.hy926 endothelial cells, most probably by a concomitant increase of AKT O-GlcNAcylation that leads to inhibition of its pro-angiogenic activity (77). AKT could directly up-regulate the production of the pro-angiogenic factor NO (80). In addition, PI3K/AKT/mTOR signaling pathway stimulates angiogenesis by increasing expression of *HIF-1 α* and its target, the *vascular endothelial growth factor (VEGF)* (80) (Figure 2). Elevated O-GlcNAcylation levels also induce vascular calcification *in vitro* in murine cells, and *in vivo* in aortic arc and descending aorta of diabetic mice. It has been shown, in primary mouse vascular smooth muscle cells (VSMC), that this process results from increased Thr430/Thr479-AKT O-GlcNAcylation, which promotes its activation and the expression of *osteogenic runt-related transcription factor 2 (Runx2)* (81). AKT-mediated Runx2 stabilization by degradation of E3 ubiquitin ligase SMURF2 or by the nuclear exclusion of its transcription regulators FoxO could take part in this mechanism (82) (Figure 2). Thus, angiogenesis impairment and vessel obstruction are among the biological effects related to aberrant O-GlcNAcylation of AKT-mediated signaling involved in cardiovascular complications associated with diabetes.

Neurodegenerative Diseases

Dysregulated O-GlcNAcylation has been implicated in the pathogenesis of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's disease (83). Neurofibrillary degeneration associated with aggregation of abnormal

hyperphosphorylated tubulin-associated unit (Tau) proteins is one of the features of AD. The latter undergoes a “Ying-Yang” competition mechanism between O-GlcNAcylation and phosphorylation (83). Using thiamet-G, a blood-brain barrier-permeable OGA inhibitor, several *in vivo* studies evidenced the ability of O-GlcNAcylation to protect against Tau aggregation (84–86). Increased levels of O-GlcNAcylation in mice brain by intracerebroventricular injection of thiamet-G is associated with Tau site-dependent increased and decreased phosphorylation further confirming the complex relation between modifications on Tau protein (87). Elevated phosphorylation of Tau at Ser199, Ser202, Ser396, and Ser422 is likely to result from the combination of increased Tau O-GlcNAcylation, PI3K-independent inhibition of Ser473-AKT phosphorylation and the subsequent over-activation of GSK3 β , a key Tau kinase (87) (Figure 2). Elevated O-GlcNAcylation of proteins is found in Parkinson’s disease postmortem brains (88). In rat primary cortical neurons, thiamet-G treatment increases accumulation of α -synuclein, a neuronal protein that aggregates in this pathology, through activation of mTOR and reduction of autophagy (88) (Figure 2). Conversely, α -synuclein is O-GlcNAcylated at Thr72 and Ser87, leading to reduced aggregation *in vitro* (89, 90). But, these discrepancies could be due to different experimental approaches. Evidence that excessive O-GlcNAcylation is detrimental to neurons by increasing α -synuclein accumulation was demonstrated *in vitro* and related to mTOR pathway (88), while O-GlcNAc-reduced aggregation of α -synuclein was demonstrated by biochemical approaches (89, 90). Taken together, these results indicate that the mitigation of pathological aggregation of neuronal proteins by direct O-GlcNAc modification is a complex mechanism that could be indirectly counterbalanced by AKT/mTOR signaling pathway.

Another common pathological hallmark of neurodegenerative diseases is the loss of neurons as a consequence of neuronal cell death (91). Although not yet studied in such pathological conditions, indirect evidence suggests that O-GlcNAcylation could be involved in the regulation of neuronal apoptosis. Elevation of protein O-GlcNAcylation after cerebral ischemia is responsible for O-GlcNAc-mediated AKT inhibition, BAD activation and neuronal apoptosis in mice (25). An increase of O-GlcNAcylation levels is also associated with a default in Thr308-AKT phosphorylation and cellular apoptosis during cortical differentiation of human embryonic stem cells (hESC) (92) (Figure 2). These studies strongly support that O-GlcNAc-mediated AKT inhibition might be involved in neuronal cell loss of function and apoptosis in neurodegenerative diseases.

CONCLUSION

Highlighted by the studies discussed above O-GlcNAcylation and the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway appear to be intimately cross-linked. Both are considered as metabolic sensor that regulate folding, stability, subcellular localization, partner interaction, and therefore the activity of a plethora of targets

involved in key biological functions. Here, we summarized evidence that O-GlcNAcylation can modulate the activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by targeting different signaling actors, and that, reciprocally; expression, localization and activation of OGT are regulated by these signaling pathways (Figure 1). Although, further works are required to clarify the roles of O-GlcNAcylation on PI3K/AKT/mTOR regulation under normal physiological context, their interplay is highlighted by their associated dysregulation in several types of cancer, T2D, and cardiovascular and neurodegenerative diseases (Figure 2). Under pathological glucose conditions, aberrant O-GlcNAcylation levels result in activation or inhibition PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as found in cancer and diabetes, respectively. Because of the key role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in cellular metabolism and physiology, these regulatory mechanisms contribute to pathogenicity by promoting, on one hand, glycolysis, proliferation, growth and invasion of cancer cells, and on the other hand, insulin resistance in insulin target tissues and/or pancreatic β cell dysfunction and death. Moreover, O-GlcNAc-mediated disturbance of AKT activity in endothelial cells leads to impairment of angiogenesis and vessel obstruction, supporting cardiovascular diseases associated with T2D. Finally, O-GlcNAcylation regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway can indirectly modulate aggregation of neuronal proteins, such as Tau and α -synuclein that are involved in AD and Parkinson’s disease, respectively, as well as in neuronal cell death. Taken together, evidence presented here shows that targeting OGT or OGA with selective small molecules to inhibit their activity or their interaction with specific actors of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, in association with an adapted diet, may be a promising combined therapeutic approach to treat chronic metabolic-related diseases.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

NV and IE conceived the plan and wrote the review. A-SV-E, TL, and SH revised it critically for important intellectual content.

FUNDING

Site de Recherche Intégré sur le Cancer (SIRIC) ONCOLille and FR 3688 FRABio.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Mrs. Isabel Gonzales Mariscal (IBIMA—Hospital Regional de Malaga, Spain), a fluent English speaker, for the final reading of our manuscript. This work was supported by the Ligue Contre le Cancer/Comité du Nord, the Fondation ARC (Association pour la Recherche sur le Cancer), the Région Hauts de France (Cancer Regional Program), the University of Lille and the Centre National de la Recherche Scientifique. N.V. is the recipient of a fellowship from the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

- Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem.* (1997) 272:9308–15.
- Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, Trauger SA, et al. Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J Biol Chem.* (2009) 284:547–55. doi: 10.1074/jbc.M808518200
- Mishra S, Ande SR, Salter NW. O-GlcNAc modification: why so intimately associated with phosphorylation? *Cell Commun Signal* (2011) 9:1. doi: 10.1186/1478-811X-9-1
- Wang Z, Gucek M, Hart GW. Cross-talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2008) 105:13793–8. doi: 10.1073/pnas.0806216105
- Jóźwiak P, Forma E, Bryś M, Krześlak A. O-GlcNAcylation and Metabolic reprogramming in Cancer. *Front Endocrinol.* (2014) 5:145. doi: 10.3389/fendo.2014.00145
- Das A, Reis F, Maejima Y, Cai Z, Ren J. mTOR signaling in cardiometabolic disease, cancer, and aging. *Oxid Med Cell Longev.* (2017) 2017:6018675. doi: 10.1155/2017/6018675
- Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. *Cell* (2017) 168:960–76. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004
- Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K pathway in human disease. *Cell* (2017) 170:605–35. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.029
- Manning BD, Toker A. AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell* (2017) 169:381–405. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.001
- Dibble CC, Manning BD. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat Cell Biol.* (2013) 15:555–64. doi: 10.1038/ncb2763
- Antikainen H, Driscoll M, Haspel G, Dobrowolski R. TOR-mediated regulation of metabolism in aging. *Aging Cell* (2017) 16:1219–33. doi: 10.1111/acel.12689
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem.* (2011) 80:825–58. doi: 10.1146/annurev-biochem-060608-102511
- 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) 267:9005–13.
- Whelan SA, Lane MD, Hart GW. Regulation of the O-Linked β -N-Acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *J Biol Chem.* (2008) 283:21411–7. doi: 10.1074/jbc.M800677200
- Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, et al. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature* (2008) 451:964–9. doi: 10.1038/nature06668
- Perez-Cervera Y, Dehennaut V, Gil MA, Guedri K, Mata CJS, Stichelen SO-V, et al. Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *FASEB J.* (2013) 27:3478–86. doi: 10.1096/fj.12-217984
- Whelan SA, Dias WB, Thiruneelakantapillai L, Lane MD, Hart GW. Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked β -N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* (2010) 285:5204–11. doi: 10.1074/jbc.M109.077818
- 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) 289:10592–606. doi: 10.1074/jbc.M113.523068
- Xu Q, Yang C, Du Y, Chen Y, Liu H, Deng M, et al. AMPK regulates histone H2B O-GlcNAcylation. *Nucleic Acids Res.* (2014) 42:5594–604. doi: 10.1093/nar/gku236
- Patti ME, Virkamäki A, Landaker EJ, Kahn CR, Yki-Järvinen H. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine *in vivo* induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes* (1999) 48:1562–71.
- Park SY, Ryu J, Lee W. O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Exp Mol Med.* (2005) 37:220–9. doi: 10.1038/emmm.2005.30
- Klein AL, Berkaw MN, Buse MG, Ball LE. O-linked N-acetylglucosamine modification of insulin receptor substrate-1 occurs in close proximity to multiple SH2 domain binding motifs. *Mol Cell Proteomics* (2009) 8:2733–45. doi: 10.1074/mcp.M900207-MCP200
- Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, et al. Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation* (2002) 106:466–72. doi: 10.1161/01.CIR.0000023043.02648.51
- Ball LE, Berkaw MN, Buse MG. Identification of the major site of O-linked β -N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. *Mol Cell Proteomics* (2006) 5:313–23. doi: 10.1074/mcp.M500314-MCP200
- Shi J, Gu J, Dai C, Gu J, Jin X, Sun J, et al. O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling. *Sci Rep.* (2015) 5:14500. doi: 10.1038/srep14500
- Wang S, Huang X, Sun D, Xin X, Pan Q, Peng S, et al. Extensive Crosstalk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Akt Signaling. *PLoS ONE* (2012) 7:e0037427 doi: 10.1371/journal.pone.0037427
- Kang E-S, Han D, Park J, Kwak TK, Oh M-A, Lee S-A, et al. O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic beta cells. *Exp Cell Res.* (2008) 314:2238–48. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.04.014
- Miller WP, Mihailescu ML, Yang C, Barber AJ, Kimball SR, Jefferson LS, et al. The translational repressor 4E-BP1 contributes to diabetes-induced visual dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2016) 57:1327–37. doi: 10.1167/iovs.15-18719
- Zeidan Q, Wang Z, De Maio A, Hart GW. O-GlcNAc cycling enzymes associate with the translational machinery and modify core ribosomal proteins. *Mol Biol Cell* (2010) 21:1922–36. doi: 10.1091/mbc.E09-11-0941
- Wilcox G. Insulin and insulin resistance. *Clin Biochem Rev.* (2005) 26:19–39.
- Ferrer CM, Sodi VL, Reginato MJ. O-GlcNAcylation in cancer biology: linking metabolism and signaling. *J Mol Biol.* (2016) 428:3282–94. doi: 10.1016/j.jmb.2016.05.028
- Courtney R, Ngo DC, Malik N, Ververis K, Tortorella SM, Karagiannis TC. Cancer metabolism and the Warburg effect: the role of HIF-1 and PI3K. *Mol Biol Rep.* (2015) 42:841–51. doi: 10.1007/s11033-015-3858-x
- 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* (2012) 1:e36. doi: 10.1038/oncsis.2012.36
- Park S, Pak J, Jang I, Cho J. Inhibition of mTOR affects protein stability of OGT. *Biochem Biophys Res Commun.* (2014) 453:208–12. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.047
- 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
- Sodi VL, Khaku S, Krutilina R, Schwab LP, Vocadlo DJ, Seagroves TN, et al. mTOR/MYC Axis Regulates O-GlcNAc Transferase (OGT) expression and O-GlcNAcylation in breast Cancer. *Mol Cancer Res.* (2015) 13:923–33. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0536
- Zhang X, Qiao Y, Wu Q, Chen Y, Zou S, Liu X, et al. The essential role of YAP O-GlcNAcylation in high-glucose-stimulated liver tumorigenesis. *Nat Commun.* (2017) 8:15280. doi: 10.1038/ncomms15280
- Xia H, Dai X, Yu H, Zhou S, Fan Z, Wei G, et al. EGFR-PI3K-PDK1 pathway regulates YAP signaling in hepatocellular carcinoma: the mechanism and its implications in targeted therapy. *Cell Death Dis.* (2018) 9:269. doi: 10.1038/s41419-018-0302-x
- Zhao Y, Montminy T, Azad T, Lightbody E, Hao Y, SenGupta S, et al. PI3K positively regulates YAP and TAZ in mammary tumorigenesis through multiple signaling pathways. *Mol Cancer Res.* (2018) 16:1046–58. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-17-0593

40. Tumaneng K, Schlegelmilch K, Russell RC, Yimlamai D, Basnet H, Mahadevan N, et al. YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K-TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nat Cell Biol.* (2012) 14:1322–9. doi: 10.1038/ncb2615
41. Zhang B, Zhou P, Li X, Shi Q, Li D, Ju X. Bitterness in sugar: O-GlcNAcylation aggravates pre-B acute lymphocytic leukemia through glycolysis via the PI3K/Akt/c-Myc pathway. *Am J Cancer Res.* (2017) 7:1337–49.
42. Onodera Y, Nam J-M, Bissell MJ. Increased sugar uptake promotes oncogenesis via EPAC/RAP1 and O-GlcNAc pathways. *J Clin Invest.* (2014) 124:367–84. doi: 10.1172/JCI63146
43. Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ. Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* (1998) 12:3499–511.
44. Kanwal S, Fardini Y, Pagesy P, N'tumba-Byn T, Pierre-Eugène C, Masson E, et al. O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor α expression and confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PLoS ONE* (2013) 8:e69150. doi: 10.1371/journal.pone.0069150
45. Krzeslak A, Józwiak P, Lipinska A. Down-regulation of β -N-acetyl-D-glucosaminidase increases Akt1 activity in thyroid anaplastic cancer cells. *Oncol Rep.* (2011) 26:743–9. doi: 10.3892/or.2011.1333
46. Jones DR, Keune W-J, Anderson KE, Stephens LR, Hawkins PT, Divecha N. The hexosamine biosynthesis pathway and O-GlcNAcylation maintain insulin-stimulated PI3K-PKB phosphorylation and tumour cell growth after short-term glucose deprivation. *FEBS J.* (2014) 281:3591–608. doi: 10.1111/febs.12879
47. Zhang N, Chen X. Potential role of O-GlcNAcylation and involvement of PI3K/Akt1 pathway in the expression of oncogenic phenotypes of gastric cancer cells *in vitro*. *Biotechnol Appl Biochem.* (2016) 63:841–51. doi: 10.1002/bab.1441
48. Zhang P, Wang C, Ma T, You S. O-GlcNAcylation enhances the invasion of thyroid anaplastic cancer cells partially by PI3K/Akt1 pathway. *Oncol Targets Ther.* (2015) 8:3305–13. doi: 10.2147/OTT.S82845
49. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* (2007) 129:1261–74. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009
50. Soesanto YA, Luo B, Jones D, Taylor R, Gabrielsen JS, Parker et al. Regulation of Akt signaling by O-GlcNAc in euglycemia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2008) 295:E974–980. doi: 10.1152/ajpendo.90366.2008
51. Phoomak C, Silsirivanit A, Park D, Sawanyawisuth K, Vaeteewoottacharn K, Wongkham C, et al. O-GlcNAcylation mediates metastasis of cholangiocarcinoma through FOXO3 and MAN1A1. *Oncogene* (2018). doi: 10.1038/s41388-018-0366-1. [Epub ahead of print].
52. Ishimura E, Nakagawa T, Moriwaki K, Hirano S, Matsumori Y, Asahi M. Augmented O-GlcNAcylation of AMP-activated kinase promotes the proliferation of LoVo cells, a colon cancer cell line. *Cancer Sci.* (2017) 108:2373–82. doi: 10.1111/cas.13412
53. Ferrer CM, Lynch TP, Sodi VL, Falcone JN, Schwab LP, Peacock DL, et al. O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Mol Cell* (2014) 54:820–31. doi: 10.1016/j.molcel.2014.04.026
54. Dienstmann R, Rodon J, Serra V, Tabernero J. Picking the point of inhibition: a comparative review of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Mol Cancer Ther.* (2014) 13:1021–31. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0639
55. Kwei KA, Baker JB, Pelham RJ. Modulators of sensitivity and resistance to inhibition of PI3K identified in a pharmacogenomic screen of the NCI-60 human tumor cell line collection. *PLoS ONE* (2012) 7:e46518. doi: 10.1371/journal.pone.0046518
56. Lehman DM, Fu D-J, Freeman AB, Hunt KJ, Leach RJ, Johnson-Pais T, et al. A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes* (2005) 54:1214–21. doi: 10.2337/diabetes.54.4.1214
57. Zhang H, Jia Y, Cooper JJ, Hale T, Zhang Z, Elbein SC. Common variants in glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFPT2) gene are associated with type 2 diabetes, diabetic nephropathy, and increased GFPT2 mRNA levels. *J Clin Endocrinol Metab.* (2004) 89:748–55. doi: 10.1210/jc.2003-031286
58. Fricovsky ES, Suarez J, Ihm S-H, Scott BT, Suarez-Ramirez JA, Banerjee I, et al. Excess protein O-GlcNAcylation and the progression of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* (2012) 303:R689–99. doi: 10.1152/ajpregu.00548.2011
59. Springhorn C, Matsha TE, Erasmus RT, Essop MF. Exploring leukocyte O-GlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* (2012) 97:4640–9. doi: 10.1210/jc.2012-2229
60. Park K, Saudek CD, Hart GW. Increased expression of β -N-acetylglucosaminidase in erythrocytes from individuals with pre-diabetes and diabetes. *Diabetes* (2010) 59:1845–50. doi: 10.2337/db09-1086
61. 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 α stability. *Cell Metab.* (2012) 16:226–37. doi: 10.1016/j.cmet.2012.07.006
62. 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) 11:160–77. doi: 10.1016/j.molmet.2018.02.010
63. Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates J, Montminy M. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CR2C2. *Science* (2008) 319:1402–5. doi: 10.1126/science.1151363
64. Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2002) 99:5313–8. doi: 10.1073/pnas.072072399
65. McClain DA, Lubas WA, Cooksey RC, Hazel M, Parker GJ, Love DC, et al. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2002) 99:10695–9. doi: 10.1073/pnas.152346899
66. Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, et al. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* (2003) 278:14599–602. doi: 10.1074/jbc.C300063200
67. Parker GJ, Lund KC, Taylor RP, McClain DA. Insulin resistance of glycogen synthase mediated by o-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem.* (2003) 278:10022–7. doi: 10.1074/jbc.M207787200
68. Macauley MS, Bubb AK, Martinez-Fleites C, Davies GJ, Vocadlo DJ. Elevation of global O-GlcNAc levels in 3T3-L1 adipocytes by selective inhibition of O-GlcNAcase does not induce insulin resistance. *J Biol Chem.* (2008) 283:34687–95. doi: 10.1074/jbc.M804525200
69. Macauley MS, Shan X, Yuzwa SA, Gloster TM, Vocadlo DJ. Elevation of global O-GlcNAc in rodents using a selective O-GlcNAcase inhibitor does not cause insulin resistance or perturb glucohomeostasis. *Chem Biol.* (2010) 17:949–58. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.07.005
70. Arias EB, Kim J, Cartee GD. Prolonged incubation in PUGNAC results in increased protein O-linked glycosylation and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes* (2004) 53:921–30. doi: 10.2337/diabetes.53.4.921
71. Mehdy A, Morelle W, Rosnoble C, Legrand D, Lefebvre T, Duvet S, et al. PUGNAC treatment leads to an unusual accumulation of free oligosaccharides in CHO cells. *J Biochem.* (2012) 151:439–46. doi: 10.1093/jb/mvs012
72. Dehennaut V, Lefebvre T. Proteomics and PUGNACity will overcome questioning of insulin resistance induction by nonselective inhibition of O-GlcNAcase. *Proteomics* (2013) 13:2944–6. doi: 10.1002/pmic.201300363
73. Akimoto Y, Hart GW, Wells L, Vosseller K, Yamamoto K, Munetomo E, et al. Elevation of the post-translational modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Glycobiology* (2007) 17:127–40. doi: 10.1093/glycob/cwl067
74. Alejandro EU, Bozadjieva N, Kumusoglu D, Abdulhamid S, Levine H, Haataja L, et al. Disruption of O-linked N-acetylglucosamine signaling induces ER stress and β -cell failure. *Cell Rep.* (2015) 13:2527–38. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.020
75. Vaidyanathan K, Wells L. Multiple tissue-specific roles for the O-GlcNAc post-translational modification in the induction of and complications arising from type II diabetes. *J Biol Chem.* (2014) 289:34466–71. doi: 10.1074/jbc.R114.591560
76. Ma J, Hart GW. Protein O-GlcNAcylation in diabetes and diabetic complications. *Expert Rev Proteomics* (2013) 10:365–80. doi: 10.1586/14789450.2013.820536

77. Luo B, Soesanto Y, McClain DA. Protein modification by O-linked GlcNAc reduces angiogenesis by inhibiting Akt activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2008) 28:651–7. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.159533
78. Zoccali C. Endothelial dysfunction, nitric oxide bioavailability, and asymmetric dimethyl arginine. In: *Cardiorenal Syndrome: Mechanisms, Risk and Treatment*. Berbari AE, Mancia G, editors. Milano: Springer Milan (2010). p. 235–244. doi: 10.1007/978-88-470-1463-3_17
79. Ritchie SA, Kohlhaas CF, Boyd AR, Yalla KC, Walsh K, Connell JMC, et al. Insulin-stimulated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine-615 contributes to nitric oxide synthesis. *Biochem J.* (2010) 426:85–90. doi: 10.1042/BJ20091580
80. Karar J, Maity A. PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* (2011) 4:51 doi: 10.3389/fnmol.2011.00051
81. Heath JM, Sun Y, Yuan K, Bradley WE, Litovsky S, Dell'Italia LJ, et al. Activation of AKT by O-GlcNAcylation induces vascular calcification in diabetes. *Circ Res.* (2014) 114:1094–102. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302968
82. Cohen-Solal KA, Boregowda RK, Lasfar A. RUNX2 and the PI3K/AKT axis reciprocal activation as a driving force for tumor progression. *Mol Cancer* (2015) 14:137. doi: 10.1186/s12943-015-0404-3
83. Ma X, Li H, He Y, Hao J. The emerging link between O-GlcNAcylation and neurological disorders. *Cell Mol Life Sci.* (2017) 74:3667–86. doi: 10.1007/s00018-017-2542-9
84. Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, et al. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau *in vivo*. *Nat Chem Biol.* (2008) 4:483–90. doi: 10.1038/nchembio.96
85. Yuzwa SA, Shan X, Macauley MS, Clark T, Skorobogatko Y, Vosseller K, et al. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nat Chem Biol.* (2012) 8:393–9. doi: 10.1038/nchembio.797
86. Borghgraef P, Menuet C, Theunis C, Louis JV, Devijver H, Maurin H, et al. Increasing brain protein O-GlcNAcylation mitigates breathing defects and mortality of Tau.P301L mice. *PLoS ONE* (2013) 8:e0084442. doi: 10.1371/journal.pone.0084442
87. Yu Y, Zhang L, Li X, Run X, Liang Z, Li Y, et al. Differential effects of an O-GlcNAcase inhibitor on tau phosphorylation. *PLoS ONE* (2012) 7:e0035277. doi: 10.1371/journal.pone.0035277
88. Wani WY, Ouyang X, Benavides GA, Redmann M, Cofield SS, Shacka JJ, et al. O-GlcNAc regulation of autophagy and α -synuclein homeostasis; implications for Parkinson's disease. *Mol Brain* (2017) 10:32. doi: 10.1186/s13041-017-0311-1
89. Marotta NP, Lin YH, Lewis YE, Ambroso MR, Zaro BW, Roth MT, et al. O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the Parkinson's disease associated protein α -synuclein. *Nat Chem.* (2015) 7:913–20. doi: 10.1038/nchem.2361
90. Zhang J, Lei H, Chen Y, Ma Y-T, Jiang F, Tan J, et al. Enzymatic O-GlcNAcylation of α -synuclein reduces aggregation and increases SDS-resistant soluble oligomers. *Neurosci Lett.* (2017) 655:90–4. doi: 10.1016/j.neulet.2017.06.034
91. Gorman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *J Cell Mol Med.* (2008) 12:2263–80. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00402.x
92. Parween S, Varghese DS, Ardah MT, Prbakaran AD, Mensah-Brown E, Emerald BS, et al. Higher O-GlcNAc levels are associated with defects in progenitor proliferation and premature neuronal differentiation during *in-vitro* human embryonic cortical neurogenesis. *Front Cell Neurosci.* (2017) 11:e00415. doi: 10.3389/fncel.2017.00415

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 © 2018 Very, Vercoutter-Edouart, Lefebvre, Hardivillé and El Yazidi-Belkoura. 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.

V. BIBLIOGRAPHIE

- Abdel Mohsen, A.-W., Aull, J.L., Payne, D.M. and Daron, H.H. 1995. Ligand-Induced Conformational Changes of Thymidylate Synthase Detected by Limited Proteolysis. *Biochemistry*. **34**(5), pp.1669–1677.
- Absenger, G., Benhaim, L., Szkandera, J., Zhang, W., Yang, D., Labonte, M.J., Pichler, M., Stotz, M., Samonigg, H., Renner, W., Gerger, A. and Lenz, H.-J. 2014. The cyclin D1 (CCND1) rs9344 G>A polymorphism predicts clinical outcome in colon cancer patients treated with adjuvant 5-FU-based chemotherapy. *The Pharmacogenomics Journal*. **14**(2), pp.130–134.
- Acquaviva, C., Brockly, F., Ferrara, P., Bossis, G., Salvat, C., Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. 2001. Identification of a C-terminal tripeptide motif involved in the control of rapid proteasomal degradation of c-Fos proto-oncoprotein during the G(0)-to-S phase transition. *Oncogene*. **20**(51), pp.7563–7572.
- Adam, K. and Hunter, T. 2018. Histidine kinases and the missing phosphoproteome from prokaryotes to eukaryotes. *Laboratory Investigation*. **98**(2), pp.233–247.
- Adams, G.E., Chandru, A. and Cowley, S.M. 2018. Co-repressor, co-activator and general transcription factor: the many faces of the Sin3 histone deacetylase (HDAC) complex. *Biochemical Journal*. **475**(24), pp.3921–3932.
- Ahmed, I. a. M., Kelly, S.B., Anderson, J.J., Angus, B., Challen, C. and Lunec, J. 2008. The predictive value of p53 and p33(ING1b) in patients with Dukes' C colorectal cancer. *Colorectal Disease: The Official Journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. **10**(4), pp.344–351.
- Akasaka, T., Tsujii, M., Kondo, J., Hayashi, Y., Ying, J., Lu, Y., Kato, M., Yamada, T., Yamamoto, S., Inoue, Takuya, Tsujii, Y., Maekawa, A., Fujinaga, T., Shiraiishi, E., Hiyama, S., Inoue, Takahiro, Shinzaki, S., Watabe, K., Nishida, T., Iijima, H. and Takehara, T. 2015. 5-FU resistance abrogates the amplified cytotoxic effects induced by inhibiting checkpoint kinase 1 in p53-mutated colon cancer cells. *International Journal of Oncology*. **46**(1), pp.63–70.
- Akimoto, Y., Hart, G.W., Wells, L., Vosseller, K., Yamamoto, K., Munetomo, E., Ohara-Imaizumi, M., Nishiwaki, C., Nagamatsu, S., Hirano, H. and Kawakami, H. 2007. Elevation of the post-translational modification of proteins by O-linked N-acetylglucosamine leads to deterioration of the glucose-stimulated insulin secretion in the pancreas of diabetic Goto-Kakizaki rats. *Glycobiology*. **17**(2), pp.127–140.
- Akimov, V., Barrio-Hernandez, I., Hansen, S.V.F., Hallenborg, P., Pedersen, A.-K., Bekker-Jensen, D.B., Puglia, M., Christensen, S.D.K., Vanselow, J.T., Nielsen, M.M., Kratchmarova, I., Kelstrup, C.D., Olsen, J.V. and Blagoev, B. 2018. UbiSite approach for comprehensive mapping of lysine and N-terminal ubiquitination sites. *Nature Structural & Molecular Biology*. **25**(7), pp.631–640.
- Akpinar, B., Bracht, E.V., Reijnders, D., Safarikova, B., Jelinkova, I., Grandien, A., Vaculova, A.H., Zhivotovsky, B. and Olsson, M. 2015. 5-Fluorouracil-induced RNA stress engages a TRAIL-DISC-dependent apoptosis axis facilitated by p53. *Oncotarget*. **6**(41), pp.43679–43697.
- Alexander, G.E., Chen, K., Pietrini, P., Rapoport, S.I. and Reiman, E.M. 2002. Longitudinal PET Evaluation of Cerebral Metabolic Decline in Dementia: A Potential Outcome Measure in Alzheimer's Disease Treatment Studies. *The American Journal of Psychiatry*. **159**(5), pp.738–745.
- Alfaro, J.F., Gong, C.-X., Monroe, M.E., Aldrich, J.T., Clauss, T.R.W., Purvine, S.O., Wang, Z., Camp, D.G., Shabanowitz, J., Stanley, P., Hart, G.W., Hunt, D.F., Yang, F. and Smith, R.D. 2012. Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**(19), pp.7280–7285.
- Allison, D.F., Wamsley, J.J., Kumar, M., Li, D., Gray, L.G., Hart, G.W., Jones, D.R. and Mayo, M.W. 2012. Modification of RelA by O-linked N-acetylglucosamine links glucose metabolism to NF- κ B acetylation and transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**(42), pp.16888–16893.
- Almog, R., Waddling, C.A., Maley, F., Maley, G.F. and Van Roey, P. 2001. Crystal structure of a deletion mutant of human thymidylate synthase Δ (7–29) and its ternary complex with Tomudex and dUMP. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. **10**(5), pp.988–996.
- Alonso, J., Schimpl, M. and Aalten, D.M.F. van 2014. O-GlcNAcase: Promiscuous Hexosaminidase or Key Regulator of O-GlcNAc Signaling? *Journal of Biological Chemistry*. **289**(50), pp.34433–34439.

- An, Q., Robins, P., Lindahl, T. and Barnes, D.E. 2007. 5-Fluorouracil Incorporated into DNA Is Excised by the Smug1 DNA Glycosylase to Reduce Drug Cytotoxicity. *Cancer Research*. **67**(3), pp.940–945.
- Andersen, S., Heine, T., Sneve, R., König, I., Krokan, H.E., Epe, B. and Nilsen, H. 2005. Incorporation of dUMP into DNA is a major source of spontaneous DNA damage, while excision of uracil is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis*. **26**(3), pp.547–555.
- Anderson, A.C., O’Neil, R.H., DeLano, W.L. and Stroud, R.M. 1999. The structural mechanism for half-the-sites reactivity in an enzyme, thymidylate synthase, involves a relay of changes between subunits. *Biochemistry*. **38**(42), pp.13829–13836.
- Anderson, D.D., Quintero, C.M. and Stover, P.J. 2011. Identification of a de novo thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**(37), pp.15163–15168.
- Anderson, D.D., Woeller, C.F., Chiang, E.-P., Shane, B. and Stover, P.J. 2012. Serine Hydroxymethyltransferase Anchors de Novo Thymidylate Synthesis Pathway to Nuclear Lamina for DNA Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. **287**(10), pp.7051–7062.
- Anderson, D.D., Woeller, C.F. and Stover, P.J. 2007. Small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) modification of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. **45**(12), pp.1760–1763.
- Andrali, S.S., Qian, Q. and Özcan, S. 2007. Glucose Mediates the Translocation of Neurod1 by O-Linked Glycosylation. *The Journal of biological chemistry*. **282**(21), pp.15589–15596.
- Andres, L.M., Blong, I.W., Evans, A.C., Rumachik, N.G., Yamaguchi, T., Pham, N.D., Thompson, P., Kohler, J.J. and Bertozzi, C.R. 2017. Chemical Modulation of Protein O-GlcNAcylation via OGT Inhibition Promotes Human Neural Cell Differentiation. *ACS chemical biology*. **12**(8), pp.2030–2039.
- Antosiewicz, A., Jarmuła, A., Przybylska, D., Mosieniak, G., Szczepanowska, J., Kowalkowska, A., Rode, W. and Cieśla, J. 2017. Human dihydrofolate reductase and thymidylate synthase form a complex in vitro and co-localize in normal and cancer cells. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*. **35**(7), pp.1474–1490.
- Aoyama, T., Naganawa, H., Suda, H., Uotani, K., Aoyagi, T. and Takeuchi, T. 1992. The structure of nagstatin, a new inhibitor of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *The Journal of Antibiotics*. **45**(9), pp.1557–1558.
- Appelgren, L.-E., Hamberger, B. and Theve, N.O. 1979. The Distribution of ¹⁴C-Labelled 5-Fluorouracil in Mice. *Gastrointestinal Cancer: Advances in Diagnostic Techniques and Therapy*. **5**, pp.62–70.
- Arellano, M., Malet-Martino, M., Martino, R. and Gires, P. 1998. The anti-cancer drug 5-fluorouracil is metabolized by the isolated perfused rat liver and in rats into highly toxic fluoroacetate. *British Journal of Cancer*. **77**(1), pp.79–86.
- Arnold, C.S., Johnson, G.V.W., Cole, R.N., Dong, D.L.-Y., Lee, M. and Hart, G.W. 1996. The Microtubule-associated Protein Tau Is Extensively Modified with O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry*. **271**(46), pp.28741–28744.
- Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C.B. and Seed, B. 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. **61**(7), pp.1303–1313.
- Aschele, C., Debernardis, D., Tunesi, G., Maley, F. and Sobrero, A. 2000. Thymidylate Synthase Protein Expression in Primary Colorectal Cancer Compared with the Corresponding Distant Metastases and Relationship with the Clinical Response to 5-Fluorouracil. *Clinical Cancer Research*. **6**(12), pp.4797–4802.
- Astler, V.B. and Collier, F.A. 1954. The Prognostic Significance of Direct Extension of Carcinoma of the Colon and Rectum. *Annals of Surgery*. **139**(6), pp.846–851.
- Avendaño, C. and Menéndez, J.C. 2015. Chapter 2 - Antimetabolites That Interfere with Nucleic Acid Biosynthesis In: C. Avendaño and J. C. Menéndez, eds. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs (Second Edition)* [Online]. Boston: Elsevier, pp.23–79. [Accessed 10 March 2020]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444626493000028>.
- Ayusawa, D., Shimizu, K., Koyama, H., Kaneda, S., Takeishi, K. and Seno, T. 1986. Cell-cycle-directed regulation of thymidylate synthase messenger RNA in human diploid fibroblasts stimulated to proliferate. *Journal of Molecular Biology*. **190**(4), pp.559–567.

- Bader, S., Walker, M. and Harrison, D. 2000. Most microsatellite unstable sporadic colorectal carcinomas carry MBD4 mutations. *British Journal of Cancer*. **83**(12), pp.1646–1649.
- Bader, S., Walker, M., Hendrich, B., Bird, A., Bird, C., Hooper, M. and Wyllie, A. 1999. Somatic frameshift mutations in the MBD4 gene of sporadic colon cancers with mismatch repair deficiency. *Oncogene*. **18**(56), pp.8044–8047.
- Bagley, P.J. and Selhub, J. 1998. A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is associated with an accumulation of formylated tetrahydrofolates in red blood cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**(22), pp.13217–13220.
- Baldini, S.F., Wavelet, C., Hainault, I., Guinez, C. and Lefebvre, T. 2016. The Nutrient-Dependent O-GlcNAc Modification Controls the Expression of Liver Fatty Acid Synthase. *Journal of Molecular Biology*. **428**(16), pp.3295–3304.
- Banerjee, D., Gorlick, R., Liefshitz, A., Danenberg, K., Danenberg, P.C., Danenberg, P.V., Klimstra, D., Jhanwar, S., Cordon-Cardo, C., Fong, Y., Kemeny, N. and Bertino, J.R. 2000. Levels of E2F-1 Expression Are Higher in Lung Metastasis of Colon Cancer As Compared with Hepatic Metastasis and Correlate with Levels of Thymidylate Synthase. *Cancer Research*. **60**(9), pp.2365–2367.
- Banerjee, D., Schnieders, B., Fu, J.Z., Adhikari, D., Zhao, S.-C. and Bertino, J.R. 1998. Role of E2F-1 in Chemosensitivity. *Cancer Research*. **58**(19), pp.4292–4296.
- Banerjee, P.S., Ma, J. and Hart, G.W. 2015. Diabetes-associated dysregulation of O-GlcNAcylation in rat cardiac mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **112**(19), pp.6050–6055.
- Bao, B., Ahmad, A., Azmi, A.S., Ali, S. and Sarkar, F.H. 2013. Cancer Stem Cells (CSCs) and Mechanisms of Their Regulation: Implications for Cancer Therapy. *Current protocols in pharmacology / editorial board, S.J. Enna (editor-in-chief) ... [et al.]*. **0 14**, Unit-14.25.
- Barbour, K.W., Xing, Y.-Y., Peña, E.A. and Berger, F.G. 2013. Characterization of the bipartite degron that regulates ubiquitin-independent degradation of thymidylate synthase. *Bioscience Reports*. **33**(1), pp.165–173.
- Barclay, R.K., Garfinkel, E. and Phillipps, M.A. 1962. Effects of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine on the incorporation of precursors into nucleic acids. *Cancer Research*. **22**, pp.908–914.
- Barker, N., van Es, J.H., Kuipers, J., Kujala, P., van den Born, M., Cozijnsen, M., Haegerbarth, A., Korving, J., Begthel, H., Peters, P.J. and Clevers, H. 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature*. **449**(7165), pp.1003–1007.
- Baron, A.D., Zhu, J.S., Zhu, J.H., Weldon, H., Maianu, L. and Garvey, W.T. 1995. Glucosamine induces insulin resistance in vivo by affecting GLUT 4 translocation in skeletal muscle. Implications for glucose toxicity. *The Journal of Clinical Investigation*. **96**(6), pp.2792–2801.
- Bayden, A.S., Yakovlev, V.A., Graves, P.R., Mikkelsen, R.B. and Kellogg, G.E. 2011. Factors influencing protein tyrosine nitration—structure-based predictive models. *Free Radical Biology and Medicine*. **50**(6), pp.749–762.
- Beck, A., Etienne, M.C., Chéradame, S., Fischel, J.L., Formento, P., Renée, N. and Milano, G. 1994. A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumour sensitivity to fluorouracil. *European Journal of Cancer*. **30**(10), pp.1517–1522.
- Beer, D., Maloisel, J.-L., Rast, D.M. and Vasella, A. 1990. Synthesis of 2-Acetamido-2-deoxy-D-gluconhydroximolactone- and Chitobionhydroximolactone-Derived N-Phenylcarbamates, Potential Inhibitors of β -N-Acetylglucosaminidase. *Helvetica Chimica Acta*. **73**(7), pp.1918–1922.
- Beishline, K. and Azizkhan-Clifford, J. 2015. Sp1 and the ‘hallmarks of cancer’. *The FEBS Journal*. **282**(2), pp.224–258.
- Bellacosa, A., Cicchillitti, L., Schepis, F., Riccio, A., Yeung, A.T., Matsumoto, Y., Golemis, E.A., Genuardi, M. and Neri, G. 1999. MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**(7), pp.3969–3974.
- Benito, E., Stiggelbout, A., Bosch, F.X., Obrador, A., Kaldor, J., Mulet, M. and Muñoz, N. 1991. Nutritional factors in colorectal cancer risk: a case-control study in Majorca. *International Journal of Cancer*. **49**(2), pp.161–167.

- Bennett, R.A. and Pegg, A.E. 1981. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Research*. **41**(7), pp.2786–2790.
- Berg, C.E., Lavan, B.E. and Rondinone, C.M. 2002. Rapamycin partially prevents insulin resistance induced by chronic insulin treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **293**(3), pp.1021–1027.
- Bertram, L., Blacker, D., Mullin, K., Keeney, D., Jones, J., Basu, S., Yhu, S., McInnis, M.G., Go, R.C., Vekrellis, K., Selkoe, D.J., Saunders, A.J. and Tanzi, R.E. 2000. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science (New York, N.Y.)*. **290**(5500), pp.2302–2303.
- Betticher, D., Thatcher, N., Altermatt, H., Hoban, P., Ryder, W. and Heighway, J. 1995. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. - PubMed - NCBI. *Oncogene*. **11**(5), pp.1005–1011.
- Bhaskar, P.T. and Hay, N. 2007. The Two TORCs and Akt. *Developmental Cell*. **12**(4), pp.487–502.
- Biessels, G.J., Staekenborg, S., Brunner, E., Brayne, C. and Scheltens, P. 2006. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *The Lancet. Neurology*. **5**(1), pp.64–74.
- Bissoon-Haqqani, S., Moyana, T., Jonker, D., Maroun, J.A. and Birnboim, H.C. 2006. Nuclear Expression of Thymidylate Synthase in Colorectal Cancer Cell Lines and Clinical Samples. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **54**(1), pp.19–29.
- Biwi, J., Clarisse, C., Biot, C., Kozak, R.P., Madunic, K., Mortuaire, M., Wuhrer, M., Spencer, D.I.R., Schulz, C., Guerardel, Y., Lefebvre, T. and Vercoutter-Edouart, A.-S. 2019. OGT Controls the Expression and the Glycosylation of E-cadherin, and Affects Glycosphingolipid Structures in Human Colon Cell Lines. *Proteomics*. **19**(21–22), p.e1800452.
- Bobzin, S.C., Yang, S. and Kasten, T.P. 2000. Application of liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy to the identification of natural products. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **748**(1), pp.259–267.
- Boehmelt, G., Fialka, I., Brothers, G., McGinley, M., Patterson, S., Mo, R., Hui, C., Chung, S., Huber, L., Mak, T. and Iscove, N. 2000. Cloning and characterization of the murine glucosamine-6-phosphate acetyltransferase EMeg32. Differential expression and intracellular membrane ass... - PubMed - NCBI. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(17), pp.12821–32.
- Boehmelt, G., Wakeham, A., Elia, A., Sasaki, T., Plyte, S., Potter, J., Yang, Y., Tsang, E., Ruland, J., Iscove, N., Dennis, J. and Mak, T. 2000. Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. *The EMBO Journal*. **19**(19), pp.5092–5104.
- Bonin, J.P., Sapienza, P.J., Wilkerson, E., Goldfarb, D., Wang, L., Herring, L., Chen, X., Major, M.B. and Lee, A.L. 2019. Positive Cooperativity in Substrate Binding by Human Thymidylate Synthase. *Biophysical Journal*. **117**(6), pp.1074–1084.
- Bonnet, D. and Dick, J.E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*. **3**(7), pp.730–737.
- Borghgraef, P., Menuet, C., Theunis, C., Louis, J.V., Devijver, H., Maurin, H., Smet-Nocca, C., Lippens, G., Hilaire, G., Gijzen, H., Moechars, D. and Leuven, F.V. 2013. Increasing Brain Protein O-GlcNAc-ylation Mitigates Breathing Defects and Mortality of Tau.P301L Mice. *PLOS ONE*. **8**(12), p.e84442.
- Borodkin, V.S. and van Aalten, D.M.F. 2010. An efficient and versatile synthesis of GlcNAcstatins — potent and selective O-GlcNAcase inhibitors built on the tetrahydroimidazo[1,2-a]pyridine scaffold. *Tetrahedron*. **66**(39–3), pp.7838–7849.
- Borodkin, V.S., Schimpl, M., Gundogdu, M., Rafie, K., Dorfmüller, H.C., Robinson, D.A. and vanAalten, D.M.F. 2014. Bisubstrate UDP-peptide conjugates as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *Biochemical Journal*. **457**(Pt 3), pp.497–502.
- Bossis, G., Ferrara, P., Acquaviva, C., Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. 2003. c-Fos Proto-Oncoprotein Is Degraded by the Proteasome Independently of Its Own Ubiquitylation In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*. **23**(20), pp.7425–7436.
- Bostick, R.M., Potter, J.D., Kushi, L.H., Sellers, T.A., Steinmetz, K.A., McKenzie, D.R., Gapstur, S.M. and Folsom, A.R. 1994. Sugar, meat, and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States). *Cancer causes & control: CCC*. **5**(1), pp.38–52.
- Bourke, R.S., West, C.R., Chheda, G. and Tower, D.B. 1973. Kinetics of Entry and Distribution of 5-Fluorouracil in Cerebrospinal Fluid and Brain following Intravenous Injection in a Primate. *Cancer Research*. **33**(7), pp.1735–1746.

- Boyer, C., Karijan, P., Wahl, G., Pegram, M. and Neuteboom, sT 2002. Nucleoside transport inhibitors, dipyrindamole and p-nitrobenzylthioinosine, selectively potentiate the antitumor activity of NB1011. - PubMed - NCBI. . **13**(1), pp.29–36.
- Braidman, I., Carroll, M., Dance, N., Robinson, D., Poenaru, L., Weber, A., Dreyfus, J.C., Overdijk, B. and Hooghwinkel, G.J. 1974. Characterisation of human N-acetyl-beta-hexosaminidase C. *FEBS letters*. **41**(2), pp.181–184.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. **68**(6), pp.394–424.
- Broschat, K.O., Gorka, C., Page, J.D., Martin-Berger, C.L., Davies, M.S., Huang Hc, H., Gulve, E.A., Salsgiver, W.J. and Kasten, T.P. 2002. Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**(17), pp.14764–14770.
- Brown, N.S., Jones, A., Fujiyama, C., Harris, A.L. and Bicknell, R. 2000. Thymidine Phosphorylase Induces Carcinoma Cell Oxidative Stress and Promotes Secretion of Angiogenic Factors. *Cancer Research*. **60**(22), pp.6298–6302.
- Bullen, J.W., Balsbaugh, J.L., Chanda, D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Neumann, D. and Hart, G.W. 2014. Cross-talk between Two Essential Nutrient-sensitive Enzymes. *The Journal of Biological Chemistry*. **289**(15), pp.10592–10606.
- Bunz, F., Hwang, P.M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. 1999. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *Journal of Clinical Investigation*. **104**(3), pp.263–269.
- Buratowski, S. 2009. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Molecular cell*. **36**(4), pp.541–546.
- Butkinaree, C., Cheung, W.D., Park, S., Park, K., Barber, M. and Hart, G.W. 2008. Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. **283**(35), pp.23557–23566.
- Caldwell, S.A., Jackson, S.R., Shahriari, K.S., Lynch, T.P., Sethi, G., Walker, S., Vosseller, K. and Reginato, M.J. 2010. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene*. **29**(19), pp.2831–2842.
- Cancer Genome Atlas Network 2012. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. **487**(7407), pp.330–337.
- Canman, C.E., Lawrence, T.S., Shewach, D.S., Tang, H.Y. and Maybaum, J. 1993. Resistance to fluorodeoxyuridine-induced DNA damage and cytotoxicity correlates with an elevation of deoxyuridine triphosphatase activity and failure to accumulate deoxyuridine triphosphate. *Cancer Research*. **53**(21), pp.5219–5224.
- Cao, S., Chang, W., Wan, C., Zang, Y., Zhao, J., Chen, J., Li, B., Ma, Q. and Zhang, C. 2018. Bi-clustering based biological and clinical characterization of colorectal cancer in complementary to CMS classification. *bioRxiv*, p.508275.
- Capotosti, F., Guernier, S., Lammers, F., Waridel, P., Cai, Y., Jin, J., Conaway, J.W., Conaway, R.C. and Herr, W. 2011. O-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell*. **144**(3), pp.376–388.
- Caradonna, S.J. and Cheng, Y.C. 1980. The role of deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase, uracil-DNA glycosylase, and DNA polymerase alpha in the metabolism of FUdR in human tumor cells. *Molecular Pharmacology*. **18**(3), pp.513–520.
- Cardinale, D., Guitoli, G., Tondi, D., Luciani, R., Henrich, S., Salo-Ahen, O.M.H., Ferrari, S., Marverti, G., Guerrieri, D., Ligabue, A., Frassinetti, C., Pozzi, C., Mangani, S., Fessas, D., Guerrini, R., Ponterini, G., Wade, R.C. and Costi, M.P. 2011. Protein-protein interface-binding peptides inhibit the cancer therapy target human thymidylate synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**(34), pp.E542-549.
- Carethers, J.M., Chauhan, D.P., Fink, D., Nebel, S., Bresalier, R.S., Howell, S.B. and Boland, C.R. 1999. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology*. **117**(1), pp.123–131.

- Carethers, J.M., Smith, E.J., Behling, C.A., Nguyen, L., Tajima, A., Doctolero, R.T., Cabrera, B.L., Goel, A., Arnold, C.A., Miyai, K. and Boland, C.R. 2004. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology*. **126**(2), pp.394–401.
- Carvalho, K.C., Cunha, I.W., Rocha, R.M., Ayala, F.R., Cajaiba, M.M., Begnami, M.D., Vilela, R.S., Paiva, G.R., Andrade, R.G. and Soares, F.A. 2011. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics*. **66**(6), pp.965–972.
- Casadaban, L., Rauscher, G., Aklilu, M., Villenes, D., Freels, S. and Maker, A.V. 2016. Adjuvant Chemotherapy is Associated with Improved Survival in Patients with Stage II Colon Cancer. *Cancer*. **122**(21), pp.3277–3287.
- Casale, F., Canaparo, R., Serpe, L., Muntoni, E., Pepa, C.D., Costa, M., Mairone, L., Zara, G.P., Fornari, G. and Eandi, M. 2004. Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients. *Pharmacological Research*. **50**(2), pp.173–179.
- Cekic, N., Heinonen, J.E., Stubbs, K.A., Roth, C., He, Y., Bennet, A.J., McEachern, E.J., Davies, G.J. and Vocadlo, D.J. 2016. Analysis of transition state mimicry by tight binding aminothiazoline inhibitors provides insight into catalysis by human O-GlcNAcase †Electronic supplementary information (ESI) available: Detailed experimental procedures, NMR spectra and additional figures illustrating Ki graphs, kinetic data, pKa titration data and structural analysis data. See DOI: 10.1039/c6sc00370b. *Chemical Science*. **7**(6), pp.3742–3750.
- Center, M.M., Jemal, A. and Ward, E. 2009. International Trends in Colorectal Cancer Incidence Rates. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. **18**(6), pp.1688–1694.
- Çetinbaş, N., Macauley, M.S., Stubbs, K.A., Drapala, R. and Vocadlo, D.J. 2006. Identification of Asp174 and Asp175 as the Key Catalytic Residues of Human O-GlcNAcase by Functional Analysis of Site-Directed Mutants. *Biochemistry*. **45**(11), pp.3835–3844.
- Chalkley, R.J. and Burlingame, A.L. 2003. Identification of novel sites of O-N-acetylglucosamine modification of serum response factor using quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **2**(3), pp.182–190.
- Champattanachai, V., Marchase, R.B. and Chatham, J.C. 2008. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. **294**(6), pp.C1509-1520.
- Champattanachai, V., Netsirisawan, P., Chaiyawat, P., Phueaouan, T., Charoenwattanasatien, R., Chokchaichamnankit, D., Punyarit, P., Srisomsap, C. and Svasti, J. 2013. Proteomic analysis and abrogated expression of O-GlcNAcylated proteins associated with primary breast cancer. *Proteomics*. **13**(14), pp.2088–2099.
- Chanama, S., Chitnumsub, P., Leartsakulpanich, U. and Chanama, M. 2017. Distinct dimer interface of Plasmodium falciparum thymidylate synthase: Implication for species-specific antimalarial drug design. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. **48**(4), pp.722–736.
- Chang, Q., Su, K., Baker, J.R., Yang, X., Paterson, A.J. and Kudlow, J.E. 2000. Phosphorylation of Human Glutamine:Fructose-6-phosphate Amidotransferase by cAMP-dependent Protein Kinase at Serine 205 Blocks the Enzyme Activity. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(29), pp.21981–21987.
- de la Chapelle, A. 2004. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature Reviews. Cancer*. **4**(10), pp.769–780.
- Chaudhuri, N.K., Montag, B.J. and Heidelberger, C. 1958. Studies on fluorinated pyrimidines. III. The metabolism of 5-fluorouracil-2-C14 and 5-fluoroorotic-2-C14 acid in vivo. *Cancer Research*. **18**(3), pp.318–328.
- Chen, D., Jansson, A., Sim, D., Larsson, A. and Nordlund, P. 2017. Structural analyses of human thymidylate synthase reveal a site that may control conformational switching between active and inactive states. *Journal of Biological Chemistry*. **292**(32), pp.13449–13458.
- Chen, J., Pan, Y., He, B., Ying, H., Wang, F., Sun, H., Deng, Q., Liu, X., Lin, K., Peng, H., Cho, W.C. and Wang, S. 2015. Inhibition of CD147 expression by RNA interference reduces proliferation, invasion and increases chemosensitivity in cancer stem cell-like HT-29 cells. *International Journal of Oncology*. **47**(4), pp.1476–1484.

- Chen, L. and Feany, M.B. 2005. α -Synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a *Drosophila* model of Parkinson disease. *Nature Neuroscience*. **8**(5), pp.657–663.
- Chen, Q., Chen, Y., Bian, C., Fujiki, R. and Yu, X. 2013. TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature*. **493**(7433), pp.561–564.
- Cheng, X. and Hart, G.W. 2001. Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**(13), pp.10570–10575.
- Cheng, Y., Diao, D., Zhang, H., Guo, Q., Wu, X., Song, Y. and Dang, C. 2014. High glucose-induced resistance to 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells alleviated by 2-deoxy-D-glucose. *Biomedical Reports*. **2**(2), pp.188–192.
- Cheung, W.D. and Hart, G.W. 2008. AMP-activated Protein Kinase and p38 MAPK Activate O-GlcNAcylation of Neuronal Proteins during Glucose Deprivation. *The Journal of Biological Chemistry*. **283**(19), pp.13009–13020.
- Cheung, W.D., Sakabe, K., Housley, M.P., Dias, W.B. and Hart, G.W. 2008. O-Linked β -N-Acetylglucosaminyltransferase Substrate Specificity Is Regulated by Myosin Phosphatase Targeting and Other Interacting Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. **283**(49), pp.33935–33941.
- Chiang, G.G. and Abraham, R.T. 2007. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends in Molecular Medicine*. **13**(10), pp.433–442.
- Choi, H., Kim, C., Song, H., Cha, M., Cho, H.J., Son, S.M., Kim, H.J. and Mook-Jung, I. 2019. Amyloid β -induced elevation of O-GlcNAcylated c-Fos promotes neuronal cell death. *Aging Cell*. **18**(1).
- Choi, S.-Y., Kim, M.-J., Kang, C.-M., Bae, S., Cho, C.-K., Soh, J.-W., Kim, J.-H., Kang, S., Chung, H.Y., Lee, Y.-S. and Lee, S.-J. 2006. Activation of Bak and Bax through c-abl-protein kinase Cdelta-p38 MAPK signaling in response to ionizing radiation in human non-small cell lung cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **281**(11), pp.7049–7059.
- Chou, C.F. and Omary, M.B. 1994. Mitotic arrest with anti-microtubule agents or okadaic acid is associated with increased glycoprotein terminal GlcNAc's. *Journal of Cell Science*. **107 (Pt 7)**, pp.1833–1843.
- Chou, C.F. and Omary, M.B. 1993. Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18. *Journal of Biological Chemistry*. **268**(6), pp.4465–4472.
- Chou, C.F., Smith, A.J. and Omary, M.B. 1992. Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**(6), pp.3901–3906.
- Chou, T.-Y., Hart, G.W. and Dang, C.V. 1995. c-Myc Is Glycosylated at Threonine 58, a Known Phosphorylation Site and a Mutational Hot Spot in Lymphomas. *Journal of Biological Chemistry*. **270**(32), pp.18961–18965.
- Christou, N., Perraud, A., Blondy, S., Jauberteau, M.-O., Battu, S. and Mathonnet, M. 2017. E-cadherin: A potential biomarker of colorectal cancer prognosis. *Oncology Letters*. **13**(6), pp.4571–4576.
- Chu, C.-S., Lo, P.-W., Yeh, Y.-H., Hsu, P.-H., Peng, S.-H., Teng, Y.-C., Kang, M.-L., Wong, C.-H. and Juan, L.-J. 2014. O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111**(4), pp.1355–1360.
- Chu, E., Copur, S.M., Ju, J., Chen, T., Khleif, S., Voeller, D.M., Mizunuma, N., Patel, M., Maley, G.F., Maley, F. and Allegra, C.J. 1999. Thymidylate Synthase Protein and p53 mRNA Form an In Vivo Ribonucleoprotein Complex. *Molecular and Cellular Biology*. **19**(2), pp.1582–1594.
- Chu, E., Takechi, T., Jones, K.L., Voeller, D.M., Copur, S.M., Maley, G.F., Maley, F., Segal, S. and Allegra, C.J. 1995. Thymidylate synthase binds to c-myc RNA in human colon cancer cells and in vitro. *Molecular and Cellular Biology*. **15**(1), pp.179–185.
- Chu, E., Voeller, D.M., Morrison, P.F., Jones, K.L., Takechi, T., Maley, G.F., Maley, F. and Allegra, C.J. 1994. The effect of reducing reagents on binding of thymidylate synthase protein to thymidylate synthase messenger RNA. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**(32), pp.20289–20293.
- Chu, J. and Dolnick, B.J. 2002. Natural antisense (rTSalpha) RNA induces site-specific cleavage of thymidylate synthase mRNA. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1587**(2–3), pp.183–193.
- Chung, Y.M., Kim, J.S. and Yoo, Y.D. 2006. A novel protein, Romo1, induces ROS production in the mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **347**(3), pp.649–655.

- Ciaparrone, M., Quirino, M., Schinzari, G., Zannoni, G., Corsi, D.C., Vecchio, F.M., Cassano, A., La Torre, G. and Barone, C. 2006. Predictive role of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase expression in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Oncology*. **70**(5), pp.366–377.
- Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., Lefebvre, T., Lemoine, J., Mounier, Y. and Michalski, J.-C. 2004. Identification of O-linked N-acetylglucosamine proteins in rat skeletal muscle using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **3**(6), pp.577–585.
- Cieniewski-Bernard, C., Montel, V., Berthoin, S. and Bastide, B. 2012. Increasing O-GlcNAcylation Level on Organ Culture of Soleus Modulates the Calcium Activation Parameters of Muscle Fibers. *PLoS ONE*. **7**(10).
- Cieśla, J., Fraczyk, T., Zieliński, Z., Sikora, J. and Rode, W. 2006. Altered mouse leukemia L1210 thymidylate synthase, associated with cell resistance to 5-fluoro-dUrd, is not mutated but rather reflects posttranslational modification. *Acta Biochimica Polonica*. **53**(1), pp.189–198.
- Cioci, G., Mitchell, E.P., Chazalet, V., Debray, H., Oscarson, S., Lahmann, M., Gautier, C., Breton, C., Perez, S. and Imberty, A. 2006. Beta-propeller crystal structure of Psathyrella velutina lectin: an integrin-like fungal protein interacting with monosaccharides and calcium. *Journal of Molecular Biology*. **357**(5), pp.1575–1591.
- Clarke, A.J., Hurtado-Guerrero, R., Pathak, S., Schüttelkopf, A.W., Borodkin, V., Shepherd, S.M., Ibrahim, A.F.M. and van Aalten, D.M.F. 2008. Structural insights into mechanism and specificity of O-GlcNAc transferase. *The EMBO Journal*. **27**(20), pp.2780–2788.
- Cole, R.N. and Hart, G.W. 2001. Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals. *Journal of Neurochemistry*. **79**(5), pp.1080–1089.
- Collura, A., Lagrange, A., Svrcek, M., Marisa, L., Buhard, O., Guilloux, A., Wanherdrick, K., Dorard, C., Taieb, A., Saget, A., Loh, M., Soong, R., Zeps, N., Platell, C., Mews, A., Iacopetta, B., De Thonel, A., Seigneuric, R., Marcion, G., Chapusot, C., Lepage, C., Bouvier, A., Gaub, M., Milano, G., Selves, J., Senet, P., Delarue, P., Arzouk, H., Lacoste, C., Coquelle, A., Bengrine-Lefèvre, L., Tournigand, C., Lefèvre, J.H., Parc, Y., Biard, D.S., Fléjou, J., Garrido, C. and Duval, A. 2014. Patients With Colorectal Tumors With Microsatellite Instability and Large Deletions in HSP110 T17 Have Improved Response to 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy. *Gastroenterology*. **146**(2), pp.401-411.e1.
- Comer, F.I. and Hart, G.W. 2001. Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry*. **40**(26), pp.7845–7852.
- Comtesse, N., Maldener, E. and Meese, E. 2001. Identification of a Nuclear Variant of MGEA5, a Cytoplasmic Hyaluronidase and a β -N-Acetylglucosaminidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **283**(3), pp.634–640.
- Corazza, N., Jakob, S., Schaer, C., Frese, S., Keogh, A., Stroka, D., Kassahn, D., Torgler, R., Mueller, C., Schneider, P. and Brunner, T. 2006. TRAIL receptor-mediated JNK activation and Bim phosphorylation critically regulate Fas-mediated liver damage and lethality. *The Journal of Clinical Investigation*. **116**(9), pp.2493–2499.
- Corbeil, D., Röper, K., Fargeas, C.A., Joester, A. and Huttner, W.B. 2001. Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. **2**(2), pp.82–91.
- Cortellino, S., Turner, D., Masciullo, V., Schepis, F., Albino, D., Daniel, R., Skalka, A.M., Meropol, N.J., Alberti, C., Larue, L. and Bellacosa, A. 2003. The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**(25), pp.15071–15076.
- Coulthard, L.R., White, D.E., Jones, D.L., McDermott, M.F. and Burchill, S.A. 2009. p38MAPK: stress responses from molecular mechanisms to therapeutics. *Trends in molecular medicine*. **15**(8), pp.369–379.
- Crosnier, C., Stamatakis, D. and Lewis, J. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature Reviews. Genetics*. **7**(5), pp.349–359.
- Curtin, K., Slattery, M.L. and Samowitz, W.S. 2011. CpG Island Methylation in Colorectal Cancer: Past, Present and Future. *Pathology Research International*. **2011**.

- Curtin, N.J. 2012. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nature Reviews Cancer*. **12**(12), pp.801–817.
- Dąbrowska-Maś, E., Frączyk, T., Ruman, T., Radziszewska, K., Wilk, P., Cieśła, J., Zieliński, Z., Jurkiewicz, A., Gołos, B., Wińska, P., Wałajtyś-Rode, E., Leś, A., Nizioł, J., Jarmuła, A., Stefanowicz, P., Szewczuk, Z. and Rode, W. 2012. Tyrosinenitration affects thymidylate synthase properties. *Org. Biomol. Chem.* **10**(2), pp.323–331.
- Dalerba, P., Dylla, S.J., Park, I.-K., Liu, R., Wang, X., Cho, R.W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E.H., Simeone, D.M., Shelton, A.A., Parmiani, G., Castelli, C. and Clarke, M.F. 2007. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**(24), pp.10158–10163.
- Dallas, N.A., Xia, L., Fan, F., Gray, M.J., Gaur, P., Buren, G. van, Samuel, S., Kim, M.P., Lim, S.J. and Ellis, L.M. 2009. Chemoresistant Colorectal Cancer Cells, the Cancer Stem Cell Phenotype, and Increased Sensitivity to Insulin-like Growth Factor-I Receptor Inhibition. *Cancer Research*. **69**(5), pp.1951–1957.
- van Dam, R.M., Rimm, E.B., Willett, W.C., Stampfer, M.J. and Hu, F.B. 2002. Dietary patterns and risk for type 2 diabetes mellitus in U.S. men. *Annals of Internal Medicine*. **136**(3), pp.201–209.
- D’Andrea, L.D. and Regan, L. 2003. TPR proteins: the versatile helix. *Trends in Biochemical Sciences*. **28**(12), pp.655–662.
- Danielsen, S.A., Eide, P.W., Nesbakken, A., Guren, T., Leithe, E. and Lothe, R.A. 2015. Portrait of the PI3K/AKT pathway in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. **1855**(1), pp.104–121.
- Daou, S., Mashtalir, N., Hammond-Martel, I., Pak, H., Yu, H., Sui, G., Vogel, J.L., Kristie, T.M. and Affar, E.B. 2011. Crosstalk between O-GlcNAcylation and proteolytic cleavage regulates the host cell factor-1 maturation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**(7), pp.2747–2752.
- Das, S., Bailey, S.K., Metge, B.J., Hanna, A., Hinshaw, D.C., Mota, M., Forero-Torres, A., Chatham, J.C., Samant, R.S. and Shevde, L.A. 2019. O-GlcNAcylation of GLI Transcription Factors in Hyperglycemic Conditions Augments Hedgehog activity. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. **99**(2), pp.260–270.
- Datta, R., Choudhury, P., Ghosh, A. and Datta, B. 2003. A Glycosylation Site, 60SGTS63, of p67 Is Required for Its Ability To Regulate the Phosphorylation and Activity of Eukaryotic Initiation Factor 2 α . *Biochemistry*. **42**(18), pp.5453–5460.
- Dauphinee, S.M., Ma, M. and Too, C.K.L. 2005. Role of O-linked β -N-acetylglucosamine modification in the subcellular distribution of alpha4 phosphoprotein and Sp1 in rat lymphoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. **96**(3), pp.579–588.
- De Iudicibus, S., De Pellegrin, A., Stocco, G., Bartoli, F., Bussani, R. and Decorti, G. 2008. ABCB1 gene polymorphisms and expression of P-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer. *Anticancer Research*. **28**(6B), pp.3921–3928.
- De Mattia, E., Toffoli, G., Polesel, J., D’Andrea, M., Corona, G., Zagonel, V., Buonadonna, A., Dreussi, E. and Cecchin, E. 2013. Pharmacogenetics of ABC and SLC transporters in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFIRI treatment. *Pharmacogenetics and Genomics*. **23**(10), pp.549–557.
- De Santa Barbara, P., Van Den Brink, G.R. and Roberts, D.J. 2003. Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **60**(7), pp.1322–1332.
- DeBerardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D. and Thompson, C.B. 2008. Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Current opinion in genetics & development*. **18**(1), pp.54–61.
- 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. *Frontiers in Endocrinology*. **10**.
- Deenen, M.J., Meulendijks, D., Cats, A., Sechterberger, M.K., Severens, J.L., Boot, H., Smits, P.H., Rosing, H., Mandigers, C.M.P.W., Soesan, M., Beijnen, J.H. and Schellens, J.H.M. 2016. Upfront Genotyping of DPYD*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **34**(3), pp.227–234.

- DeGregori, J., Kowalik, T. and Nevins, J.R. 1995. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Molecular and Cellular Biology*. **15**(8), pp.4215–4224.
- Dehennaut, V., Hanouille, X., Bodart, J.-F., Vilain, J.-P., Michalski, J.-C., Landrieu, I., Lippens, G. and Lefebvre, T. 2008. Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates *Xenopus* oocytes M-phase entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **369**(2), pp.539–546.
- Dehennaut, V., Lefebvre, T., Leroy, Y., Vilain, J.-P., Michalski, J.-C. and Bodart, J.-F. 2009. Survey of O-GlcNAc level variations in *Xenopus laevis* from oogenesis to early development. *Glycoconjugate Journal*. **26**(3), pp.301–311.
- Dehennaut, V., Lefebvre, T., Sellier, C., Leroy, Y., Gross, B., Walker, S., Cacan, R., Michalski, J.-C., Vilain, J.-P. and Bodart, J.-F. 2007. O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase Inhibition Prevents G2/M Transition in *Xenopus laevis* Oocytes. *Journal of Biological Chemistry*. **282**(17), pp.12527–12536.
- Dehennaut, V., Slomianny, M.-C., Page, A., Vercoutter-Edouart, A.-S., Jessus, C., Michalski, J.-C., Vilain, J.-P., Bodart, J.-F. and Lefebvre, T. 2008. Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in *Xenopus laevis* oocyte. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **7**(11), pp.2229–2245.
- Deng, Y., Li, B., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Brandt, R. and Gong, C.-X. 2008. Regulation between O-GlcNAcylation and phosphorylation of neurofilament-M and their dysregulation in Alzheimer disease. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **22**(1), pp.138–145.
- Dentin, R., Hedrick, S., Xie, J., Yates, J. and Montminy, M. 2008. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science (New York, N.Y.)*. **319**(5868), pp.1402–1405.
- Deplus, R., Delatte, B., Schwinn, M.K., Defrance, M., Méndez, J., Murphy, N., Dawson, M.A., Volkmar, M., Putmans, P., Calonne, E., Shih, A.H., Levine, R.L., Bernard, O., Mercher, T., Solary, E., Urh, M., Daniels, D.L. and Fuks, F. 2013. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *The EMBO Journal*. **32**(5), pp.645–655.
- Derezini, M., Montanaro, L., Tréré, D., Chillà, A., Tazzari, P.L., Dall’Olio, F. and Ofner, D. 2002. Thymidylate synthase protein expression and activity are related to the cell proliferation rate in human cancer cell lines. *Molecular pathology: MP*. **55**(5), pp.310–314.
- Dev, I.K., Dallas, W.S., Ferone, R., Hanlon, M., McKee, D.D. and Yates, B.B. 1994. Mode of binding of folate analogs to thymidylate synthase. Evidence for two asymmetric but interactive substrate binding sites. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**(3), pp.1873–1882.
- Dexter, D.L., Spremulli, E.N., Fligel, Z., Barbosa, J.A., Vogel, R., VanVoorhees, A. and Calabresi, P. 1981. Heterogeneity of cancer cells from a single human colon carcinoma. *The American Journal of Medicine*. **71**(6), pp.949–956.
- Dias, W.B., Cheung, W.D. and Hart, G.W. 2012. O-GlcNAcylation of Kinases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **422**(2), pp.224–228.
- Dias, W.B., Cheung, W.D., Wang, Z. and Hart, G.W. 2009. Regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV by O-GlcNAc modification. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(32), pp.21327–21337.
- Dieckmann-Schuppert, A., Bause, E. and Schwarz, R.T. 1993. Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-transferase in malaria parasites. *European Journal of Biochemistry*. **216**(3), pp.779–788.
- Dignam, J.J., Polite, B.N., Yothers, G., Raich, P., Colangelo, L., O’Connell, M.J. and Wolmark, N. 2006. Body mass index and outcomes in patients who receive adjuvant chemotherapy for colon cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. **98**(22), pp.1647–1654.
- Dikovskaya, D., Schiffmann, D., Newton, I.P., Oakley, A., Kroboth, K., Sansom, O., Jamieson, T.J., Meniel, V., Clarke, A. and Näthke, I.S. 2007. Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *The Journal of Cell Biology*. **176**(2), pp.183–195.
- Ding, M. and Vandr , D.D. 1996. High molecular weight microtubule-associated proteins contain O-linked-N-acetylglucosamine. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**(21), pp.12555–12561.
- Dolnick, B.J. 1993. Cloning and characterization of a naturally occurring antisense RNA to human thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Research*. **21**(8), pp.1747–1752.

- Dolnick, B.J., Angelino, N.J., Dolnick, R. and Sufrin, J.R. 2003. A novel function for the rTS gene. *Cancer Biology & Therapy*. **2**(4), pp.364–369.
- Dolnick, B.J. and Black, A.R. 1996. Alternate splicing of the rTS gene product and its overexpression in a 5-fluorouracil-resistant cell line. *Cancer Research*. **56**(14), pp.3207–3210.
- Dolnick, B.J., Lu, K., Yin, M.B. and Rustum, Y.M. 1997. Recent advances in the study of rTS proteins. rTS expression during growth and in response to thymidylate synthase inhibitors in human tumor cells. *Advances in Enzyme Regulation*. **37**, pp.95–109.
- Dolnick, R., Wu, Q., Angelino, N.J., Stephanie, L.V., Chow, K.-C., Sufrin, J.R. and Dolnick, B.J. 2005. Enhancement of 5-Fluorouracil Sensitivity by an rTS Signaling Mimic in H630 Colon Cancer Cells. *Cancer Research*. **65**(13), pp.5917–5924.
- Dong, D.L. and Hart, G.W. 1994. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**(30), pp.19321–19330.
- Dong, D.L., Xu, Z.S., Chevrier, M.R., Cotter, R.J., Cleveland, D.W. and Hart, G.W. 1993. Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M. *The Journal of Biological Chemistry*. **268**(22), pp.16679–16687.
- Dong, S., Lester, L. and Johnson, L.F. 2000. Transcriptional control elements and complex initiation pattern of the TATA-less bidirectional human thymidylate synthase promoter. *Journal of Cellular Biochemistry*. **77**(1), pp.50–64.
- Dorfmueller, H.C. and van Aalten, D.M.F. 2010. Screening-based discovery of drug-like O-GlcNAcase inhibitor scaffolds. *FEBS letters*. **584**(4), pp.694–700.
- Dorfmueller, H.C., Borodkin, V.S., Blair, D.E., Pathak, S., Navratilova, I. and van Aalten, D.M.F. 2011. Substrate and product analogues as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *Amino Acids*. **40**(3), pp.781–792.
- Dorfmueller, H.C., Borodkin, V.S., Schimpl, M., Shepherd, S.M., Shpiro, N.A. and van Aalten, D.M.F. 2006. GlcNAcstatin: a picomolar, selective O-GlcNAcase inhibitor that modulates intracellular O-glcNAcylation levels. *Journal of the American Chemical Society*. **128**(51), pp.16484–16485.
- Dorfmueller, H.C., Borodkin, V.S., Schimpl, M., Zheng, X., Kime, R., Read, K.D. and van Aalten, D.M.F. 2010. Cell-Penetrant, Nanomolar O-GlcNAcase Inhibitors Selective against Lysosomal Hexosaminidases. *Chemistry & Biology*. **17**(11), pp.1250–1255.
- Douillard, J.-Y., Hoff, P.M., Skillings, J.R., Eisenberg, P., Davidson, N., Harper, P., Vincent, M.D., Lembersky, B.C., Thompson, S., Maniero, A. and Benner, S.E. 2002. Multicenter phase III study of uracil/tegafur and oral leucovorin versus fluorouracil and leucovorin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **20**(17), pp.3605–3616.
- Drougat, L., Olivier-Van Stichelen, S., Mortuaire, M., Foulquier, F., Lacoste, A.-S., Michalski, J.-C., Lefebvre, T. and Vercoutter-Edouart, A.-S. 2012. Characterization of O-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1820**(12), pp.1839–1848.
- Duggirala, R., Blangero, J., Almasy, L., Dyer, T.D., Williams, K.L., Leach, R.J., O'Connell, P. and Stern, M.P. 1999. Linkage of Type 2 Diabetes Mellitus and of Age at Onset to a Genetic Location on Chromosome 10q in Mexican Americans. *The American Journal of Human Genetics*. **64**(4), pp.1127–1140.
- Dukes, C.E. 1932. The classification of cancer of the rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. **35**(3), pp.323–332.
- Dutrillaux, B. and Muleris, M. 1986. Induction of increased salvage pathways of nucleotide synthesis by dosage effect due to chromosome imbalances may be fundamental in carcinogenesis: the example of colorectal carcinoma. *Annales De Genetique*. **29**(1), pp.11–15.
- Eguchi, S., Oshiro, N., Miyamoto, T., Yoshino, K., Okamoto, S., Ono, T., Kikkawa, U. and Yonezawa, K. 2009. AMP-activated protein kinase phosphorylates glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase 1 at Ser243 to modulate its enzymatic activity. *Genes to Cells*. **14**(2), pp.179–189.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*. **5**(6), pp.435–445.

- Elsner, M., Guldbakke, B., Tiedge, M., Munday, R. and Lenzen, S. 2000. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia*. **43**(12), pp.1528–1533.
- Elsner, M., Tiedge, M., Guldbakke, B., Munday, R. and Lenzen, S. 2002. Importance of the GLUT2 glucose transporter for pancreatic beta cell toxicity of alloxan. *Diabetologia*. **45**(11), pp.1542–1549.
- Erlichman, C., Fine, S. and Elhakim, T. 1986. Plasma pharmacokinetics of 5-FU given by continuous infusion with allopurinol. *Cancer Treatment Reports*. **70**(7), pp.903–904.
- van Erning, F.N., Creemers, G.J., De Hingh, I.H.J.T., Loosveld, O.J.L., Goey, S.H. and Lemmens, V.E.P.P. 2013. Reduced risk of distant recurrence after adjuvant chemotherapy in patients with stage III colon cancer aged 75 years or older. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. **24**(11), pp.2839–2844.
- Esmailzadeh, A., Kimiagar, M., Mehrabi, Y., Azadbakht, L., Hu, F.B. and Willett, W.C. 2007. Dietary patterns, insulin resistance, and prevalence of the metabolic syndrome in women. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **85**(3), pp.910–918.
- Etienne-Grimaldi, M.-C., Boyer, J.-C., Beroud, C., Mbatchi, L., van Kuilenburg, A., Bobin-Dubigeon, C., Thomas, F., Chatelut, E., Merlin, J.-L., Pinguet, F., Ferrand, C., Meijer, J., Evrard, A., Llorca, L., Romieu, G., Follana, P., Bachelot, T., Chaigneau, L., Pivot, X., Dieras, V., Largillier, R., Mousseau, M., Goncalves, A., Roché, H., Bonnetterre, J., Servent, V., Dohollou, N., Château, Y., Chamorey, E., Desvignes, J.-P., Salgado, D., Ferrero, J.-M. and Milano, G. 2017. New advances in DPYD genotype and risk of severe toxicity under capecitabine. *PLoS ONE*. **12**(5).
- Etienne-Grimaldi, M.-C., Milano, G., Maindrault-Goebel, F., Chibaudel, B., Formento, J.-L., Francoual, M., Lledo, G., André, T., Mabro, M., Mineur, L., Flesch, M., Carola, E. and Gramont, A.D. 2010. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *British Journal of Clinical Pharmacology*. **69**(1), pp.58–66.
- Evrard, A., Cuq, P., Robert, B., Vian, L., Pèlegri, A. and Cano, J.-P. 1999. Enhancement of 5-fluorouracil cytotoxicity by human thymidine-phosphorylase expression in cancer cells: In vitro and In vivo study. *International Journal of Cancer*. **80**(3), pp.465–470.
- Faghihi, M.A. and Wahlestedt, C. 2006. RNA interference is not involved in natural antisense mediated regulation of gene expression in mammals. *Genome Biology*. **7**(5), p.R38.
- Fan, Q., Moen, A., Anonsen, J.H., Bindesbøll, C., Sæther, T., Carlson, C.R. and Grønning-Wang, L.M. 2018. O-GlcNAc site-mapping of liver X receptor- α and O-GlcNAc transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **499**(2), pp.354–360.
- Farook, V.S., Bogardus, C. and Prochazka, M. 2002. Analysis of MGEA5 on 10q24.1–q24.3 encoding the β -O-linked N-acetylglucosaminidase as a candidate gene for type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Molecular Genetics and Metabolism*. **77**(1), pp.189–193.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. **61**(5), pp.759–767.
- Federici, M., Menghini, R., Mauriello, A., Hribal, M.L., Ferrelli, F., Lauro, D., Sbraccia, P., Spagnoli, L.G., Sesti, G. and Lauro, R. 2002. Insulin-Dependent Activation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Impaired by O-Linked Glycosylation Modification of Signaling Proteins in Human Coronary Endothelial Cells. *Circulation*. **106**(4), pp.466–472.
- Fei, P., Wang, W., Kim, S., Wang, S., Burns, T.F., Sax, J.K., Buzzai, M., Dicker, D.T., McKenna, W.G., Bernhard, E.J. and El-Deiry, W.S. 2004. Bnip3L is induced by p53 under hypoxia, and its knockdown promotes tumor growth. *Cancer Cell*. **6**(6), pp.597–609.
- Felder, T., Dunlap, R.B., Dix, D. and Spencer, T. 2002. Differences in natural ligand and fluoropyrimidine binding to human thymidylate synthase identified by transient-state spectroscopic and continuous variation methods. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1597**(1), pp.149–156.
- Femia, A.P., Dolara, P. and Caderni, G. 2004. Mucin-depleted foci (MDF) in the colon of rats treated with azoxymethane (AOM) are useful biomarkers for colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. **25**(2), pp.277–281.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. and Bray, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*. **136**(5), pp.E359–E386.

- Ferrannini, E. 1998. Insulin resistance versus insulin deficiency in non-insulin-dependent diabetes mellitus: problems and prospects. *Endocrine Reviews*. **19**(4), pp.477–490.
- Ferrara, P., Andermarcher, E., Bossis, G., Acquaviva, C., Brockly, F., Jariel-Encontre, I. and Piechaczyk, M. 2003. The structural determinants responsible for c-Fos protein proteasomal degradation differ according to the conditions of expression. *Oncogene*. **22**(10), pp.1461–1474.
- Ferrer, C.M., Lynch, T.P., Sodi, V.L., Falcone, J.N., Schwab, L.P., Peacock, D.L., Vocadlo, D.J., Seagroves, T.N. and Reginato, M.J. 2014. O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of HIF-1 pathway. *Molecular cell*. **54**(5), pp.820–831.
- Ferron, M., Denis, M., Persello, A., Rathagirishnan, R. and Lauzier, B. 2019. Protein O-GlcNAcylation in Cardiac Pathologies: Past, Present, Future. *Frontiers in Endocrinology*. **9**.
- Fesler, A., Liu, H. and Ju, J. 2017. Modified miR-15a has therapeutic potential for improving treatment of advanced stage colorectal cancer through inhibition of BCL2, BMI1, YAP1 and DCLK1. *Oncotarget*. **9**(2), pp.2367–2383.
- Finck, B.N. and Kelly, D.P. 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*. **116**(3), pp.615–622.
- Fischer, M. 2017. Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene*. **36**(28), pp.3943–3956.
- Fletcher, B.S., Dragstedt, C., Notterpek, L. and Nolan, G.P. 2002. Functional cloning of SPIN-2, a nuclear anti-apoptotic protein with roles in cell cycle progression. *Leukemia*. **16**(8), pp.1507–1518.
- Fong, J.J., Nguyen, B.L., Bridger, R., Medrano, E.E., Wells, L., Pan, S. and Sifers, R.N. 2012. β -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) is a novel regulator of mitosis-specific phosphorylations on histone H3. *The Journal of Biological Chemistry*. **287**(15), pp.12195–12203.
- Forsthoefel, A.M., Peña, M.M.O., Xing, Y.Y., Rafique, Z. and Berger, F.G. 2004. Structural determinants for the intracellular degradation of human thymidylate synthase. *Biochemistry*. **43**(7), pp.1972–1979.
- Forsythe, M.E., Love, D.C., Lazarus, B.D., Kim, E.J., Prinz, W.A., Ashwell, G., Krause, M.W. and Hanover, J.A. 2006. Caenorhabditis elegans ortholog of a diabetes susceptibility locus: oga-1 (O-GlcNAcase) knockout impacts O-GlcNAc cycling, metabolism, and dauer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **103**(32), pp.11952–11957.
- Fraczyk, T., Kubiński, K., Masłyk, M., Cieśla, J., Hellman, U., Shugar, D. and Rode, W. 2010. Phosphorylation of thymidylate synthase from various sources by human protein kinase CK2 and its catalytic subunits. *Bioorganic Chemistry*. **38**(3), pp.124–131.
- Frączyk, T., Ruman, T., Wilk, P., Palmowski, P., Rogowska-Wrzesinska, A., Cieśla, J., Zieliński, Z., Nizioł, J., Jarmuła, A., Maj, P., Gołos, B., Wińska, P., Ostafil, S., Wałajtys-Rode, E., Shugar, D. and Rode, W. 2015. Properties of phosphorylated thymidylate synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. **1854**(12), pp.1922–1934.
- Fraile, R.J., Baker, L.H., Buroker, T.R., Horwitz, J. and Vaitkevicius, V.K. 1980. Pharmacokinetics of 5-fluorouracil administered orally, by rapid intravenous and by slow infusion. *Cancer Research*. **40**(7), pp.2223–2228.
- Francipane, M.G. and Lagasse, E. 2013. Selective targeting of human colon cancer stem-like cells by the mTOR inhibitor Torin-1. *Oncotarget*. **4**(11), pp.1948–1962.
- Freudenheim, J.L., Graham, S., Marshall, J.R., Haughey, B.P. and Wilkinson, G. 1990. A case-control study of diet and rectal cancer in western New York. *American Journal of Epidemiology*. **131**(4), pp.612–624.
- Fricovsky, E.S., Suarez, J., Ihm, S.-H., Scott, B.T., Suarez-Ramirez, J.A., Banerjee, I., Torres-Gonzalez, M., Wang, H., Ellrott, I., Maya-Ramos, L., Villarreal, F. and Dillmann, W.H. 2012. Excess protein O-GlcNAcylation and the progression of diabetic cardiomyopathy. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. **303**(7), pp.R689–R699.
- Friedkin, M. and Roberts, D. 1956. Conversion of uracil deoxyriboside to thymidine of deoxyribonucleic acid. *The Journal of Biological Chemistry*. **220**(2), pp.653–660.
- Fu, Y., Yang, G., Zhu, F., Peng, C., Li, W., Li, H., Kim, H.-G., Bode, A.M., Dong, Z. and Dong, Z. 2014. Antioxidants decrease the apoptotic effect of 5-Fu in colon cancer by regulating Src-dependent caspase-7 phosphorylation. *Cell Death & Disease*. **5**(1), p.e983.
- Fuchs, T., Gavarini, S., Saunders-Pullman, R., Raymond, D., Ehrlich, M.E., Bressman, S.B. and Ozelius, L.J. 2009. Mutations in the THAP1 gene are responsible for DYT6 primary torsion dystonia. *Nature Genetics*. **41**(3), pp.286–288.

- Fuentes-García, G., Castañeda-Patlán, M.C., Vercoutter-Edouart, A.-S., Lefebvre, T. and Robles-Flores, M. 2019. O-GlcNAcylation Is Involved in the Regulation of Stem Cell Markers Expression in Colon Cancer Cells. *Frontiers in Endocrinology*. **10**.
- Fujii, R., Seshimo, A. and Kameoka, S. 2003. Relationships between the expression of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase, and orotate phosphoribosyltransferase and cell proliferative activity and 5-fluorouracil sensitivity in colorectal carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology*. **8**(2), pp.0072–0078.
- Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R.G., Kitagawa, H. and Kato, S. 2009. GlcNAcylation of a histone methyltransferase in retinoic-acid-induced granulopoiesis. *Nature*. **459**(7245), pp.455–459.
- Fujiki, R., Hashiba, W., Sekine, H., Yokoyama, A., Chikanishi, T., Ito, S., Imai, Y., Kim, J., He, H.H., Igarashi, K., Kanno, J., Ohtake, F., Kitagawa, H., Roeder, R.G., Brown, M. and Kato, S. 2011. GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature*. **480**(7378), pp.557–560.
- Gabay, M., Li, Y. and Felsher, D.W. 2014. MYC Activation Is a Hallmark of Cancer Initiation and Maintenance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. **4**(6).
- Gambetta, M.C. and Müller, J. 2014. O-GlcNAcylation Prevents Aggregation of the Polycomb Group Repressor Polyhomeotic. *Developmental Cell*. **31**(5), pp.629–639.
- Gambetta, M.C., Oktaba, K. and Müller, J. 2009. Essential Role of the Glycosyltransferase Sxc/Ogt in Polycomb Repression. *Science*. **325**(5936), pp.93–96.
- Gao, L., Shen, L., Yu, M., Ni, J., Dong, X., Zhou, Y. and Wu, S. 2014. Colon cancer cells treated with 5-fluorouracil exhibit changes in polylactosamine-type N-glycans. *Molecular Medicine Reports*. **9**(5), pp.1697–1702.
- Gao, Y., Miyazaki, J. and Hart, G.W. 2003. The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **415**(2), pp.155–163.
- Gao, Y., Wells, L., Comer, F.I., Parker, G.J. and Hart, G.W. 2001. Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NEUTRAL, CYTOSOLIC β -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE FROM HUMAN BRAIN. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(13), pp.9838–9845.
- Garrett, E.R., Hurst, G.H. and Green, J.R. 1977. Kinetics and mechanisms of drug action of microorganisms XXIII: microbial kinetic assay for fluorouracil in biological fluids and its application to human pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **66**(10), pp.1422–1429.
- Gazzaniga, P., Gradilone, A., Petracca, A., Nicolazzo, C., Raimondi, C., Iacovelli, R., Naso, G. and Cortesi, E. 2010. Molecular markers in circulating tumour cells from metastatic colorectal cancer patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **14**(8), pp.2073–2077.
- Geng, F., Zhu, W., Anderson, R.A., Leber, B. and Andrews, D.W. 2012. Multiple post-translational modifications regulate E-cadherin transport during apoptosis. *Journal of Cell Science*. **125**(11), pp.2615–2625.
- Gewinner, C., Hart, G., Zachara, N., Cole, R., Beisenherz-Huss, C. and Groner, B. 2004. The Coactivator of Transcription CREB-binding Protein Interacts Preferentially with the Glycosylated Form of Stat5. *Journal of Biological Chemistry*. **279**(5), pp.3563–3572.
- Giebel, B., Corbeil, D., Beckmann, J., Höhn, J., Freund, D., Giesen, K., Fischer, J., Kögler, G. and Wernet, P. 2004. Segregation of lipid raft markers including CD133 in polarized human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. **104**(8), pp.2332–2338.
- Giles, A.C., Desbois, M., Opperman, K.J., Tavora, R., Maroni, M.J. and Grill, B. 2019. A complex containing the O-GlcNAc transferase OGT-1 and the ubiquitin ligase EEL-1 regulates GABA neuron function. *Journal of Biological Chemistry*. **294**(17), pp.6843–6856.
- Gloster, T.M., Zandberg, W.F., Heinonen, J.E., Shen, D.L., Deng, L. and Vocadlo, D.J. 2011. Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nature chemical biology*. **7**(3), pp.174–181.
- Gmeiner, W.H., Reinhold, W.C. and Pommier, Y. 2010. Genome-wide mRNA and microRNA profiling of the NCI 60 cell-line screen and comparison of FdUMP[10] with fluorouracil, floxuridine, and topoisomerase 1 poisons. *Molecular Cancer Therapeutics*. **9**(12), pp.3105–3114.

- Godai, T., Suda, T., Sugano, N., Tsuchida, K., Shiozawa, M., Sekiguchi, H., Sekiyama, A., Yoshihara, M., Matsukuma, S., Sakuma, Y., Tsuchiya, E., Kameda, Y., Akaike, M. and Miyagi, Y. 2009. Identification of colorectal cancer patients with tumors carrying the TP53 mutation on the codon 72 proline allele that benefited most from 5-fluorouracil (5-FU) based postoperative chemotherapy. *BMC Cancer*. **9**, p.420.
- Goel, A., Arnold, C.N., Niedzwiecki, D., Carethers, J.M., Dowell, J.M., Wasserman, L., Compton, C., Mayer, R.J., Bertagnolli, M.M. and Boland, C.R. 2004. Frequent Inactivation of PTEN by Promoter Hypermethylation in Microsatellite Instability-High Sporadic Colorectal Cancers. *Cancer Research*. **64**(9), pp.3014–3021.
- Gokare, P., Finnberg, N.K., Abbosh, P.H., Dai, J., Murphy, M.E. and El-Deiry, W.S. 2017. P53 represses pyrimidine catabolic gene dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) expression in response to thymidylate synthase (TS) targeting. *Scientific Reports*. **7**.
- Golks, A., Tran, T.-T.T., Goetschy, J.F. and Guerini, D. 2007. Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *The EMBO journal*. **26**(20), pp.4368–4379.
- Gong, J., Cho, M. and Fakih, M. 2016. RAS and BRAF in metastatic colorectal cancer management. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. **7**(5), pp.687–704.
- Gradishar, W.J. and Vokes, E.E. 1990. 5-Fluorouracil cardiotoxicity: a critical review. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. **1**(6), pp.409–414.
- Graham, D.L., Gray, A.J., Joyce, J.A., Yu, D., O’Moore, J., Carlson, G.A., Shearman, M.S., Dellovade, T.L. and Hering, H. 2014. Increased O-GlcNAcylation reduces pathological tau without affecting its normal phosphorylation in a mouse model of tauopathy. *Neuropharmacology*. **79**, pp.307–313.
- de Gramont, A., Figer, A., Seymour, M., Homerin, M., Hmissi, A., Cassidy, J., Boni, C., Cortes-Funes, H., Cervantes, A., Freyer, G., Papamichael, D., Le Bail, N., Louvet, C., Hendler, D., de Braud, F., Wilson, C., Morvan, F. and Bonetti, A. 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **18**(16), pp.2938–2947.
- Greig, K.T., Antonchuk, J., Metcalf, D., Morgan, P.O., Krebs, D.L., Zhang, J.-G., Hacking, D.F., Bode, L., Robb, L., Kranz, C., de Graaf, C., Bahlo, M., Nicola, N.A., Nutt, S.L., Freeze, H.H., Alexander, W.S., Hilton, D.J. and Kile, B.T. 2007. Agm1/Pgm3-Mediated Sugar Nucleotide Synthesis Is Essential for Hematopoiesis and Development. *Molecular and Cellular Biology*. **27**(16), pp.5849–5859.
- Greis, K.D., Gibson, W. and Hart, G.W. 1994. Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (UL32) at serine 921 and serine 952. *Journal of Virology*. **68**(12), pp.8339–8349.
- Grenon, N.N. and Chan, J. 2009. Managing toxicities associated with colorectal cancer chemotherapy and targeted therapy: a new guide for nurses. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. **13**(3), pp.285–296.
- Griffith, L.S., Mathes, M. and Schmitz, B. 1995. Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Neuroscience Research*. **41**(2), pp.270–278.
- Griffith, L.S. and Schmitz, B. 1999. O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *European Journal of Biochemistry*. **262**(3), pp.824–831.
- Griffith, M., Mwenifumbo, J.C., Cheung, P.Y., Paul, J.E., Pugh, T.J., Tang, M.J., Chittaranjan, S., Morin, R.D., Asano, J.K., Ally, A.A., Miao, L., Lee, A., Chan, S.Y., Taylor, G., Severson, T., Hou, Y.-C., Griffith, O.L., Cheng, G.S.W., Novik, K., Moore, R., Luk, M., Owen, D., Brown, C.J., Morin, G.B., Gill, S., Tai, I.T. and Marra, M.A. 2013. Novel mRNA isoforms and mutations of uridine monophosphate synthetase and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer. *The Pharmacogenomics Journal*. **13**(2), pp.148–158.
- Grigorian, A., Lee, S.-U., Tian, W., Chen, I.-J., Gao, G., Mendelsohn, R., Dennis, J.W. and Demetriou, M. 2007. Control of T Cell-mediated autoimmunity by metabolite flux to N-glycan biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. **282**(27), pp.20027–20035.
- van Groeningen, C.J., Pinedo, H.M., Heddes, J., Kok, R.M., de Jong, A.P., Wattel, E., Peters, G.J. and Lankelma, J. 1988. Pharmacokinetics of 5-fluorouracil assessed with a sensitive mass

- spectrometric method in patients on a dose escalation schedule. *Cancer Research*. **48**(23), pp.6956–6961.
- Grogan, B.C., Parker, J.B., Guminski, A.F. and Stivers, J.T. 2011. Effect of Thymidylate Synthase Inhibitors on dUTP and TTP Pool Levels and the Activities of DNA Repair Glycosylases on Uracil and 5-Fluorouracil in DNA. *Biochemistry*. **50**(5), pp.618–627.
- Gross, B.J., Kraybill, B.C. and Walker, S. 2005. Discovery of O-GlcNAc Transferase Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*. **127**(42), pp.14588–14589.
- Gu, Y., Li, H., Zhao, L., Zhao, S., He, W., Rui, L., Su, C., Zheng, H. and Su, R. 2015. GRP78 confers the resistance to 5-FU by activating the c-Src/LSF/TS Axis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. **6**(32), pp.33658–33674.
- Gu, Y., Mi, W., Ge, Y., Liu, H., Fan, Q., Han, C., Yang, J., Han, F., Lu, X. and Yu, W. 2010. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Research*. **70**(15), pp.6344–6351.
- Guinez, C., Lemoine, J., Michalski, J.-C. and Lefebvre, T. 2004. 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **319**(1), pp.21–26.
- Guinez, C., Mir, A.-M., Dehennaut, V., Cacan, R., Harduin-Lepers, A., Michalski, J.-C. and Lefebvre, T. 2008. Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *The FASEB Journal*.
- Guinez, C., Mir, A.-M., Leroy, Y., Cacan, R., Michalski, J.-C. and Lefebvre, T. 2007. Hsp70-GlcNAc-binding activity is released by stress, proteasome inhibition, and protein misfolding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **361**(2), pp.414–420.
- Guo, H., Zhang, B., Nairn, A.V., Nagy, T., Moremen, K.W., Buckhaults, P. and Pierce, M. 2017. 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. *The Journal of Biological Chemistry*. **292**(10), pp.4123–4137.
- Guo, K., Gan, L., Zhang, S., Cui, F.J., Cun, W., Li, Y., Kang, N.X., Gao, M.D. and Liu, K.Y. 2012. Translocation of HSP27 into liver cancer cell nucleus may be associated with phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation. *Oncology Reports*. **28**(2), pp.494–500.
- Guo, X., Goessl, E., Jin, G., Collie-Duguid, E.S.R., Cassidy, J., Wang, W. and O'Brien, V. 2008. Cell Cycle Perturbation and Acquired 5-Fluorouracil Chemoresistance. *Anticancer Research*, p.6.
- Guo, X., Shang, J., Deng, Y., Yuan, X., Zhu, D. and Liu, H. 2015. Alterations in left ventricular function during intermittent hypoxia: Possible involvement of O-GlcNAc protein and MAPK signaling. *International Journal of Molecular Medicine*. **36**(1), pp.150–158.
- Guo, Y., Kotova, E., Chen, Z.-S., Lee, K., Hopper-Borge, E., Belinsky, M.G. and Kruh, G.D. 2003. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonyl-methoxyethyl)adenine. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**(32), pp.29509–29514.
- Gupta, R. and Brunak, S. 2002. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing. Pacific Symposium on Biocomputing*, pp.310–322.
- Gurcel, C., Vercoutter-Edouart, A.-S., Fonbonne, C., Mortuaire, M., Salvador, A., Michalski, J.-C. and Lemoine, J. 2008. Identification of new O-GlcNAc modified proteins using a click-chemistry-based tagging. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **390**(8), pp.2089–2097.
- Gustavsson, B., Kaiser, C., Carlsson, G., Wettergren, Y., Odin, E., Lindskog, E.B., Niyikiza, C. and Ma, D. 2009. Molecular determinants of efficacy for 5-FU-based treatments in advanced colorectal cancer: mRNA expression for 18 chemotherapy-related genes. *International Journal of Cancer*. **124**(5), pp.1220–1226.
- Guthals, A. and Bandeira, N. 2012. Peptide identification by tandem mass spectrometry with alternate fragmentation modes. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **11**(9), pp.550–557.
- Hagmann, J., Grob, M. and Burger, M.M. 1992. The cytoskeletal protein talin is O-glycosylated. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**(20), pp.14424–14428.
- Hahne, H., Sobotzki, N., Nyberg, T., Helm, D., Borodkin, V.S., van Aalten, D.M., Agnew, B. and Kuster, B. 2013. Proteome wide purification and identification of O-GlcNAc modified proteins using Click chemistry and mass spectrometry. *Journal of proteome research*. **12**(2), pp.927–936.

- Halim, A., Larsen, I.S.B., Neubert, P., Joshi, H.J., Petersen, B.L., Vakhrushev, S.Y., Strahl, S. and Clausen, H. 2015. Discovery of a nucleocytoplasmic O-mannose glycoproteome in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **112**(51), pp.15648–15653.
- Haltiwanger, R.S., Blomberg, M.A. and Hart, G.W. 1992. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**(13), pp.9005–9013.
- Haltiwanger, R.S., Holt, G.D. and Hart, G.W. 1990. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. **265**(5), pp.2563–2568.
- Hamaguchi, J., Nakagawa, H., Takahashi, M., Kudo, T., Kamiyama, N., Sun, B., Oshima, T., Sato, Y., Deguchi, K., Todo, S. and Nishimura, S.-I. 2007. Swainsonine reduces 5-fluorouracil tolerance in the multistage resistance of colorectal cancer cell lines. *Molecular Cancer*. **6**, p.58.
- Han, C., Gu, Y., Shan, H., Mi, W., Sun, J., Shi, M., Zhang, X., Lu, X., Han, F., Gong, Q. and Yu, W. 2017. O-GlcNAcylation of SIRT1 enhances its deacetylase activity and promotes cytoprotection under stress. *Nature Communications*. **8**.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **144**(5), pp.646–674.
- Hanover, J.A., Cohen, C.K., Willingham, M.C. and Park, M.K. 1987. O-linked N-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. Evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*. **262**(20), pp.9887–9894.
- Hanover, J.A., Forsythe, M.E., Hennessey, P.T., Brodigan, T.M., Love, D.C., Ashwell, G. and Krause, M. 2005. A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**(32), pp.11266–11271.
- Hanover, J.A., Yu, S., Lubas, W.B., Shin, S.H., Ragano-Caracciola, M., Kochran, J. and Love, D.C. 2003. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **409**(2), pp.287–297.
- Hanukoglu, I., Rapoport, R., Weiner, L. and Sklan, D. 1993. Electron Leakage from the Mitochondrial NADPH-Adrenodoxin Reductase-Adrenodoxin-P450_{scc} (Cholesterol Side Chain Cleavage) System. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **305**(2), pp.489–498.
- Hardeland, U., Bentele, M., Jiricny, J. and Schär, P. 2000. Separating Substrate Recognition from Base Hydrolysis in Human Thymine DNA Glycosylase by Mutational Analysis. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(43), pp.33449–33456.
- Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J. and Schär, P. 2002. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *The EMBO Journal*. **21**(6), pp.1456–1464.
- Hardivillé, S., Banerjee, P.S., Selen Alpergin, E.S., Smith, D.M., Han, G., Ma, J., Talbot, C.C., Hu, P., Wolfgang, M.J. and Hart, G.W. 2019. TATA-Box Binding Protein O-GlcNAcylation at T114 Regulates Formation of the B-TFIID Complex and Is Critical for Metabolic Gene Regulation. *Molecular Cell*.
- Hardivillé, S., Hoedt, E., Mariller, C., Benaïssa, M. and Pierce, A. 2010. O-GlcNAcylation/phosphorylation cycling at Ser10 controls both transcriptional activity and stability of delta-lactoferrin. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**(25), pp.19205–19218.
- Hardy, L.W., Finer-Moore, J.S., Montfort, W.R., Jones, M.O., Santi, D.V. and Stroud, R.M. 1987. Atomic structure of thymidylate synthase: target for rational drug design. *Science (New York, N.Y.)*. **235**(4787), pp.448–455.
- Harosh-Davidovich, S.B. and Khalaila, I. 2018. O-GlcNAcylation affects β -catenin and E-cadherin expression, cell motility and tumorigenicity of colorectal cancer. *Experimental Cell Research*. **364**(1), pp.42–49.
- Hart, G.W. and Akimoto, Y. 2009. The O-GlcNAc Modification *In*: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart and M. E. Etzler, eds. *Essentials of Glycobiology* [Online]. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. [Accessed 25 January 2020]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1954/>.

- Harwood, F.G., Kasibhatla, S., Petak, I., Vernes, R., Green, D.R. and Houghton, J.A. 2000. Regulation of FasL by NF- κ B and AP-1 in Fas-dependent Thymineless Death of Human Colon Carcinoma Cells. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(14), pp.10023–10029.
- Hatsell, S., Medina, L., Merola, J., Haltiwanger, R. and Cowin, P. 2003. Plakoglobin is O-glycosylated close to the N-terminal destruction box. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**(39), pp.37745–37752.
- Heart, E., Choi, W.S. and Sung, C.K. 2000. Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. **278**(1), pp.E103–112.
- Heath, J.M., Sun, Y., Yuan, K., Bradley, W.E., Litovsky, S., Dell'Italia, L.J., Chatham, J.C., Wu, H. and Chen, Y. 2014. Activation of AKT by O-GlcNAcylation Induces Vascular Calcification in Diabetes. *Circulation research*. **114**(7), pp.1094–1102.
- Hebert, L.F., Daniels, M.C., Zhou, J., Crook, E.D., Turner, R.L., Simmons, S.T., Neidigh, J.L., Zhu, J.S., Baron, A.D. and McClain, D.A. 1996. Overexpression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase in transgenic mice leads to insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. **98**(4), pp.930–936.
- Heckel, D., Comtesse, N., Brass, N., Blin, N., Zang, K.D. and Meese, E. 1998. Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Human Molecular Genetics*. **7**(12), pp.1859–1872.
- Heggie, G.D., Sommadossi, J.P., Cross, D.S., Huster, W.J. and Diasio, R.B. 1987. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Research*. **47**(8), pp.2203–2206.
- Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Plevin, E. and Scheiner, J. 1957. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*. **179**(4561), pp.663–666.
- Heidelberger, Charles, Leibman, K.C., Harbers, E. and Bhargava, P.M. 1957. The Comparative Utilization of Uracil-2-C14 by Liver, Intestinal Mucosa, and Flexner-Jobling Carcinoma in the Rat. *Cancer Research*. **17**(5), pp.399–404.
- Helin, K. 1998. Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development*. **8**(1), pp.28–35.
- Hendriks, I.A., D'Souza, R.C.J., Yang, B., Verlaan-de Vries, M., Mann, M. and Vertegaal, A.C.O. 2014. Uncovering Global SUMOylation Signaling Networks in a Site-Specific Manner. *Nature structural & molecular biology*. **21**(10), pp.927–936.
- Hennebicq-Reig, S., Lesuffleur, T., Capon, C., De Bolos, C., Kim, I., Moreau, O., Richet, C., Hémon, B., Recchi, M.A., Maës, E., Aubert, J.P., Real, F.X., Zweibaum, A., Delannoy, P., Degand, P. and Huet, G. 1998. Permanent exposure of mucin-secreting HT-29 cells to benzyl-N-acetyl-alpha-D-galactosaminide induces abnormal O-glycosylation of mucins and inhibits constitutive and stimulated MUC5AC secretion. *The Biochemical Journal*. **334 (Pt 1)**, pp.283–295.
- Henricks, L.M., Lunenburg, C.A., Meulendijks, D., Gelderblom, H., Cats, A., Swen, J.J., Schellens, J.H. and Guchelaar, H.-J. 2015. Translating DPYD genotype into DPD phenotype: using the DPYD gene activity score. *Pharmacogenomics*. **16**(11), pp.1275–1284.
- Hirumura, M., Choi, C.H., Sabourin, N.A., Jones, H., Bachvarov, D. and Usheva, A. 2003. YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosamylation (O-glcNAcylation). *The Journal of Biological Chemistry*. **278**(16), pp.14046–14052.
- Hirosawa, M., Hayakawa, K., Yoneda, C., Arai, D., Shiota, H., Suzuki, T., Tanaka, S., Dohmae, N. and Shiota, K. 2016. Novel O-GlcNAcylation on Ser(40) of canonical H2A isoforms specific to viviparity. *Scientific Reports*. **6**, p.31785.
- Hitre, E., Budai, B., Adleff, V., Czeglédi, F., Horváth, Z., Gyergyay, F., Lövey, J., Kovács, T., Orosz, Z., Láng, I., Kásler, M. and Kralovánszky, J. 2005. Influence of thymidylate synthase gene polymorphisms on the survival of colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Pharmacogenetics and Genomics*. **15**(10), pp.723–730.
- Hlavata, I., Mohelnikova-Duchonova, B., Vaclavikova, R., Liska, V., Pitule, P., Novak, P., Bruha, J., Vycital, O., Holubec, L., Treska, V., Vodicka, P. and Soucek, P. 2012. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis*. **27**(2), pp.187–196.

- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.-L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. 2002. *RAD6*-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*. **419**(6903), pp.135–141.
- Hollstein, M., Rice, K., Greenblatt, M.S., Soussi, T., Fuchs, R., Sørli, T., Hovig, E., Smith-Sørensen, B., Montesano, R. and Harris, C.C. 1994. Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Research*. **22**(17), pp.3551–3555.
- Holt, G.D., Haltiwanger, R.S., Torres, C.R. and Hart, G.W. 1987. Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1. *The Journal of Biological Chemistry*. **262**(31), pp.14847–14850.
- Holt, G.D. and Hart, G.W. 1986. The subcellular distribution of terminal N-acetylglucosamine moieties. Localization of a novel protein-saccharide linkage, O-linked GlcNAc. *The Journal of Biological Chemistry*. **261**(17), pp.8049–8057.
- Holt, G.D., Snow, C.M., Senior, A., Haltiwanger, R.S., Gerace, L. and Hart, G.W. 1987. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *The Journal of Cell Biology*. **104**(5), pp.1157–1164.
- Hori, T., Takahashi, E., Ayusawa, D., Takeishi, K., Kaneda, S. and Seno, T. 1990. Regional assignment of the human thymidylate synthase (TS) gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ hybridization. *Human Genetics*. **85**(6), pp.576–580.
- Horie, N., Aiba, H., Oguro, K., Hojo, H. and Takeishi, K. 1995. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Structure and Function*. **20**(3), pp.191–197.
- Horie, N. and Takeishi, K. 1997. Identification of functional elements in the promoter region of the human gene for thymidylate synthase and nuclear factors that regulate the expression of the gene. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**(29), pp.18375–18381.
- Hotchkiss, K.A., Ashton, A.W. and Schwartz, E.L. 2003. Thymidine phosphorylase and 2-deoxyribose stimulate human endothelial cell migration by specific activation of the integrins alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**(21), pp.19272–19279.
- Houghton, J.A., Harwood, F.G. and Tillman, D.M. 1997. Thymineless death in colon carcinoma cells is mediated via Fas signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **94**(15), pp.8144–8149.
- Housley, M.P., Udeshi, N.D., Rodgers, J.T., Shabanowitz, J., Puigserver, P., Hunt, D.F. and Hart, G.W. 2009. A PGC-1 α -O-GlcNAc Transferase Complex Regulates FoxO Transcription Factor Activity in Response to Glucose. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(8), pp.5148–5157.
- Howlander A, N., Noone, A., Krapcho, M., Miller, D., Bishop, K., Kosary, C., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D., Chen, H., Feuer, E. and Cronin, K. 2017. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Available from: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017.
- Hu, P., Berkowitz, P., Madden, V.J. and Rubenstein, D.S. 2006. Stabilization of plakoglobin and enhanced keratinocyte cell-cell adhesion by intracellular O-glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry*. **281**(18), pp.12786–12791.
- Hu, Y., Belke, D., Suarez, J., Swanson, E., Clark, R., Hoshijima, M. and Dillmann, W.H. 2005. Adenovirus-mediated overexpression of O-GlcNAcase improves contractile function in the diabetic heart. *Circulation Research*. **96**(9), pp.1006–1013.
- Hu, Y., Riesland, L., Paterson, A.J. and Kudlow, J.E. 2004. Phosphorylation of mouse glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFAT2) by cAMP-dependent protein kinase increases the enzyme activity. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**(29), pp.29988–29993.
- Hu, Yong, Suarez, J., Fricovsky, E., Wang, H., Scott, B.T., Trauger, S.A., Han, W., Hu, Ying, Oyeleye, M.O. and Dillmann, W.H. 2009. Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(1), pp.547–555.
- Huang, E.H., Hynes, M.J., Zhang, T., Ginestier, C., Dontu, G., Appelman, H., Fields, J.Z., Wicha, M.S. and Boman, B.M. 2009. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Research*. **69**(8), pp.3382–3389.

- Huang, X., Pan, Q., Sun, D., Chen, W., Shen, A., Huang, M., Ding, J. and Geng, M. 2013. O-GlcNAcylation of Cofilin Promotes Breast Cancer Cell Invasion. *The Journal of Biological Chemistry*. **288**(51), pp.36418–36425.
- Hunter, T. 2007. The Age of Crosstalk: Phosphorylation, Ubiquitination, and Beyond. *Molecular Cell*. **28**(5), pp.730–738.
- Hwang, I.T., Chung, Y.M., Kim, J.J., Chung, J.S., Kim, B.S., Kim, H.J., Kim, J.S. and Yoo, Y.D. 2007. Drug resistance to 5-FU linked to reactive oxygen species modulator 1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **359**(2), pp.304–310.
- Hwang, P.M., Bunz, F., Yu, J., Rago, C., Chan, T.A., Murphy, M.P., Kelso, G.F., Smith, R.A.J., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. 2001. Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Nature medicine*. **7**(10), pp.1111–1117.
- Iacopetta, B., Grieu, F., Joseph, D. and Elsaleh, H. 2001. A polymorphism in the enhancer region of the thymidylate synthase promoter influences the survival of colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil. *British Journal of Cancer*. **85**(6), pp.827–831.
- Ichikawa, W., Ooyama, A., Toda, E., Sugimoto, Y., Oka, T., Takahashi, T., Shimizu, M., Sasaki, Y. and Hirayama, R. 2006. Gene expression of ferredoxin reductase predicts outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated by 5-fluorouracil plus leucovorin. - PubMed - NCBI. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. **58**(6), pp.794–801.
- Ikushima, H. and Miyazono, K. 2010. TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nature Reviews Cancer*. **10**(6), p.415.
- Imazu, T., Shimizu, S., Tagami, S., Matsushima, M., Nakamura, Y., Miki, T., Okuyama, A. and Tsujimoto, Y. 1999. Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (Bnip3L) interacts with Bcl-2/Bcl-xL and induces apoptosis by altering mitochondrial membrane permeability. *Oncogene*. **18**(32), p.4523.
- Inoue, D., Fujino, T., Sheridan, P., Zhang, Y.-Z., Nagase, R., Horikawa, S., Li, Z., Matsui, H., Kanai, A., Saika, M., Yamaguchi, R., Kozuka-Hata, H., Kawabata, K.C., Yokoyama, A., Goyama, S., Inaba, T., Imoto, S., Miyano, S., Xu, M., Yang, F.-C., Oyama, M. and Kitamura, T. 2018. A novel ASXL1-OGT axis plays roles in H3K4 methylation and tumor suppression in myeloid malignancies. *Leukemia*. **32**(6), pp.1327–1337.
- Inoue, Y., Moriwaki, K., Ueda, Y., Takeuchi, T., Higuchi, K. and Asahi, M. 2018. Elevated O-GlcNAcylation stabilizes FOXM1 by its reduced degradation through GSK-3 β inactivation in a human gastric carcinoma cell line, MKN45 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **495**(2), pp.1681–1687.
- Ishikawa, M., Miyauchi, T. and Kashiwagi, Y. 2008. Clinical implications of thymidylate synthetase, dihydropyrimidine dehydrogenase and orotate phosphoribosyl transferase activity levels in colorectal carcinoma following radical resection and administration of adjuvant 5-FU chemotherapy. *BMC Cancer*. **8**(1), p.188.
- Ishimura, E., Nakagawa, T., Moriwaki, K., Hirano, S., Matsumori, Y. and Asahi, M. 2017. Augmented O-GlcNAcylation of AMP-activated kinase promotes the proliferation of LoVo cells, a colon cancer cell line. *Cancer Science*.
- Islam, Z., Gurevic, I., Strutzenberg, T.S., Ghosh, A.K., Iqbal, T. and Kohen, A. 2018. Bacterial versus human thymidylate synthase: Kinetics and functionality. *PLoS ONE*. **13**(5).
- Isono, T. 2011. O-GlcNAc-specific antibody CTD110.6 cross-reacts with N-GlcNAc2-modified proteins induced under glucose deprivation. *PLoS One*. **6**(4), p.e18959.
- Isshi, K., Sakuyama, T., Gen, T., Nakamura, Y., Kuroda, T., Katuyama, T. and Maekawa, Y. 2002. Predicting 5-FU sensitivity using human colorectal cancer specimens: comparison of tumor dihydropyrimidine dehydrogenase and orotate phosphoribosyl transferase activities with in vitro chemosensitivity to 5-FU. *International Journal of Clinical Oncology*. **7**(6), pp.335–342.
- Issop, Y., Hathazi, D., Khan, M.M., Rudolf, R., Weis, J., Spendiff, S., Slater, C.R., Roos, A. and Lochmüller, H. 2018. GFPT1 deficiency in muscle leads to myasthenia and myopathy in mice. *Human Molecular Genetics*. **27**(18), pp.3218–3232.
- Itkonen, H.M., Minner, S., Guldvik, I.J., Sandmann, M.J., Tsourlakis, M.C., Berge, V., Svindland, A., Schlomm, T. and Mills, I.G. 2013. O-GlcNAc Transferase Integrates Metabolic Pathways to Regulate the Stability of c-MYC in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*. **73**(16), pp.5277–5287.

- Ivanetich, K.M. and Santi, D.V. 1990. Bifunctional thymidylate synthase-dihydrofolate reductase in protozoa. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **4**(6), pp.1591–1597.
- Iwaizumi, M., Tseng-Rogenski, S. and Carethers, J.M. 2013. Acidic tumor microenvironment downregulates hMLH1 but does not diminish 5-fluorouracil chemosensitivity. *Mutation research*. **0**, pp.19–27.
- Iwaizumi, M., Tseng-Rogenski, S. and Carethers, J.M. 2011. DNA mismatch repair proficiency executing 5-fluorouracil cytotoxicity in colorectal cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*. **12**(8), pp.756–764.
- Iyer, S.P.N., Akimoto, Y. and Hart, G.W. 2003. Identification and cloning of a novel family of coiled-coil domain proteins that interact with O-GlcNAc transferase. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**(7), pp.5399–5409.
- Jain, M., Cook, G.M., Davis, F.G., Grace, M.G., Howe, G.R. and Miller, A.B. 1980. A case-control study of diet and colo-rectal cancer. *International Journal of Cancer*. **26**(6), pp.757–768.
- Janardhan, A., Kathera, C., Darsi, A., Ali, W., He, L., Yang, Y., Luo, L. and Guo, Z. 2018. Prominent role of histone lysine demethylases in cancer epigenetics and therapy. *Oncotarget*. **9**(76), pp.34429–34448.
- Janetzko, J., Trauger, S.A., Lazarus, M.B. and Walker, S. 2016. How the glycosyltransferase OGT catalyzes amide bond cleavage. *Nature chemical biology*. **12**(11), pp.899–901.
- Janetzko, J. and Walker, S. 2014. The making of a sweet modification: structure and function of O-GlcNAc transferase. *The Journal of Biological Chemistry*. **289**(50), pp.34424–34432.
- Jang, I., Kim, H.B., Seo, H., Kim, J.Y., Choi, H., Yoo, J.S., Kim, J. and Cho, J.W. 2015. O-GlcNAcylation of eIF2 α regulates the phospho-eIF2 α -mediated ER stress response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **1853**(8), pp.1860–1869.
- Jansen, W.J., Zwart, B., Hulscher, S.T., Giaccone, G., Pinedo, H.M. and Boven, E. 1997. CPT-11 in human colon-cancer cell lines and xenografts: characterization of cellular sensitivity determinants. *International Journal of Cancer*. **70**(3), pp.335–340.
- Jarmuła, A., Frączyk, T., Cieplak, P. and Rode, W. 2010. Mechanism of influence of phosphorylation on serine 124 on a decrease of catalytic activity of human thymidylate synthase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **18**(10), pp.3361–3370.
- Jenh, C.H., Geyer, P.K. and Johnson, L.F. 1985. Control of thymidylate synthase mRNA content and gene transcription in an overproducing mouse cell line. *Molecular and Cellular Biology*. **5**(10), pp.2527–2532.
- Jensen, S.A., Vainer, B. and Sørensen, J.B. 2006. The prognostic significance of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer of 303 patients adjuvantly treated with 5-fluorouracil. - Recherche Google. *International Journal of Cancer*. **120**(3), pp.694–701.
- Ji, D., Zhan, T., Li, M., Yao, Y., Jia, J., Yi, H., Qiao, M., Xia, J., Zhang, Z., Ding, H., Song, C., Han, Y. and Gu, J. 2018. Enhancement of Sensitivity to Chemo/Radiation Therapy by Using miR-15b against DCLK1 in Colorectal Cancer. *Stem Cell Reports*. **11**(6), pp.1506–1522.
- Jia, C., Zuo, Y. and Zou, Q. 2018. O-GlcNAcPRED-II: an integrated classification algorithm for identifying O-GlcNAcylation sites based on fuzzy undersampling and a K-means PCA oversampling technique. *Bioinformatics (Oxford, England)*. **34**(12), pp.2029–2036.
- Jia, C.-Z., Liu, T. and Wang, Z.-P. 2013. O-GlcNAcPRED: a sensitive predictor to capture protein O-GlcNAcylation sites. *Molecular bioSystems*. **9**(11), pp.2909–2913.
- Jiang, S., Chen, Y., Wang, M., Yin, Y., Pan, Y., Gu, B., Yu, G., Li, Y., Wong, B.H.C., Liang, Y. and Sun, H. 2012. A novel lectin from *Agrocybe aegerita* shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine. *The Biochemical Journal*. **443**(2), pp.369–378.
- Jin, Z. and El-Deiry, W.S. 2005. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*. **4**(2), pp.139–163.
- Jínek, M., Rehwinkel, J., Lazarus, B.D., Izaurralde, E., Hanover, J.A. and Conti, E. 2004. The superhelical TPR-repeat domain of O-linked GlcNAc transferase exhibits structural similarities to importin alpha. *Nature Structural & Molecular Biology*. **11**(10), pp.1001–1007.
- Jochmann, R., Pfannstiel, J., Chudasama, P., Kuhn, E., Konrad, A. and Stürzl, M. 2013. O-GlcNAc transferase inhibits KSHV propagation and modifies replication relevant viral proteins as detected by systematic O-GlcNAcylation analysis. *Glycobiology*. **23**(10), pp.1114–1130.

- Johnson, B., Opimba, M. and Bernier, J. 2014. Implications of the O-GlcNAc modification in the regulation of nuclear apoptosis in T cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1840**(1), pp.191–198.
- Johnson, L.F. 1994. Posttranscriptional regulation of thymidylate synthase gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry*. **54**(4), pp.387–392.
- Johnston, P.G., Lenz, H.J., Leichman, C.G., Danenberg, K.D., Allegra, C.J., Danenberg, P.V. and Leichman, L. 1995. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Research*. **55**(7), pp.1407–1412.
- Joiner, C.M., Levine, Z.G., Aonbangkhen, C., Woo, C.M. and Walker, S. 2019. Aspartate Residues Far from the Active Site Drive O-GlcNAc Transferase Substrate Selection. *Journal of the American Chemical Society*. **141**(33), pp.12974–12978.
- Jones, S.P., Zachara, N.E., Ngoh, G.A., Hill, B.G., Teshima, Y., Bhatnagar, A., Hart, G.W. and Marbán, E. 2008. Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. *Circulation*. **117**(9), pp.1172–1182.
- Julien, E. and Herr, W. 2003. Proteolytic processing is necessary to separate and ensure proper cell growth and cytokinesis functions of HCF-1. *The EMBO Journal*. **22**(10), pp.2360–2369.
- Kaasik, K., Kivimäe, S., Allen, J.J., Chalkley, R.J., Huang, Y., Baer, K., Kissel, H., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., Ptáček, L.J. and Fu, Y.-H. 2013. Glucose Sensor O-GlcNAcylation Coordinates with Phosphorylation to Regulate Circadian Clock. *Cell Metabolism*. **17**(2), pp.291–302.
- Kakade, P.S., Budnar, S., Kalraiya, R.D. and Vaidya, M.M. 2016. Functional Implications of O-GlcNAcylation-dependent Phosphorylation at a Proximal Site on Keratin 18. *The Journal of Biological Chemistry*. **291**(23), pp.12003–12013.
- Kaleem, A., Hoessli, D.C., Ahmad, I., Walker-Nasir, E., Nasim, A., Shakoory, A.R. and Nasir-ud-Din, null 2008. Immediate-early gene regulation by interplay between different post-translational modifications on human histone H3. *Journal of Cellular Biochemistry*. **103**(3), pp.835–851.
- Kamburov, A., Lawrence, M.S., Polak, P., Leshchiner, I., Lage, K., Golub, T.R., Lander, E.S. and Getz, G. 2015. Comprehensive assessment of cancer missense mutation clustering in protein structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **112**(40), pp.E5486-5495.
- Kamemura, K., Hayes, B.K., Comer, F.I. and Hart, G.W. 2002. 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. *Journal of Biological Chemistry*. **277**(21), pp.19229–19235.
- Kandioler, D., Mittlböck, M., Kappel, S., Puhalla, H., Herbst, F., Langner, C., Wolf, B., Tschmelitsch, J., Schippinger, W., Steger, G., Hofbauer, F., Samonigg, H., Gnant, M., Teleky, B. and Kühner, I. 2015. TP53 Mutational Status and Prediction of Benefit from Adjuvant 5-Fluorouracil in Stage III Colon Cancer Patients. *EBioMedicine*. **2**(8), pp.825–830.
- Kaneda, A. and Yagi, K. 2011. Two groups of DNA methylation markers to classify colorectal cancer into three epigenotypes. *Cancer Science*. **102**(1), pp.18–24.
- Kaneda, S., Nalbantoglu, J., Takeishi, K., Shimizu, K., Gotoh, O., Seno, T. and Ayusawa, D. 1990. Structural and functional analysis of the human thymidylate synthase gene. *The Journal of Biological Chemistry*. **265**(33), pp.20277–20284.
- Kang, E.-S., Han, D., Park, J., Kwak, T.K., Oh, M.-A., Lee, S.-A., Choi, S., Park, Z.Y., Kim, Y. and Lee, J.W. 2008. O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic beta cells. *Experimental Cell Research*. **314**(11–12), pp.2238–2248.
- Kang, K.A., Piao, M.J., Kim, K.C., Kang, H.K., Chang, W.Y., Park, I.C., Keum, Y.S., Surh, Y.J. and Hyun, J.W. 2014. Epigenetic modification of Nrf2 in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells: involvement of TET-dependent DNA demethylation. *Cell Death & Disease*. **5**(4), p.e1183.
- Kang, K.A., Piao, M.J., Ryu, Y.S., Kang, H.K., Chang, W.Y., Keum, Y.S. and Hyun, J.W. 2016. Interaction of DNA demethylase and histone methyltransferase upregulates Nrf2 in 5-fluorouracil-resistant colon cancer cells. *Oncotarget*. **7**(26), pp.40594–40620.
- Kanwal, S., Fardini, Y., Pagesy, P., N'tumba-Byn, T., Pierre-Eugène, C., Masson, E., Hampe, C. and Issad, T. 2013. O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor α expression and

- confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PLoS One*. **8**(7), p.e69150.
- Kapuria, V., Röhrig, U.F., Bhuiyan, T., Borodkin, V.S., van Aalten, D.M.F., Zoete, V. and Herr, W. 2016. Proteolysis of HCF-1 by Ser/Thr glycosylation-incompetent O-GlcNAc transferase:UDP-GlcNAc complexes. *Genes & Development*. **30**(8), pp.960–972.
- Kasahara, M., Takahashi, Y., Nagata, T., Asai, S., Eguchi, T., Ishii, Y., Fujii, M. and Ishikawa, K. 2000. Thymidylate Synthase Expression Correlates Closely with E2F1 Expression in Colon Cancer. *Clinical Cancer Research*. **6**(7), pp.2707–2711.
- Kasibhatla, S., Brunner, T., Genestier, L., Echeverri, F., Mahboubi, A. and Green, D.R. 1998. DNA Damaging Agents Induce Expression of Fas Ligand and Subsequent Apoptosis in T Lymphocytes via the Activation of NF- κ B and AP-1. *Molecular Cell*. **1**(4), pp.543–551.
- Kawakami, K., Salonga, D., Park, J.M., Danenberg, K.D., Uetake, H., Brabender, J., Omura, K., Watanabe, G. and Danenberg, P.V. 2001. Different Lengths of a Polymorphic Repeat Sequence in the Thymidylate Synthase Gene Affect Translational Efficiency but Not Its Gene Expression. *Clinical Cancer Research*. **7**(12), pp.4096–4101.
- Kawakami, K. and Watanabe, G. 2003. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. *Cancer Research*. **63**(18), pp.6004–6007.
- Kawamura Harukiyo, Yokote Koutaro, Asaumi Sunao, Kobayashi Kazuki, Fujimoto Masaki, Maezawa Yoshiro, Saito Yasushi and Mori Seijiro 2004. High Glucose-Induced Upregulation of Osteopontin Is Mediated via Rho/Rho Kinase Pathway in Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **24**(2), pp.276–281.
- Kazemi, Z., Chang, H., Haserodt, S., McKen, C. and Zachara, N.E. 2010. O-Linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Regulates Stress-induced Heat Shock Protein Expression in a GSK-3 β -dependent Manner. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**(50), pp.39096–39107.
- Kearse, K.P. and Hart, G.W. 1991. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88**(5), pp.1701–1705.
- Kebede, M., Ferdaoussi, M., Mancini, A., Alquier, T., Kulkarni, R.N., Walker, M.D. and Poitout, V. 2012. Glucose activates free fatty acid receptor 1 gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent O-GlcNAcylation of pancreas-duodenum homeobox-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**(7), pp.2376–2381.
- Keembiyehetty, C.N., Krzeslak, A., Love, D.C. and Hanover, J.A. 2011. A lipid-droplet-targeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *Journal of Cell Science*. **124**(16), pp.2851–2860.
- Kelly, W.G., Dahmus, M.E. and Hart, G.W. 1993. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *The Journal of Biological Chemistry*. **268**(14), pp.10416–10424.
- Kelly, W.G. and Hart, G.W. 1989. Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in *Drosophila* chromatin. *Cell*. **57**(2), pp.243–251.
- Kettenbach, A.N., Schweppe, D.K., Faherty, B.K., Pechenick, D., Pletnev, A.A. and Gerber, S.A. 2011. Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. *Science Signaling*. **4**(179), p.rs5.
- Khidekel, N., Ficarro, S.B., Clark, P.M., Bryan, M.C., Swaney, D.L., Rexach, J.E., Sun, Y.E., Coon, J.J., Peters, E.C. and Hsieh-Wilson, L.C. 2007. Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nature Chemical Biology*. **3**(6), pp.339–348.
- Ki, S.S., Jeong, J.M., Kim, S.H., Jeong, S.H., Lee, J.H., Han, C.J., Kim, Y.C., Lee, J.O. and Hong, Y.J. 2002. A Case of Neurotoxicity Following 5-Fluorouracil-based Chemotherapy. *The Korean Journal of Internal Medicine*. **17**(1), pp.73–77.
- Kim, E.J. 2011. Chemical Arsenal for the Study of O-GlcNAc. *Molecules*. **16**(3), pp.1987–2022.
- Kim, E.J., Amorelli, B., Abdo, M., Thomas, C.J., Love, D.C., Knapp, S. and Hanover, J.A. 2007. Distinctive Inhibition of O-GlcNAcase Isoforms by an α -GlcNAc Thiolsulfonate. *Journal of the American Chemical Society*. **129**(48), pp.14854–14855.

- Kim, E.-J., Kang, G.-J., Kang, J.-I., Boo, H.-J., Hyun, J.W., Koh, Y.S., Chang, W.-Y., Kim, Y.R., Kwon, J.-M., Maeng, Y.H., Yoo, E.-S., Lee, C.H. and Kang, H.-K. 2018. Over-activation of AKT signaling leading to 5-Fluorouracil resistance in SNU-C5/5-FU cells. *Oncotarget*. **9**(28), pp.19911–19928.
- Kim, H.J., Jo, M.J., Kim, B.R., Kim, J.L., Jeong, Y.A., Na, Y.J., Park, S.H., Lee, S., Lee, D.-H., Lee, H.S., Kim, B., Lee, S.I., Min, B.W., Yoo, Y.D. and Oh, S.C. 2017. Reactive oxygen species modulator-1 (Romo1) predicts unfavorable prognosis in colorectal cancer patients. *PLoS ONE*. **12**(5).
- Kim, H.S., Woo, J.S., Joo, H.J. and Moon, W.K. 2012. Cardiac Transcription Factor Nkx2.5 Is Downregulated under Excessive O-GlcNAcylation Condition. *PLoS ONE*. **7**(6).
- Kim, N.-G., Rhee, H., Li, L.S., Kim, Hyunki, Lee, J.-S., Kim, J.-H., Kim, N.K. and Kim, Hoguen 2002. Identification of *MARCKS*, *FLJ11383* and *TAF1B* as putative novel target genes in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Oncogene*. **21**(33), pp.5081–5087.
- Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., Harper, J.W. and Gygi, S.P. 2011. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Molecular Cell*. **44**(2), pp.325–340.
- Kim, Y.-H., Song, M., Oh, Y.-S., Heo, K., Choi, J.-W., Park, J.-M., Kim, S.-H., Lim, S., Kwon, H.M., Ryu, S.H. and Suh, P.-G. 2006. Inhibition of phospholipase C-beta1-mediated signaling by O-GlcNAc modification. *Journal of Cellular Physiology*. **207**(3), pp.689–696.
- Kirklin, J.W., Dockerty, M.B. and Waugh, J.M. 1949. The role of the peritoneal reflection in the prognosis of carcinoma of the rectum and sigmoid colon. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*. **88**(3), pp.326–331.
- Kitchens, M.E., Forsthoefel, A.M., Barbour, K.W., Spencer, H.T. and Berger, F.G. 1999. Mechanisms of acquired resistance to thymidylate synthase inhibitors: the role of enzyme stability. *Molecular Pharmacology*. **56**(5), pp.1063–1070.
- Kitchens, M.E., Forsthoefel, A.M., Rafique, Z., Spencer, H.T. and Berger, F.G. 1999. Ligand-mediated induction of thymidylate synthase occurs by enzyme stabilization. Implications for autoregulation of translation. *The Journal of Biological Chemistry*. **274**(18), pp.12544–12547.
- Klammer, M., Kaminski, M., Zedler, A., Oppermann, F., Blencke, S., Marx, S., Müller, S., Tebbe, A., Godl, K. and Schaab, C. 2012. Phosphosignature predicts dasatinib response in non-small cell lung cancer. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **11**(9), pp.651–668.
- Klein, A.L., Berkaw, M.N., Buse, M.G. and Ball, L.E. 2009. O-linked N-acetylglucosamine modification of insulin receptor substrate-1 occurs in close proximity to multiple SH2 domain binding motifs. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **8**(12), pp.2733–2745.
- Knapp, S., Voadlo, D., Gao, Z., Kirk, B., Lou, J. and Withers, S.G. 1996. NAG-thiazoline, An N-Acetyl- β -hexosaminidase Inhibitor That Implicates Acetamido Participation. *Journal of the American Chemical Society*. **118**(28), pp.6804–6805.
- Kneass, Z.T. and Marchase, R.B. 2005. Protein O-GlcNAc modulates motility-associated signaling intermediates in neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**(15), pp.14579–14585.
- Kobayashi, Y., Ohshiro, N., Sakai, R., Ohbayashi, M., Kohyama, N. and Yamamoto, T. 2005. Transport mechanism and substrate specificity of human organic anion transporter 2 (hOat2 [SLC22A7]). *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **57**(5), pp.573–578.
- Konishi, T., Sasaki, S., Watanabe, T., Kitayama, J. and Nagawa, H. 2005. Overexpression of hRFI (human ring finger homologous to inhibitor of apoptosis protein type) inhibits death receptor-mediated apoptosis in colorectal cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. **4**(5), pp.743–750.
- Konishi, T., Sasaki, S., Watanabe, T., Kitayama, J. and Nagawa, H. 2006. Overexpression of hRFI inhibits 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells via activation of NF- κ B and upregulation of BCL-2 and BCL-XL. *Oncogene*. **25**(22), p.3160.
- Konrad, R.J., Zhang, F., Hale, J.E., Knierman, M.D., Becker, G.W. and Kudlow, J.E. 2002. Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **293**(1), pp.207–212.
- Kornfeld, R. 1967. Studies on L-glutamine D-fructose 6-phosphate amidotransferase. I. Feedback inhibition by uridine diphosphate-N-acetylglucosamine. *The Journal of Biological Chemistry*. **242**(13), pp.3135–3141.
- Kornmann, M., Schwabe, W., Sander, S., Kron, M., Sträter, J., Polat, S., Kettner, E., Weiser, H.F., Baumann, W., Schramm, H., Häusler, P., Ott, K., Behnke, D., Staib, L., Beger, H.G. and Link, K.H.

2003. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. **9**(11), pp.4116–4124.
- Koshiji, M., Adachi, Y., Taketani, S., Takeuchi, K., Hioki, K. and Ikehara, S. 1997. Mechanisms underlying apoptosis induced by combination of 5-fluorouracil and interferon-gamma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **240**(2), pp.376–381.
- Kovacs, I. and Lindermayr, C. 2013. Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science*. **4**.
- Kreppel, L.K., Blomberg, M.A. and Hart, G.W. 1997. Dynamic Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins CLONING AND CHARACTERIZATION OF A UNIQUE O-GlcNAc TRANSFERASE WITH MULTIPLE TETRATRICOPEPTIDE REPEATS. *Journal of Biological Chemistry*. **272**(14), pp.9308–9315.
- Kreppel, L.K. and Hart, G.W. 1999. Regulation of a Cytosolic and Nuclear O-GlcNAc Transferase ROLE OF THE TETRATRICOPEPTIDE REPEATS. *Journal of Biological Chemistry*. **274**(45), pp.32015–32022.
- Kristensen, M.H., Weidinger, M., Bzorek, M., Pedersen, P.L. and Mejer, J. 2010. Correlation between thymidylate synthase gene variants, RNA and protein levels in primary colorectal adenocarcinomas. *The Journal of International Medical Research*. **38**(2), pp.484–497.
- Krześlak, A., Wójcik-Krowiranda, K., Forma, E., Bieńkiewicz, A. and Bryś, M. 2012. Expression of genes encoding for enzymes associated with O-GlcNAcylation in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations. *Ginekologia Polska*. **83**(1), pp.22–26.
- Kugimiya, N., Nishimoto, A., Hosoyama, T., Ueno, K., Enoki, T., Li, T.-S. and Hamano, K. 2015. The c-MYC-ABCB5 axis plays a pivotal role in 5-fluorouracil resistance in human colon cancer cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **19**(7), pp.1569–1581.
- Kuilenburg, A.B.P. van, Dobritzsch, D., Meinsma, R., Haasjes, J., Waterham, H.R., Nowaczyk, M.J.M., Maropoulos, G.D., Hein, G., Kalhoff, H., Kirk, J.M., Baaske, H., Aukett, A., Duley, J.A., Ward, K.P., Lindqvist, Y. and Gennip, A.H. van 2002. Novel disease-causing mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted by analysis of the three-dimensional protein structure. *Biochemical Journal*. **364**(1), pp.157–163.
- Kunicka, T., Prochazka, P., Krus, I., Bendova, P., Protivova, M., Susova, S., Hlavac, V., Liska, V., Novak, P., Schneiderova, M., Pitule, P., Bruha, J., Vycital, O., Vodicka, P. and Soucek, P. 2016. Molecular profile of 5-fluorouracil pathway genes in colorectal carcinoma. *BMC Cancer*. **16**.
- Kunz, C., Focke, F., Saito, Y., Schuermann, D., Lettieri, T., Selfridge, J. and Schär, P. 2009. Base Excision by Thymine DNA Glycosylase Mediates DNA-Directed Cytotoxicity of 5-Fluorouracil. *PLoS Biology*. **7**(4), p.e1000091.
- Kuo, S.-J., Wang, H.-C., Chow, K.-C., Chiou, S.-H., Chiang, S.-F., Lin, T.-Y., Chiang, I.-P. and Chen, D.-R. 2008. Expression of rTsbeta as a 5-fluorouracil resistance marker in patients with primary breast cancer. *Oncology Reports*. **19**(4), pp.881–888.
- Kuribayashi, K., Finnberg, N., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P. and El-Deiry, W.S. 2011. The relative contribution of pro-apoptotic p53 target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage in vitro and in vivo. *Cell Cycle*. **10**(14), pp.2380–2389.
- Labokha, A.A., Gradmann, S., Frey, S., Hülsmann, B.B., Urlaub, H., Baldus, M. and Görlich, D. 2013. Systematic analysis of barrier-forming FG hydrogels from Xenopus nuclear pore complexes. *The EMBO Journal*. **32**(2), pp.204–218.
- Laczy, B., Fülöp, N., Onay-Besikci, A., Des Rosiers, C. and Chatham, J. 2011. Acute Regulation of Cardiac Metabolism by the Hexosamine Biosynthesis Pathway and Protein O-GlcNAcylation. *PLoS ONE*. **6**(4), p.e18417.
- Lagerlöf, O. 2018. O-GlcNAc cycling in the developing, adult and geriatric brain. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. **50**(3), pp.241–261.
- Laissue, P. 2019. The forkhead-box family of transcription factors: key molecular players in colorectal cancer pathogenesis. *Molecular Cancer*. **18**(1), p.5.
- Lamarre-Vincent, N. and Hsieh-Wilson, L.C. 2003. Dynamic Glycosylation of the Transcription Factor CREB: A Potential Role in Gene Regulation. *Journal of the American Chemical Society*. **125**(22), pp.6612–6613.

- Lanza, C., Tan, E.P., Zhang, Z., Machacek, M., Brinker, A.E., Azuma, M. and Slawson, C. 2016. Reduced O-GlcNAcase expression promotes mitotic errors and spindle defects. *Cell Cycle*. **15**(10), pp.1363–1375.
- Lapek, J.D., Tomblin, G., Kellersberger, K.A., Friedman, M.R. and Friedman, A.E. 2015. Evidence of histidine and aspartic acid phosphorylation in human prostate cancer cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. **388**(2), pp.161–173.
- Lazar, G., Zhang, H. and Goodman, H.M. 1993. The origin of the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase isogenes of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. **3**(5), pp.657–668.
- Lazarus, M.B., Jiang, J., Gloster, T.M., Zandberg, W.F., Whitworth, G.E., Vocadlo, D.J. and Walker, S. 2012. Structural snapshots of the reaction coordinate for O-GlcNAc transferase. *Nature chemical biology*. **8**(12), pp.966–968.
- Lazarus, M.B., Jiang, J., Kapuria, V., Bhuiyan, T., Janetzko, J., Zandberg, W.F., Vocadlo, D.J., Herr, W. and Walker, S. 2013. HCF-1 is cleaved in the active site of O-GlcNAc transferase. *Science (New York, N.Y.)*. **342**(6163), pp.1235–1239.
- Lazarus, M.B., Nam, Y., Jiang, J., Sliz, P. and Walker, S. 2011. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature*. **469**(7331), pp.564–567.
- Le François, B.G., Maroun, J.A. and Birnboim, H.C. 2007. Expression of thymidylate synthase in human cells is an early G1 event regulated by CDK4 and p16INK4A but not E2F. *British Journal of Cancer*. **97**(9), pp.1242–1250.
- Lecomte, T., Ferraz, J.-M., Zinzindohoué, F., Lorient, M.-A., Tregouet, D.-A., Landi, B., Berger, A., Cugnenc, P.-H., Jian, R., Beaune, P. and Laurent-Puig, P. 2004. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. **10**(17), pp.5880–5888.
- Lee, A.M., Shi, Q., Pavey, E., Alberts, S.R., Sargent, D.J., Sinicrope, F.A., Berenberg, J.L., Goldberg, R.M. and Diasio, R.B. 2014. DPYD Variants as Predictors of 5-fluorouracil Toxicity in Adjuvant Colon Cancer Treatment (NCCTG N0147). *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. **106**(12).
- Lee, D.H., Kwon, N.E., Lee, W.-J., Lee, M.-S., Kim, D.-J., Kim, J.H. and Park, S.-K. 2020. Increased O-GlcNAcylation of c-Myc Promotes Pre-B Cell Proliferation. *Cells*. **9**(1).
- Lee, H., Oh, Y., Jeon, Y.-J., Lee, S.-Y., Kim, H., Lee, H.-J. and Jung, Y.-K. 2019. DR4-Ser424 O-GlcNAcylation Promotes Sensitization of TRAIL-Tolerant Persisters and TRAIL-Resistant Cancer Cells to Death. *Cancer Research*. **79**(11), pp.2839–2852.
- Lee, H.E., Lim, D., Lee, J.Y., Lim, S.M. and Pae, A.N. 2019. Recent tau-targeted clinical strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Future Medicinal Chemistry*. **11**(15), pp.1845–1848.
- Lee, Jeeyong, Kim, K.-Y., Lee, Jihyun and Paik, Y.-K. 2010. Regulation of Dauer Formation by O-GlcNAcylation in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**(5), pp.2930–2939.
- Lee, T.N., Alborn, W.E., Knierman, M.D. and Konrad, R.J. 2006. Alloxan is an inhibitor of O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **350**(4), pp.1038–1043.
- Lefebvre, T., Alonso, C., Mahboub, S., Dupire, M.J., Zanetta, J.P., Caillet-Boudin, M.L. and Michalski, J.C. 1999. Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1472**(1–2), pp.71–81.
- Lefebvre, T., Baert, F., Bodart, J.-F., Flament, S., Michalski, J.-C. and Vilain, J.-P. 2004. Modulation of O-GlcNAc glycosylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Journal of Cellular Biochemistry*. **93**(5), pp.999–1010.
- Lefebvre, T., Cieniewski, C., Lemoine, J., Guerardel, Y., Leroy, Y., Zanetta, J.P. and Michalski, J.C. 2001. Identification of N-acetyl-d-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *The Biochemical Journal*. **360**(Pt 1), pp.179–188.
- Lefebvre, T., Dehennaut, V., Guinez, C., Olivier, S., Drougat, L., Mir, A.-M., Mortuaire, M., Vercoutter-Edouart, A.-S. and Michalski, J.-C. 2010. Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1800**(2), pp.67–79.

- Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussière, T., Dupire, M.-J., Delacourte, A., Michalski, J.-C. and Caillet-Boudin, M.-L. 2003. Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1619**(2), pp.167–176.
- Lefebvre, T., Planque, N., Leleu, D., Bailly, M., Caillet-Boudin, M.-L., Saule, S. and Michalski, J.-C. 2002. O-glycosylation of the nuclear forms of Pax-6 products in quail neuroretina cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. **85**(1), pp.208–218.
- Lehman, D.M., Fu, D.-J., Freeman, A.B., Hunt, K.J., Leach, R.J., Johnson-Pais, T., Hamlington, J., Dyer, T.D., Arya, R., Abboud, H., Göring, H.H.H., Duggirala, R., Blangero, J., Konrad, R.J. and Stern, M.P. 2005. A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes*. **54**(4), pp.1214–1221.
- Lenzen, S. and Munday, R. 1991. Thiol-group reactivity, hydrophilicity and stability of alloxan, its reduction products and its N-methyl derivatives and a comparison with ninhydrin. *Biochemical Pharmacology*. **42**(7), pp.1385–1391.
- Lenzen, S., Tiedge, M. and Panten, U. 1987. Glucokinase in pancreatic B-cells and its inhibition by alloxan. *Acta Endocrinologica*. **115**(1), pp.21–29.
- Leturcq, M., Mortuaire, M., Hardivillé, S., Schulz, C., Lefebvre, T. and Vercoutter-Edouart, A.-S. 2018. O-GlcNAc transferase associates with the MCM2–7 complex and its silencing destabilizes MCM–MCM interactions. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **75**(23), pp.4321–4339.
- Levine, Z.G., Fan, C., Melicher, M.S., Orman, M., Benjamin, T. and Walker, S. 2018. O-GlcNAc transferase recognizes protein substrates using an asparagine ladder in the TPR superhelix. *Journal of the American Chemical Society*. **140**(10), pp.3510–3513.
- Lewis, B.A., Burlingame, A.L. and Myers, S.A. 2016. Human RNA Polymerase II Promoter Recruitment in Vitro Is Regulated by O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase (OGT). *Journal of Biological Chemistry*. **291**(27), pp.14056–14061.
- Li, L., Shao, M., Peng, P., Yang, C., Song, S., Duan, F., Jia, D., Zhang, M., Zhao, J., Zhao, R., Wu, W., Wang, L., Li, C., Wu, H., Zhang, J., Wu, X., Ruan, Y. and Gu, J. 2017. High expression of GFAT1 predicts unfavorable prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. **8**(12), pp.19205–19217.
- Li, L.S., Kim, N.-G., Kim, S.H., Park, C., Kim, Hyunki, Kang, H.J., Koh, K.H., Kim, S.N., Kim, W.H., Kim, N.K. and Kim, Hoguen 2003. Chromosomal Imbalances in the Colorectal Carcinomas with Microsatellite Instability. *The American Journal of Pathology*. **163**(4), p.1429.
- Li, L.S., Morales, J.C., Veigl, M., Sedwick, D., Greer, S., Meyers, M., Wagner, M., Fishel, R. and Boothman, D.A. 2009. DNA mismatch repair (MMR)-dependent 5-fluorouracil cytotoxicity and the potential for new therapeutic targets. *British Journal of Pharmacology*. **158**(3), pp.679–692.
- Li, M.-D., Ruan, H.-B., Hughes, M.E., Lee, J.-S., Singh, J.P., Jones, S.P., Nitabach, M.N. and Yang, X. 2013. O-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell metabolism*. **17**(2), pp.303–310.
- Li, Q., Boyer, C., Lee, J.Y. and Shepard, H.M. 2001. A Novel Approach to Thymidylate Synthase as a Target for Cancer Chemotherapy. *Molecular Pharmacology*. **59**(3), pp.446–452.
- Li, T., Si, W., Zhu, J., Yin, L. and Zhong, C. 2020. Emodin reverses 5-Fu resistance in human colorectal cancer via downregulation of PI3K/Akt signaling pathway. *American Journal of Translational Research*. **12**(5), pp.1851–1861.
- Li, X., Lu, F., Wang, J.-Z. and Gong, C.-X. 2006. Concurrent alterations of O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in mouse brains during fasting. *The European Journal of Neuroscience*. **23**(8), pp.2078–2086.
- Li, Xuexia, Zhu, Q., Shi, X., Cheng, Y., Li, Xueliu, Xu, H., Duan, X., Hsieh-Wilson, L.C., Chu, J., Pelletier, J., Ni, M., Zheng, Z., Li, S. and Yi, W. 2019. O-GlcNAcylation of core components of the translation initiation machinery regulates protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **116**(16), pp.7857–7866.
- Li, Y., Wang, L., Liu, J., Zhang, P., An, M., Han, C., Li, Y., Guan, X. and Zhang, K. 2017. O-GlcNAcylation modulates Bmi-1 protein stability and potential oncogenic function in prostate cancer. *Oncogene*. **36**(45), pp.6293–6305.

- Li, Z., Jiao, X., Wang, C., Shirley, L.A., Elsaleh, H., Dahl, O., Wang, M., Soutoglou, E., Knudsen, E.S. and Pestell, R.G. 2010. Alternative Cyclin D1 Splice Forms Differentially Regulate the DNA Damage Response. *Cancer Research*. **70**(21), pp.8802–8811.
- Li, Z., Li, X., Nai, S., Geng, Q., Liao, J., Xu, X. and Li, J. 2017. Checkpoint kinase 1–induced phosphorylation of O-linked β -N-acetylglucosamine transferase regulates the intermediate filament network during cytokinesis. *The Journal of Biological Chemistry*. **292**(48), pp.19548–19555.
- Liang, P., Nair, J.R., Song, L., McGuire, J.J. and Dolnick, B.J. 2005. Comparative genomic analysis reveals a novel mitochondrial isoform of human rTS protein and unusual phylogenetic distribution of the rTS gene. *BMC Genomics*. **6**, p.125.
- Liao, G.-B., Li, X.-Z., Zeng, S., Liu, C., Yang, S.-M., Yang, L., Hu, C.-J. and Bai, J.-Y. 2018. Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer. *Cell Communication and Signaling : CCS*. **16**.
- Ligabue, A., Marverti, G., Liebl, U. and Myllykallio, H. 2012. Transcriptional Activation and Cell Cycle Block Are the Keys for 5-Fluorouracil Induced Up-Regulation of Human Thymidylate Synthase Expression. *PLoS ONE*. **7**(10).
- Ligtenberg, M.J.L., Kuiper, R.P., Chan, T.L., Goossens, M., Hebeda, K.M., Voorendt, M., Lee, T.Y.H., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Hendriks-Cornelissen, S.J.B., Tsui, W.Y., Kong, C.K., Brunner, H.G., van Kessel, A.G., Yuen, S.T., van Krieken, J.H.J.M., Leung, S.Y. and Hoogerbrugge, N. 2009. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nature Genetics*. **41**(1), pp.112–117.
- Lim, K. and Chang, H.-I. 2009a. O-GlcNAc inhibits interaction between Sp1 and Elf-1 transcription factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **380**(3), pp.569–574.
- Lim, K. and Chang, H.-I. 2010. O-GlcNAc inhibits interaction between Sp1 and sterol regulatory element binding protein 2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **393**(2), pp.314–318.
- Lim, K. and Chang, H.-I. 2009b. O-GlcNAc modification of Sp1 inhibits the functional interaction between Sp1 and Oct1. *FEBS Letters*. **583**(3), pp.512–520.
- Lin, X., Liu, J., Maley, F. and Chu, E. 2003. Role of cysteine amino acid residues on the RNA binding activity of human thymidylate synthase. *Nucleic Acids Research*. **31**(16), pp.4882–4887.
- Lin, X., Parsels, L.A., Voeller, D.M., Allegra, C.J., Maley, G.F., Maley, F. and Chu, E. 2000. Characterization of a cis-acting regulatory element in the protein coding region of thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Research*. **28**(6), pp.1381–1389.
- Lin, Y.-L. and Chow, K.-C. 2010. rTSbeta as a novel 5-fluorouracil resistance marker of colorectal cancer: a preliminary study. *Annals of the Academy of Medicine, Singapore*. **39**(2), pp.107–111.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.-H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X. and He, X. 2002. Control of β -Catenin Phosphorylation/Degradation by a Dual-Kinase Mechanism. *Cell*. **108**(6), pp.837–847.
- Liu, F., Shi, J., Tanimukai, H., Gu, Jinhua, Gu, Jianlan, Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. and Gong, C.-X. 2009. Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*. **132**(Pt 7), pp.1820–1832.
- Liu, H., Wang, Z., Yu, S. and Xu, J. 2014. Proteasomal degradation of O-GlcNAc transferase elevates hypoxia-induced vascular endothelial inflammatory response. *Cardiovascular Research*. **103**(1), pp.131–139.
- Liu, J., Marchase, R.B. and Chatham, J.C. 2007. Glutamine-induced protection of isolated rat heart from ischemia/reperfusion injury is mediated via the hexosamine biosynthesis pathway and increased protein O-GlcNAc levels. *Journal of molecular and cellular cardiology*. **42**(1), pp.177–185.
- Liu, J., Pang, Y., Chang, T., Bounelis, P., Chatham, J.C. and Marchase, R.B. 2006. Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **40**(2), pp.303–312.
- Liu, L., Li, L., Ma, C., Shi, Y., Liu, C., Xiao, Z., Zhang, Y., Tian, F., Gao, Y., Zhang, J., Ying, W., Wang, P.G. and Zhang, L. 2019. O-GlcNAcylation of Thr12 / Ser56 in short form O-GlcNAc transferase (sOGT) regulates its substrate selectivity. *Journal of Biological Chemistry*., jbc.RA119.009085.
- Liu, M.-N., Liu, A.-Y., Pei, F.-H., Ma, X., Fan, Y.-J., Du, Y.-J. and Liu, B.-R. 2015. Functional mechanism of the enhancement of 5-fluorouracil sensitivity by TUSC4 in colon cancer cells. *Oncology Letters*. **10**(6), pp.3682–3688.

- Liu, Q., Wang, J., Kang, S.A., Thoreen, C.C., Hur, W., Ahmed, T., Sabatini, D.M. and Gray, N.S. 2011. Discovery of 9-(6-aminopyridin-3-yl)-1-(3-(trifluoromethyl)phenyl)benzo[h][1,6]naphthyridin-2(1H)-one (Torin2) as a potent, selective, and orally available mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor for treatment of cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*. **54**(5), pp.1473–1480.
- Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R.S., Taniguchi, K., Krishnadath, K.K., Halling, K.C., Cunningham, J.M., Qian, C., Christensen, E., Roche, P.C., Smith, D.I. and Thibodeau, S.N. 2000. Mutations in *AXIN2* cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating β -catenin/TCF signalling. *Nature Genetics*. **26**(2), pp.146–147.
- Liu, W., Fang, Y., Wang, X.-T., Liu, J., Dan, X. and Sun, L.-L. 2014. Overcoming 5-Fu resistance of colon cells through inhibition of Glut1 by the specific inhibitor WZB117. *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*. **15**(17), pp.7037–7041.
- Liu, X., Li, L., Wang, Y., Yan, H., Ma, X., Wang, P.G. and Zhang, L. 2014. A peptide panel investigation reveals the acceptor specificity of O-GlcNAc transferase. *The FASEB Journal*. **28**(8), pp.3362–3372.
- Liu, Y., Cao, Y., Pan, X., Shi, M., Wu, Q., Huang, T., Jiang, H., Li, W. and Zhang, J. 2018. O-GlcNAc elevation through activation of the hexosamine biosynthetic pathway enhances cancer cell chemoresistance. *Cell Death & Disease*. **9**(5), pp.1–12.
- Liu, Y., Li, X., Yu, Y., Shi, J., Liang, Z., Run, X., Li, Y., Dai, C., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Liu, F. and Gong, C.-X. 2012. Developmental Regulation of Protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc Transferase, and O-GlcNAcase in Mammalian Brain. *PLoS ONE*. **7**(8).
- Liu, Y., Ren, Y., Cao, Y., Huang, H., Wu, Q., Li, W., Wu, S. and Zhang, J. 2017. Discovery of a Low Toxicity O-GlcNAc Transferase (OGT) Inhibitor by Structure-based Virtual Screening of Natural Products. *Scientific Reports*. **7**.
- Lo, P.-W., Shie, J.-J., Chen, C.-H., Wu, C.-Y., Hsu, T.-L. and Wong, C.-H. 2018. O-GlcNAcylation regulates the stability and enzymatic activity of the histone methyltransferase EZH2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **115**(28), pp.7302–7307.
- Longley, D.B., Allen, W.L., McDermott, U., Wilson, T.R., Latif, T., Boyer, J., Lynch, M. and Johnston, P.G. 2004. The Roles of Thymidylate Synthase and p53 in Regulating Fas-Mediated Apoptosis in Response to Antimetabolites. *Clinical Cancer Research*. **10**(10), pp.3562–3571.
- Loughery, J., Cox, M., Smith, L.M. and Meek, D.W. 2014. Critical role for p53-serine 15 phosphorylation in stimulating transactivation at p53-responsive promoters. *Nucleic Acids Research*. **42**(12), pp.7666–7680.
- Love, D.C., Ghosh, S., Mondoux, M.A., Fukushige, T., Wang, P., Wilson, M.A., Iser, W.B., Wolkow, C.A., Krause, M.W. and Hanover, J.A. 2010. Dynamic O-GlcNAc cycling at promoters of *Caenorhabditis elegans* genes regulating longevity, stress, and immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**(16), pp.7413–7418.
- Love, D.C. and Hanover, J.A. 2005. The Hexosamine Signaling Pathway: Deciphering the ‘O-GlcNAc Code’. *Science’s STKE*. **2005**(312), pp.re13–re13.
- Love, D.C., Kochan, J., Cathey, R.L., Shin, S.-H., Hanover, J.A. and Kochran, J. 2003. Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *Journal of Cell Science*. **116**(Pt 4), pp.647–654.
- Lovelace, L.L., Gibson, L.M. and Lebioda, L. 2007. Cooperative Inhibition of Human Thymidylate Synthase by Mixtures of Active Site Binding and Allosteric Inhibitors. *Biochemistry*. **46**(10), pp.2823–2830.
- Luanpitpong, S., Angsutararux, P., Samart, P., Chanthra, N., Chanvorachote, P. and Issaragrisil, S. 2017. Hyper- O -GlcNAcylation induces cisplatin resistance via regulation of p53 and c-Myc in human lung carcinoma. *Scientific Reports*. **7**(1), pp.1–13.
- Luanpitpong, S., Chanthra, N., Janan, M., Poohadsuan, J., Samart, P., U-Pratya, Y., Rojanasakul, Y. and Issaragrisil, S. 2018. Inhibition of O-GlcNAcase sensitizes apoptosis and reverses bortezomib resistance in mantle cell lymphoma through modification of truncated Bid. *Molecular cancer therapeutics*. **17**(2), pp.484–496.
- Lubas, W.A., Frank, D.W., Krause, M. and Hanover, J.A. 1997. O-Linked GlcNAc Transferase Is a Conserved Nucleocytoplasmic Protein Containing Tetratricopeptide Repeats. *Journal of Biological Chemistry*. **272**(14), pp.9316–9324.

- Lubas, W.A. and Hanover, J.A. 2000. Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**(15), pp.10983–10988.
- Ludwiczak, J., Maj, P., Wilk, P., Frączyk, T., Ruman, T., Kierdaszuk, B., Jarmuła, A. and Rode, W. 2016. Phosphorylation of thymidylate synthase affects slow-binding inhibition by 5-fluoro-dUMP and N⁴-hydroxy-dCMP. *Molecular BioSystems*. **12**(4), pp.1333–1341.
- Lustig, R.H., Schmidt, L.A. and Brindis, C.D. 2012. The toxic truth about sugar. *Nature*. **482**(7383), pp.27–29.
- Lynch, T.P., Ferrer, C.M., Jackson, S.R., Shahriari, K.S., Vosseller, K. and Reginato, M.J. 2012. Critical Role of O-Linked β -N-Acetylglucosamine Transferase in Prostate Cancer Invasion, Angiogenesis, and Metastasis. *The Journal of Biological Chemistry*. **287**(14), pp.11070–11081.
- Ma, Y.-S., Yang, I.-P., Tsai, H.-L., Huang, C.-W., Juo, S.-H.H. and Wang, J.-Y. 2014. High Glucose Modulates Antiproliferative Effect and Cytotoxicity of 5-Fluorouracil in Human Colon Cancer Cells. *DNA and Cell Biology*. **33**(2), pp.64–72.
- Ma, Z., Chalkley, R.J. and Vosseller, K. 2017. Hyper-O-GlcNAcylation activates nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) signaling through interplay with phosphorylation and acetylation. *The Journal of Biological Chemistry*. **292**(22), pp.9150–9163.
- Ma, Z., Vocadlo, D.J. and Vosseller, K. 2013. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF- κ B activity in pancreatic cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **288**(21), pp.15121–15130.
- Macauley, M.S. and Vocadlo, D.J. 2009. Enzymatic characterization and inhibition of the nuclear variant of human O-GlcNAcase. *Carbohydrate Research*. **344**(9), pp.1079–1084.
- Macauley, M.S., Whitworth, G.E., Debowski, A.W., Chin, D. and Vocadlo, D.J. 2005. O-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis: kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**(27), pp.25313–25322.
- Machon, O., Baldini, S.F., Ribeiro, J.P., Steenackers, A., Varrot, A., Lefebvre, T. and Imberty, A. 2017. Recombinant fungal lectin as a new tool to investigate O-GlcNAcylation processes. *Glycobiology*. **27**(2), pp.123–128.
- Maiuthed, A., Ninsontia, C., Erlenbach-Wuenssch, K., Ndreshkjana, B., Muenzner, J., Caliskan, A., Husayn, A., Chaotham, C., Hartmann, A., Vial Roehe, A., Mahadevan, V., Chanvorachote, P. and Schneider, R. 2018. Cytoplasmic p21 Mediates 5-Fluorouracil Resistance by Inhibiting Pro-Apoptotic Chk2. *Cancers*. **10**(10), p.373.
- Majumdar, G., Harmon, A., Candelaria, R., Martinez-Hernandez, A., Raghow, R. and Solomon, S.S. 2003. O-glycosylation of Sp1 and transcriptional regulation of the calmodulin gene by insulin and glucagon. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. **285**(3), pp.E584–E591.
- Majumdar, G., Harrington, A., Hungerford, J., Martinez-Hernandez, A., Gerling, I.C., Raghow, R. and Solomon, S. 2006. Insulin dynamically regulates calmodulin gene expression by sequential o-glycosylation and phosphorylation of sp1 and its subcellular compartmentalization in liver cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **281**(6), pp.3642–3650.
- Mandola, M.V., Stoehlmacher, J., Muller-Weeks, S., Cesarone, G., Yu, M.C., Lenz, H.-J. and Ladner, R.D. 2003. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. *Cancer Research*. **63**(11), pp.2898–2904.
- Mandola, M.V., Stoehlmacher, J., Zhang, W., Groshen, S., Yu, M.C., Iqbal, S., Lenz, H.-J. and Ladner, R.D. 2004. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics*. **14**(5), pp.319–327.
- Manning, B.D. and Cantley, L.C. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. **129**(7), pp.1261–1274.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science (New York, N.Y.)*. **298**(5600), pp.1912–1934.
- Marcuello, E., Altés, A., del Rio, E., César, A., Menoyo, A. and Baiget, M. 2004. Single nucleotide polymorphism in the 5' tandem repeat sequences of thymidylate synthase gene predicts for

- response to fluorouracil-based chemotherapy in advanced colorectal cancer patients. *International Journal of Cancer*. **112**(5), pp.733–737.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R.S., Zborowska, E., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. 1995. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science (New York, N.Y.)*. **268**(5215), pp.1336–1338.
- Marotta, N.P., Lin, Y.H., Lewis, Y.E., Ambroso, M.R., Zaro, B.W., Roth, M.T., Arnold, D.B., Langen, R. and Pratt, M.R. 2015. O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the Parkinson's disease associated protein α -synuclein. *Nature chemistry*. **7**(11), pp.913–920.
- Marsh, S., Ameyaw, M.M., Githang'a, J., Indalo, A., Ofori-Adjei, D. and McLeod, H.L. 2000. Novel thymidylate synthase enhancer region alleles in African populations. *Human Mutation*. **16**(6), p.528.
- Marsh, S.A., Dell'Italia, L.J. and Chatham, J.C. 2011. Activation of the hexosamine biosynthesis pathway and protein O-GlcNAcylation modulate hypertrophic and cell signaling pathways in cardiomyocytes from diabetic mice. *Amino Acids*. **40**(3), pp.819–828.
- Marsh, S.A., Powell, P.C., Dell'Italia, L.J. and Chatham, J.C. 2013. Cardiac O-GlcNAcylation blunts autophagic signaling in the diabetic heart. *Life sciences*. **92**(11), pp.648–656.
- Marshall, S., Bacote, V. and Traxinger, R.R. 1991a. Complete inhibition of glucose-induced desensitization of the glucose transport system by inhibitors of mRNA synthesis. Evidence for rapid turnover of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. **266**(16), pp.10155–10161.
- Marshall, S., Bacote, V. and Traxinger, R.R. 1991b. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry*. **266**(8), pp.4706–4712.
- Marshall, S., Duong, T., Orbus, R.J., Rumberger, J.M. and Okuyama, R. 2003. Measurement of UDP-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) in brain cytosol and characterization of anti-OGT antibodies. *Analytical Biochemistry*. **314**(2), pp.169–179.
- Marshall, S., Nadeau, O. and Yamasaki, K. 2004. Dynamic Actions of Glucose and Glucosamine on Hexosamine Biosynthesis in Isolated Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*. **279**(34), pp.35313–9.
- Masclaf, L., Dehennaut, V., Mortuaire, M., Schulz, C., Leturcq, M., Lefebvre, T. and Vercoutter-Edouart, A.-S. 2019. Cyclin D1 Stability Is Partly Controlled by O-GlcNAcylation. *Frontiers in Endocrinology*. **10**.
- Maszczyk-Seneczko, D., Olczak, T. and Olczak, M. 2011. Subcellular localization of UDP-GlcNAc, UDP-Gal and SLC35B4 transporters. *Acta Biochimica Polonica*. **58**(3), pp.413–419.
- Matsumura, F. and Hartshorne, D.J. 2008. Myosin phosphatase target subunit: Many roles in cell function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **369**(1), pp.149–156.
- Matsuyama, R., Togo, S., Shimizu, D., Momiyama, N., Ishikawa, T., Ichikawa, Y., Endo, I., Kunisaki, C., Suzuki, H., Hayasizaki, Y. and Shimada, H. 2006. Predicting 5-fluorouracil chemosensitivity of liver metastases from colorectal cancer using primary tumor specimens: Three-gene expression model predicts clinical response. *International Journal of Cancer*. **119**(2), pp.406–413.
- Matsuzaki, T., Yashiro, M., Kaizaki, R., Yasuda, K., Doi, Y., Sawada, T., Ohira, M. and Hirakawa, K. 2009. Synergistic antiproliferative effect of mTOR inhibitors in combination with 5-fluorouracil in scirrhous gastric cancer. *Cancer Science*. **100**(12), pp.2402–2410.
- Maury, J.J.P., EL Farran, C.A., Ng, D., Loh, Y.-H., Bi, X., Bardor, M. and Choo, A.B.-H. 2015. RING1B O-GlcNAcylation regulates gene targeting of polycomb repressive complex 1 in human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*. **15**(1), pp.182–189.
- Mazars, R., Gonzalez-de-Peredo, A., Cayrol, C., Lavigne, A.-C., Vogel, J.L., Ortega, N., Lacroix, C., Gautier, V., Huet, G., Ray, A., Monsarrat, B., Kristie, T.M. and Girard, J.-P. 2010. The THAP-Zinc Finger Protein THAP1 Associates with Coactivator HCF-1 and O-GlcNAc Transferase. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**(18), pp.13364–13371.
- McLean, G.W., Carragher, N.O., Avizienyte, E., Evans, J., Brunton, V.G. and Frame, M.C. 2005. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nature Reviews. Cancer*. **5**(7), pp.505–515.

- Medford, H.M., Chatham, J.C. and Marsh, S.A. 2012. Chronic ingestion of a Western diet increases O-linked- β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) protein modification in the rat heart. *Life Sciences*. **90**(23–24), pp.883–888.
- Mehdy, A., Morelle, W., Rosnoblet, C., Legrand, D., Lefebvre, T., Duvet, S. and Foulquier, F. 2012. PUGNAc treatment leads to an unusual accumulation of free oligosaccharides in CHO cells. *Journal of Biochemistry*. **151**(4), pp.439–446.
- Melamed, P., Yosefzon, Y., David, C., Tsukerman, A. and Pnueli, L. 2018. Tet Enzymes, Variants, and Differential Effects on Function. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. **6**.
- Melo, S.P., Barbour, K.W. and Berger, F.G. 2011. Cooperation between an Intrinsically Disordered Region and a Helical Segment Is Required for Ubiquitin-independent Degradation by the Proteasome. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**(42), pp.36559–36567.
- Melo, S.P., Yoshida, A. and Berger, F.G. 2010. Functional dissection of the N-terminal degron of human thymidylate synthase. *The Biochemical Journal*. **432**(1), pp.217–226.
- Meng, Z., Moroishi, T. and Guan, K.-L. 2016. Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes & Development*. **30**(1), pp.1–17.
- Mertins, P., Mani, D.R., Ruggles, K.V., Gillette, M.A., Clauser, K.R., Wang, P., Wang, X., Qiao, J.W., Cao, S., Petralia, F., Kawaler, E., Mundt, F., Krug, K., Tu, Z., Lei, J.T., Gatza, M.L., Wilkerson, M., Perou, C.M., Yellapantula, V., Huang, K., Lin, C., McLellan, M.D., Yan, P., Davies, S.R., Townsend, R.R., Skates, S.J., Wang, J., Zhang, B., Kinsinger, C.R., Mesri, M., Rodriguez, H., Ding, L., Paulovich, A.G., Fenyő, D., Ellis, M.J., Carr, S.A. and NCI CPTAC 2016. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature*. **534**(7605), pp.55–62.
- Mertins, P., Qiao, J.W., Patel, J., Udeshi, N.D., Clauser, K.R., Mani, D.R., Burgess, M.W., Gillette, M.A., Jaffe, J.D. and Carr, S.A. 2013. Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nature Methods*. **10**(7), pp.634–637.
- Meyerhardt, J.A., Catalano, P.J., Haller, D.G., Mayer, R.J., Macdonald, J.S., Benson, A.B. and Fuchs, C.S. 2003. Impact of diabetes mellitus on outcomes in patients with colon cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **21**(3), pp.433–440.
- Meyerhardt, J.A., Heseltine, D., Niedzwiecki, D., Hollis, D., Saltz, L.B., Mayer, R.J., Thomas, J., Nelson, H., Whittom, R., Hantel, A., Schilsky, R.L. and Fuchs, C.S. 2006. Impact of Physical Activity on Cancer Recurrence and Survival in Patients With Stage III Colon Cancer: Findings From CALGB 89803. *Journal of Clinical Oncology*. **24**(22), pp.3535–3541.
- Meyerhardt, J.A., Sato, K., Niedzwiecki, D., Ye, C., Saltz, L.B., Mayer, R.J., Mowat, R.B., Whittom, R., Hantel, A., Benson, A., Wigler, D.S., Venook, A. and Fuchs, C.S. 2012. Dietary Glycemic Load and Cancer Recurrence and Survival in Patients with Stage III Colon Cancer: Findings From CALGB 89803. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. **104**(22), pp.1702–1711.
- Mhaidat, N., Bouklihacene, M. and Thorne, R. 2014. 5-Fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells is caspase-9-dependent and mediated by activation of protein kinase C- δ - PubMed - NCBI. *Oncology Letters*. **8**(2), pp.699–704.
- Mi, W., Gu, Y., Han, C., Liu, H., Fan, Q., Zhang, X., Cong, Q. and Yu, W. 2011. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1812**(4), pp.514–519.
- Miller, C.J. and Turk, B.E. 2016. Rapid Identification of Protein Kinase Phosphorylation Site Motifs Using Combinatorial Peptide Libraries. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. **1360**, pp.203–216.
- Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D. and Sedoris, K. 2012. c-Myc and Cancer Metabolism. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. **18**(20), pp.5546–5553.
- Miller, W.P., Mihailescu, M.L., Yang, C., Barber, A.J., Kimball, S.R., Jefferson, L.S. and Dennis, M.D. 2016. The Translational Repressor 4E-BP1 Contributes to Diabetes-Induced Visual Dysfunction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **57**(3), pp.1327–1337.
- Miller-Patrick, K., Vincent, D.L., Early, R.J., Weems, Y.S., Tanaka, Y., Ashimine, D.T., Nusser, K.D., Lee, C.N., Ledgerwood, K.S. and Weems, C.W. 1993. Effects of the purine biosynthesis pathway inhibitors azaserine, hadacidin, and mycophenolic acid on the developing ovine corpus luteum. *The Chinese Journal of Physiology*. **36**(4), pp.245–252.

- Mingot, J.-M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E. and Görlich, D. 2001. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *The EMBO Journal*. **20**(14), pp.3685–3694.
- Mirabelli-Primdahl, L., Gryfe, R., Kim, H., Millar, A., Luceri, C., Dale, D., Holowaty, E., Bapat, B., Gallinger, S. and Redston, M. 1999. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Research*. **59**(14), pp.3346–3351.
- Mitselou, A., Ioachim, E., Skoufi, U., Tsironis, C., Tsimogiannis, K.E., Skoufi, C., Vougiouklakis, T. and Briasoulis, E. 2012. Predictive role of thymidine phosphorylase expression in patients with colorectal cancer and its association with angiogenesis-related proteins and extracellular matrix components. *In Vivo (Athens, Greece)*. **26**(6), pp.1057–1067.
- Miura, T., Kume, M., Kawamura, T., Yamamoto, K., Hamakubo, T. and Nishihara, S. 2018. O-GlcNAc on PKC ζ Inhibits the FGF4-PKC ζ -MEK-ERK1/2 Pathway via Inhibition of PKC ζ Phosphorylation in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports*. **10**(1), pp.272–286.
- Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M. and Reed, J.C. 1994. Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Research*. **54**(12), pp.3131–3135.
- Miyashita, T. and Reed, J.C. 1995. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. **80**(2), pp.293–299.
- Monsigny, M., Sene, C., Obrenovitch, A., Roche, A.C., Delmotte, F. and Boschetti, E. 1979. Properties of succinylated wheat-germ agglutinin. *European Journal of Biochemistry*. **98**(1), pp.39–45.
- Morganti, M., Ciantelli, M., Giglioni, B., Putignano, A.L., Nobili, S., Papi, L., Landini, I., Napoli, C., Valanzano, R., Cianchi, F., Boddi, V., Tonelli, F., Cortesini, C., Mazzei, T., Genuardi, M. and Mini, E. 2005. Relationships between promoter polymorphisms in the thymidylate synthase gene and mRNA levels in colorectal cancers. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*. **41**(14), pp.2176–2183.
- Moriarty, A., O’Sullivan, J., Kennedy, J., Mehigan, B. and McCormick, P. 2016. Current targeted therapies in the treatment of advanced colorectal cancer: a review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. **8**(4), pp.276–293.
- Mousavi, S., Safaralizadeh, R., Hosseinpour-Feizi, M., Azimzadeh-Isfanjani, A. and Hashemzadeh, S. 2018. Study of cofilin 1 gene expression in colorectal cancer. *Journal of Gastrointestinal Oncology*. **9**(5), pp.791–796.
- Muhale, F.A., Wetmore, B.A., Thomas, R.S. and McLeod, H.L. 2011. Systems pharmacology assessment of the 5-fluorouracil pathway. *Pharmacogenomics*. **12**(3), pp.341–350.
- Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S.L., Galle, P.R., Stremmel, W., Oren, M. and Krammer, P.H. 1998. p53 Activates the CD95 (APO-1/Fas) Gene in Response to DNA Damage by Anticancer Drugs. *Journal of Experimental Medicine*. **188**(11), pp.2033–2045.
- Murillo, C.A., Rychahou, P.G. and Evers, B.M. 2004. Inhibition of alpha5 integrin decreases PI3K activation and cell adhesion of human colon cancers. *Surgery*. **136**(2), pp.143–149.
- Muthusamy, S., Hong, K.U., Dassanayaka, S., Hamid, T. and Jones, S.P. 2015. E2F1 Transcription Factor Regulates O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Transferase and O-GlcNAcase Expression. *The Journal of Biological Chemistry*. **290**(52), pp.31013–31024.
- Myers, A., Holmans, P., Marshall, H., Kwon, J., Meyer, D., Ramic, D., Shears, S., Booth, J., DeVrieze, F.W., Crook, R., Hamshere, M., Abraham, R., Tunstall, N., Rice, F., Carty, S., Lillystone, S., Kehoe, P., Rudrasingham, V., Jones, L., Lovestone, S., Perez-Tur, J., Williams, J., Owen, M.J., Hardy, J. and Goate, A.M. 2000. Susceptibility locus for Alzheimer’s disease on chromosome 10. *Science (New York, N.Y.)*. **290**(5500), pp.2304–2305.
- Myers, S.A., Panning, B. and Burlingame, A.L. 2011. Polycomb repressive complex 2 is necessary for the normal site-specific O-GlcNAc distribution in mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**(23), pp.9490–9495.
- Nagarajan, M. and Johnson, L.F. 1989. Regulation of thymidylate synthase gene expression in mouse fibroblasts synchronized by mitotic selection. *Experimental Cell Research*. **181**(1), pp.289–297.
- Nagaria, P., Svilar, D., Brown, A.R., Wang, X., Sobol, R.W. and Wyatt, M.D. 2013. SMUG1 but not UNG DNA glycosylase contributes to the cellular response to recovery from 5-fluorouracil induced replication stress. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. **743–744**, pp.26–32.

- Nagnan-Le Meillour, P., Vercoutter-Edouart, A.-S., Hilliou, F., Le Danvic, C. and Lévy, F. 2014. Proteomic Analysis of Pig (*Sus scrofa*) Olfactory Soluble Proteome Reveals O-Linked-N-Acetylglucosamylation of Secreted Odorant-Binding Proteins. *Frontiers in Endocrinology*. **5**, p.202.
- Nanashima, N., Asano, J., Hayakari, M., Nakamura, T., Nakano, H., Yamada, T., Shimizu, T., Akita, M., Fan, Y. and Tsuchida, S. 2005. Nuclear Localization of STAT5A Modified with O-Linked N-Acetylglucosamine and Early Involution in the Mammary Gland of Hirosaki Hairless Rat. *Journal of Biological Chemistry*. **280**(52), pp.43010–43016.
- Nandi, A., Sprung, R., Barma, D.K., Zhao, Yingxin, Kim, S.C., Falck, J.R. and Zhao, Yingming 2006. Global identification of O-GlcNAc-modified proteins. *Analytical Chemistry*. **78**(2), pp.452–458.
- Navalgund, L.G., Rossana, C., Muench, A.J. and Johnson, L.F. 1980. Cell cycle regulation of thymidylate synthetase gene expression in cultured mouse fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*. **255**(15), pp.7386–7390.
- Ngoh, G.A., Hamid, T., Prabhu, S.D. and Jones, S.P. 2009. O-GlcNAc signaling attenuates ER stress-induced cardiomyocyte death. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. **297**(5), pp.H1711-1719.
- Ngoh, G.A., Watson, L.J., Facundo, H.T., Dillmann, W. and Jones, S.P. 2008. Noncanonical Glycosyltransferase Modulates Post-hypoxic Cardiac Myocyte Death and Mitochondrial Permeability Transition. *Journal of molecular and cellular cardiology*. **45**(2), pp.313–325.
- Nie, H., Ju, H., Fan, J., Shi, X., Cheng, Y., Cang, X., Zheng, Z., Duan, X. and Yi, W. 2020. O-GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth. *Nature Communications*. **11**.
- Nishiyama, M., Yamamoto, W., Park, J., Okamoto, R., Hanaoka, H., Takano, H., Saito, N., Matsukawa, M., Shirasaka, T. and Kurihara, M. 1999. Low-Dose Cisplatin and 5-Fluorouracil in Combination Can Repress Increased Gene Expression of Cellular Resistance Determinants to Themselves. *Clinical Cancer Research*. **5**(9), pp.2620–8.
- Noach, N., Segev, Y., Levi, I., Segal, S. and Priel, E. 2007. Modification of topoisomerase I activity by glucose and by O-GlcNAcylation of the enzyme protein. *Glycobiology*. **17**(12), pp.1357–1364.
- Noah, T.K., Donahue, B. and Shroyer, N.F. 2011. Intestinal development and differentiation. *Experimental cell research*. **317**(19), pp.2702–2710.
- Nolte, D., Niemann, S. and Müller, U. 2003. Specific sequence changes in multiple transcript system DYT3 are associated with X-linked dystonia parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**(18), pp.10347–10352.
- Noordhuis, P., Holwerda, U., Van der Wilt, C.L., Van Groeningen, C.J., Smid, K., Meijer, S., Pinedo, H.M. and Peters, G.J. 2004. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Annals of Oncology*. **15**(7), pp.1025–1032.
- Nowell, P.C. 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science (New York, N.Y.)*. **194**(4260), pp.23–28.
- Obama, K., Kanai, M., Kawai, Y., Fukushima, M. and Takabayashi, A. 2002. Role of retinoblastoma protein and E2F-1 transcription factor in the acquisition of 5-fluorouracil resistance by colon cancer cells. *International Journal of Oncology*. **21**(2), pp.309–314.
- Obre, E. and Rossignol, R. 2015. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **59**, pp.167–181.
- O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S. and Dick, J.E. 2007. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. **445**(7123), pp.106–110.
- Ochiai, T., Nishimura, K., Noguchi, H., Kitajima, M., Tsukada, A., Watanabe, E., Nagaoka, I. and Futagawa, S. 2006. Prognostic impact of orotate phosphoribosyl transferase among 5-fluorouracil metabolic enzymes in resectable colorectal cancers treated by oral 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *International Journal of Cancer*. **118**(12), pp.3084–3088.
- O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., Friend, S., Fornace, A.J. and Kohn, K.W. 1997. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Research*. **57**(19), pp.4285–4300.

- O'Donnell, N., Zachara, N.E., Hart, G.W. and Marth, J.D. 2004. Ogt-Dependent X-Chromosome-Linked Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability. *Molecular and Cellular Biology*. **24**(4), pp.1680–1690.
- Offer, S.M., Fossum, C.C., Wegner, N.J., Stuflesser, A.J., Butterfield, G.L. and Diasio, R.B. 2014. Comparative functional analysis of DPYD variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Cancer research*. **74**(9), pp.2545–2554.
- Ogawa, F., Malavasi, E.L.V., Crummie, D.K., Eykelenboom, J.E., Soares, D.C., Mackie, S., Porteous, D.J. and Millar, J.K. 2014. DISC1 complexes with TRAK1 and Miro1 to modulate anterograde axonal mitochondrial trafficking. *Human Molecular Genetics*. **23**(4), pp.906–919.
- Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N. and Gotoh, Y. 2002. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**(24), pp.21843–21850.
- Oguri, T., Bessho, Y., Achiwa, H., Ozasa, H., Maeno, K., Maeda, H., Sato, S. and Ueda, R. 2007. MRP8/ABCC11 directly confers resistance to 5-fluorouracil. *Molecular Cancer Therapeutics*. **6**(1), pp.122–127.
- Ohn, T., Kedersha, N., Hickman, T., Tisdale, S. and Anderson, P. 2008. A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nature Cell Biology*. **10**(10), pp.1224–1231.
- Oki, T., Yamazaki, K., Kuromitsu, J., Okada, M. and Tanaka, I. 1999. cDNA Cloning and Mapping of a Novel Subtype of Glutamine:fructose-6-phosphate Amidotransferase (GFAT2) in Human and Mouse. *Genomics*. **57**(2), pp.227–234.
- Okuyama, R. and Marshall, S. 2003. UDP-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) in brain tissue: temperature sensitivity and subcellular distribution of cytosolic and nuclear enzyme. *Journal of Neurochemistry*. **86**(5), pp.1271–1280.
- Olivier, S., Mir, A.-M., Michalski, J.-C. and Lefebvre, T. 2011. Signalisation et prédispositions métaboliques liées au cancer colorectal. *médecine/sciences*. **27**(5), pp.514–520.
- Olivier-Van Stichelen, S., Dehennaut, V., Buzy, A., Zacharyus, J.-L., Guinez, C., Mir, A.-M., El Yazidi-Belkoura, I., Copin, M.-C., Boureme, D., Loyaux, D., Ferrara, P. and Lefebvre, T. 2014. O-GlcNAcylation stabilizes β -catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *The FASEB Journal*. **28**(8), pp.3325–3338.
- Olivier-Van Stichelen, S., Drougat, L., Dehennaut, V., El Yazidi-Belkoura, I., Guinez, C., Mir, A.-M., Michalski, J.-C., Vercoutter-Edouart, A.-S. and Lefebvre, T. 2012. Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis*. **1**, p.e36.
- Olivier-Van Stichelen, S., Guinez, C., Mir, A.-M., Perez-Cervera, Y., Liu, C., Michalski, J.-C. and Lefebvre, T. 2012. The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of β -catenin and cell proliferation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. **302**(4), pp.E417-424.
- Olivier-Van Stichelen, S. and Hanover, J.A. 2014. X-inactivation normalizes O-GlcNAc transferase levels and generates an O-GlcNAc-depleted Barr body. *Frontiers in Genetics*. **5**.
- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., Brunak, S. and Mann, M. 2010. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science Signaling*. **3**(104), p.ra3.
- Olsson, M., Vakifahmetoglu, H., Abruzzo, P.M., Högstrand, K., Grandien, A. and Zhivotovsky, B. 2009. DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*. **28**(18), pp.1949–1959.
- Omary, M.B., Ku, N.-O., Tao, G.-Z., Toivola, D.M. and Liao, J. 2006. 'Heads and tails' of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends in Biochemical Sciences*. **31**(7), pp.383–394.
- Ong, C.W., Kim, L.G., Kong, H.H., Low, L.Y., Iacopetta, B., Soong, R. and Salto-Tellez, M. 2010. CD133 expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. **23**(3), pp.450–457.

- O'Reilly, K.E., Rojo, F., She, Q.-B., Solit, D., Mills, G.B., Smith, D., Lane, H., Hofmann, F., Hicklin, D.J., Ludwig, D.L., Baselga, J. and Rosen, N. 2006. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Research*. **66**(3), pp.1500–1508.
- Oren, M. and Rotter, V. 2010. Mutant p53 Gain-of-Function in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **2**(2).
- Ortiz-Meoz, R.F., Jiang, J., Lazarus, M.B., Orman, M., Janetzko, J., Fan, C., Duveau, D.Y., Tan, Z.W., Thomas, C.J. and Walker, S. 2015. A small molecule that inhibits OGT activity in cells. *ACS chemical biology*. **10**(6), pp.1392–1397.
- Overath, T., Kuckelkorn, U., Henklein, P., Strehl, B., Bonar, D., Kloss, A., Siele, D., Kloetzel, P.-M. and Janek, K. 2012. Mapping of O-GlcNAc Sites of 20 S Proteasome Subunits and Hsp90 by a Novel Biotin-Cystamine Tag. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. **11**(8), p.467.
- Özcan, S., Andrali, S.S. and Cantrell, J.E.L. 2010. Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochimica et biophysica acta*. **1799**(5–6), pp.353–364.
- Paleologou, K.E., Oueslati, A., Shakked, G., Rospigliosi, C.C., Kim, H.-Y., Lamberto, G.R., Fernandez, C.O., Schmid, A., Chegini, F., Gai, W.P., Chiappe, D., Moniatte, M., Schneider, B.L., Aebischer, P., Eliezer, D., Zweckstetter, M., Masliah, E. and Lashuel, H.A. 2010. Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. **30**(9), pp.3184–3198.
- Palmirotta, R., Carella, C., Silvestris, E., Cives, M., Stucci, S.L., Tucci, M., Lovero, D. and Silvestris, F. 2018. SNPs in predicting clinical efficacy and toxicity of chemotherapy: walking through the quicksand. *Oncotarget*. **9**(38), pp.25355–25382.
- Panczyk, M. 2014. Pharmacogenetics research on chemotherapy resistance in colorectal cancer over the last 20 years. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. **20**(29), pp.9775–9827.
- Park, K., Saudek, C.D. and Hart, G.W. 2010. Increased Expression of β -N-Acetylglucosaminidase in Erythrocytes From Individuals With Pre-diabetes and Diabetes. *Diabetes*. **59**(7), pp.1845–1850.
- Park, S., Pak, J., Jang, I. and Cho, J.W. 2014. Inhibition of mTOR affects protein stability of OGT. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **453**(2), pp.208–212.
- Park, S.Y., Kim, H.S., Kim, N.H., Ji, S., Cha, S.Y., Kang, J.G., Ota, I., Shimada, K., Konishi, N., Nam, H.W., Hong, S.W., Yang, W.H., Roth, J., Yook, J.I. and Cho, J.W. 2010. Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *The EMBO Journal*. **29**(22), pp.3787–3796.
- Park, S.Y., Ryu, J. and Lee, W. 2005. O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Experimental & Molecular Medicine*. **37**(3), pp.220–229.
- Paschall, A.V., Yang, D., Lu, C., Redd, P.S., Choi, J.-H., Heaton, C.M., Lee, J.R., Nayak-Kapoor, A. and Liu, K. 2016. CD133+CD24^{lo} defines a 5-Fluorouracil-resistant colon cancer stem cell-like phenotype. *Oncotarget*. **7**(48), pp.78698–78712.
- Patel, D., Townsend, A.R., Karapetis, C., Beeke, C., Padbury, R., Roy, A., Maddern, G., Roder, D. and Price, T.J. 2016. Is Survival for Patients with Resectable Lung Metastatic Colorectal Cancer Comparable to Those with Resectable Liver Disease? Results from the South Australian Metastatic Colorectal Registry. *Annals of Surgical Oncology*. **23**(11), pp.3616–3622.
- Patel, M., Horgan, P.G., McMillan, D.C. and Edwards, J. 2018. NF- κ B pathways in the development and progression of colorectal cancer. *Translational Research*. **197**, pp.43–56.
- Patti, M.E., Virkamäki, A., Landaker, E.J., Kahn, C.R. and Yki-Järvinen, H. 1999. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes*. **48**(8), pp.1562–1571.
- Pederson, N.V., Zanghi, J.A., Miller, W.M. and Knop, R.H. 1994. Discrimination of fluorinated uridine metabolites in N-417 small cell lung cancer cell extracts via 19F- and 31P-NMR. *Magnetic Resonance in Medicine*. **31**(2), pp.224–228.
- Pekkurnaz, G., Trinidad, J.C., Wang, X., Kong, D. and Schwarz, T.L. 2014. Glucose Regulates Mitochondrial Motility via Milton Modification by O-GlcNAc Transferase. *Cell*. **158**(1), pp.54–68.
- Peña, M.M.O., Melo, S.P., Xing, Y.-Y., White, K., Barbour, K.W. and Berger, F.G. 2009. The Intrinsically Disordered N-terminal Domain of Thymidylate Synthase Targets the Enzyme to the Ubiquitin-

- independent Proteasomal Degradation Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(46), pp.31597–31607.
- Peña, M.M.O., Xing, Y.Y., Koli, S. and Berger, F.G. 2006. Role of N-terminal residues in the ubiquitin-independent degradation of human thymidylate synthase. *The Biochemical Journal*. **394**(Pt 1), pp.355–363.
- Peng, C., Zhu, Y., Zhang, W., Liao, Q., Chen, Y., Zhao, X., Guo, Q., Shen, P., Zhen, B., Qian, X., Yang, D., Zhang, J.-S., Xiao, D., Qin, W. and Pei, H. 2017. Regulation of the Hippo-YAP Pathway by Glucose Sensor O-GlcNAcylation. *Molecular Cell*. **68**(3), pp.591-604.e5.
- Perez, M. and Hirschberg, C.B. 1987. Transport of sugar nucleotides into the lumen of vesicles derived from rat liver rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Methods in Enzymology*. **138**, pp.709–715.
- Perez-Cervera, Y., Dehennaut, V., Gil, M.A., Guedri, K., Mata, C.J.S., Stichelen, S.O.-V., Michalski, J.-C., Foulquier, F. and Lefebvre, T. 2013. Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *The FASEB Journal*, fj.12-217984.
- Perry, K.M., Carreras, C.W., Chang, L.C., Santi, D.V. and Stroud, R.M. 1993. Structures of thymidylate synthase with a C-terminal deletion: Role of the C-terminus in alignment of 2'-deoxyuridine 5'-monophosphate and 5,10-methylenetetrahydrofolate. *Biochemistry*. **32**(28), pp.7116–7125.
- del Peso, L., González-García, M., Page, C., Herrera, R. and Nuñez, G. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science (New York, N.Y.)*. **278**(5338), pp.687–689.
- Peták, I., Tillman, D.M. and Houghton, J.A. 2000. p53 Dependence of Fas Induction and Acute Apoptosis in Response to 5-Fluorouracil-Leucovorin in Human Colon Carcinoma Cell Lines. *Clinical Cancer Research*. **6**(11), pp.4432–4441.
- Peters, G.J., Backus, H.H.J., Freemantle, S., van Triest, B., Codacci-Pisanelli, G., van der Wilt, C.L., Smid, K., Lunec, J., Calvert, A.H., Marsh, S., McLeod, H.L., Bloemena, E., Meijer, S., Jansen, G., van Groeningen, C.J. and Pinedo, H.M. 2002. Induction of thymidylate synthase as a 5-fluorouracil resistance mechanism. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1587**(2–3), pp.194–205.
- Petronzelli, F., Riccio, A., Markham, G.D., Seeholzer, S.H., Stoerker, J., Genuardi, M., Yeung, A.T., Matsumoto, Y. and Bellacosa, A. 2000. Biphasic Kinetics of the Human DNA Repair Protein MED1 (MBD4), a Mismatch-specific DNA N-Glycosylase. *Journal of Biological Chemistry*. **275**(42), pp.32422–32429.
- Pettersen, H.S., Sundheim, O., Gilljam, K.M., Slupphaug, G., Krokan, H.E. and Kavli, B. 2007. Uracil–DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms. *Nucleic Acids Research*. **35**(12), pp.3879–3892.
- Phan, J., Steadman, D.J., Koli, S., Ding, W.C., Minor, W., Dunlap, R.B., Berger, S.H. and Lebioda, L. 2001. Structure of human thymidylate synthase suggests advantages of chemotherapy with noncompetitive inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**(17), pp.14170–14177.
- Phua, L.C., Mal, M., Koh, P.K., Cheah, P.Y., Chan, E.C.Y. and Ho, H.K. 2013. Investigating the role of nucleoside transporters in the resistance of colorectal cancer to 5-fluorouracil therapy. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. **71**(3), pp.817–823.
- Pierres, M., Naquet, P., Barbet, J., Marchetto, S., Marics, I., Devaux, C., Barad, M., Hyman, R. and Rougon, G. 1987. Evidence that murine hematopoietic cell subset marker J11d is attached to a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *European Journal of Immunology*. **17**(12), pp.1781–1785.
- Pino, M.S. and Chung, D.C. 2010. THE CHROMOSOMAL INSTABILITY PATHWAY IN COLON CANCER. *Gastroenterology*. **138**(6), pp.2059–2072.
- Polevoda, B. and Sherman, F. 2003. N-terminal Acetyltransferases and Sequence Requirements for N-terminal Acetylation of Eukaryotic Proteins. *Journal of Molecular Biology*. **325**(4), pp.595–622.
- Poulogiannis, G., Luo, F. and Arends, M.J. 2012. RAS signalling in the colorectum in health and disease. *Cell Communication & Adhesion*. **19**(1), pp.1–9.
- Powell, C.M., Rudge, T.L., Zhu, Q., Johnson, L.F. and Hansen, U. 2000. Inhibition of the mammalian transcription factor LSF induces S-phase-dependent apoptosis by downregulating thymidylate synthase expression. *The EMBO journal*. **19**(17), pp.4665–4675.

- Pozo, K.B.K. and Stephenson, F.A. 2011. N-acetylglucosamine transferase is an integral component of a kinesin-directed mitochondrial trafficking complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. **1813**(1), pp.269–281.
- Pozzi, C., Ferrari, S., Luciani, R., Tassone, G., Costi, M.P. and Mangani, S. 2019. Structural Comparison of *Enterococcus faecalis* and Human Thymidylate Synthase Complexes with the Substrate dUMP and Its Analogue FdUMP Provides Hints about Enzyme Conformational Variabilities. *Molecules (Basel, Switzerland)*. **24**(7).
- Pozzi, C., Lopresti, L., Santucci, M., Costi, M.P. and Mangani, S. 2019. Evidence of Destabilization of the Human Thymidylate Synthase (hTS) Dimeric Structure Induced by the Interface Mutation Q62R. *Biomolecules*. **9**(4).
- Prakash, S. and Swaminathan, U. 2015. β catenin in health: A review. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology : JOMFP*. **19**(2), pp.230–238.
- Pratt, S., Shepard, R.L., Kandasamy, R.A., Johnston, P.A., Perry, W. and Dantzig, A.H. 2005. The multidrug resistance protein 5 (ABCC5) confers resistance to 5-fluorouracil and transports its monophosphorylated metabolites. *Molecular Cancer Therapeutics*. **4**(5), pp.855–863.
- Pravata, V.M., Gundogdu, M., Bartual, S.G., Ferenbach, A.T., Stavridis, M., Öunap, K., Pajusalu, S., Žordania, R., Wojcik, M.H. and van Aalten, D.M.F. 2019. A missense mutation in the catalytic domain of O-GlcNAc transferase links perturbations in protein O-GlcNAcylation to X-linked intellectual disability. *FEBS letters*.
- Pretlow, T.P., O’Riordan, M.A., Pretlow, T.G. and Stellato, T.A. 1992. Aberrant crypts in human colonic mucosa: putative preneoplastic lesions. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*. **16G**, pp.55–62.
- Pritchard, D.M., Potten, C.S. and Hickman, J.A. 1998. The relationships between p53-dependent apoptosis, inhibition of proliferation, and 5-fluorouracil-induced histopathology in murine intestinal epithelia. *Cancer Research*. **58**(23), pp.5453–5465.
- Pullarkat, S.T., Stoehlmacher, J., Ghaderi, V., Xiong, Y.P., Ingles, S.A., Sherrod, A., Warren, R., Tsao-Wei, D., Groshen, S. and Lenz, H.J. 2001. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *The Pharmacogenomics Journal*. **1**(1), pp.65–70.
- van der Put, N.M., Gabreëls, F., Stevens, E.M., Smeitink, J.A., Trijbels, F.J., Eskes, T.K., van den Heuvel, L.P. and Blom, H.J. 1998. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *American Journal of Human Genetics*. **62**(5), pp.1044–1051.
- Qian, Y., Ahmad, M., Chen, S., Gillespie, P., Le, N., Mennona, F., Mischke, S., So, S.-S., Wang, H., Burghardt, C., Tannu, S., Conde-Knape, K., Kochan, J. and Bolin, D. 2011. Discovery of 1-arylcarbonyl-6,7-dimethoxyisoquinoline derivatives as glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **21**(21), pp.6264–6269.
- Qin, L., Zhang, X., Zhang, L., Feng, Y., Weng, G.-X., Li, M.-Z., Kong, Q.-L., Qian, C.-N., Zeng, Y.-X., Zeng, M.-S., Liao, D.-F. and Song, L.-B. 2008. Downregulation of BMI-1 enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **371**(3), pp.531–535.
- Qin, W., Lv, P., Fan, X., Quan, B., Zhu, Y., Qin, K., Chen, Y., Wang, C. and Chen, X. 2017. Quantitative time-resolved chemoproteomics reveals that stable O-GlcNAc regulates box C/D snoRNP biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **114**(33), pp.E6749–E6758.
- de Queiroz, R.M., Madan, R., Chien, J., Dias, W.B. and Slawson, C. 2016. Changes in O-Linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Homeostasis Activate the p53 Pathway in Ovarian Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **291**(36), pp.18897–18914.
- Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R.R., Mohan, A., Heyen, J.W., Goebel, M.G. and Iakoucheva, L.M. 2010. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins*. **78**(2), pp.365–380.
- Rafie, K., Raimi, O., Ferenbach, A.T., Borodkin, V.S., Kapuria, V. and van Aalten, D.M.F. 2017. Recognition of a glycosylation substrate by the O-GlcNAc transferase TPR repeats. *Open Biology*. **7**(6).

- Rahman, L., Voeller, D., Rhaman, M., Lipkowitz, S., Allegra, C., Barrett, J., Kaye, J. and Zajac-Kaye, M. 2004. Thymidylate synthase as an oncogene: a novel role for an essential DNA synthesis enzyme. - PubMed - NCBI. *Cancer Cell*. **5**(4), pp.341–51.
- Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Velculescu, V.E. 2002. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. **418**(6901), p.934.
- Ramakrishnan, B. and Qasba, P.K. 2002. Structure-based Design of β 1,4-Galactosyltransferase I (β 4Gal-T1) with Equally Efficient N-Acetylgalactosaminyltransferase Activity POINT MUTATION BROADENS β 4Gal-T1 DONOR SPECIFICITY. *Journal of Biological Chemistry*. **277**(23), pp.20833–20839.
- Ramirez-Correa, G.A., Jin, W., Wang, Z., Zhong, X., Gao, W.D., Dias, W.B., Vecoli, C., Hart, G.W. and Murphy, A.M. 2008. O-linked GlcNAc Modification of Cardiac Myofilament Proteins: A Novel Regulator of Myocardial Contractile Function. *Circulation research*. **103**(12), pp.1354–1358.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C. and Perucho, M. 1997. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science (New York, N.Y.)*. **275**(5302), pp.967–969.
- Ranuncolo, S.M., Ghosh, S., Hanover, J.A., Hart, G.W. and Lewis, B.A. 2012. Evidence of the Involvement of O-GlcNAc-modified Human RNA Polymerase II CTD in Transcription in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. **287**(28), pp.23549–23561.
- Rao, F.V., Schüttelkopf, A.W., Dorfmüller, H.C., Ferenbach, A.T., Navratilova, I. and van Aalten, D.M.F. 2013. Structure of a bacterial putative acetyltransferase defines the fold of the human O-GlcNAcase C-terminal domain. *Open Biology*. **3**(10).
- Ravid, T. and Hochstrasser, M. 2008. Degradation signal diversity in the ubiquitin-proteasome system. *Nature reviews. Molecular cell biology*. **9**(9), pp.679–690.
- Reaven, G.M., Bernstein, R., Davis, B. and Olefsky, J.M. 1976. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? *The American Journal of Medicine*. **60**(1), pp.80–88.
- Ree, R., Varland, S. and Arnesen, T. 2018. Spotlight on protein N-terminal acetylation. *Experimental & Molecular Medicine*. **50**(7).
- Reeves, R.A., Lee, A., Henry, R. and Zachara, N.E. 2014. Characterization of the specificity of O-GlcNAc reactive antibodies under conditions of starvation and stress. *Analytical Biochemistry*. **457**, pp.8–18.
- Reinhardt, H.C. and Schumacher, B. 2012. The p53 network: Cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends in genetics : TIG*. **28**(3), pp.128–136.
- Reita, D., Bour, C., Benbrika, R., Groh, A., Pencreach, E., Guérin, E. and Guenot, D. 2019. Synergistic Anti-Tumor Effect of mTOR Inhibitors with Irinotecan on Colon Cancer Cells. *Cancers*. **11**(10).
- Remick, S.C., Grem, J.L., Fischer, P.H., Tutsch, K.D., Alberti, D.B., Nieting, L.M., Tombes, M.B., Bruggink, J., Willson, J.K. and Trump, D.L. 1990. Phase I trial of 5-fluorouracil and dipyrindimole administered by seventy-two-hour concurrent continuous infusion. *Cancer Research*. **50**(9), pp.2667–2672.
- Resto, M., Kim, B.-H., Fernandez, A.G., Abraham, B.J., Zhao, K. and Lewis, B.A. 2016. O-GlcNAcase Is an RNA Polymerase II Elongation Factor Coupled to Pausing Factors SPT5 and TIF1 β . *The Journal of Biological Chemistry*. **291**(43), pp.22703–22713.
- Rexach, J., Rogers, C., Yu, S., Tao, J., Sun, Y. and Hsieh-Wilson, L. 2010. Quantitation of O-Glycosylation Stoichiometry and Dynamics using Resolvable Mass Tags. *Nature Chemical Biology*. **6**(9), pp.645–651.
- Rexach, J.E., Clark, P.M. and Hsieh-Wilson, L.C. 2008. Chemical approaches to understanding O-GlcNAc glycosylation in the brain. *Nature Chemical Biology*. **4**(2), pp.97–106.
- Rex-Mathes, M., Werner, S., Strutas, D., Griffith, L.S., Viebahn, C., Thelen, K. and Schmitz, B. 2001. O-GlcNAc expression in developing and ageing mouse brain. *Biochimie*. **83**(7), pp.583–590.
- Riahi-Chebbi, I., Soud, S., Othman, H., Haoues, M., Karoui, H., Morel, A., Srairi-Abid, N., Essafi, M. and Essafi-Benkhadir, K. 2019. The Phenolic compound Kaempferol overcomes 5-fluorouracil resistance in human resistant LS174 colon cancer cells. *Scientific Reports*. **9**(1), p.195.
- Ribic, C.M., Sargent, D.J., Moore, M.J., Thibodeau, S.N., French, A.J., Goldberg, R.M., Hamilton, S.R., Laurent-Puig, P., Gryfe, R., Shepherd, L.E., Tu, D., Redston, M. and Gallinger, S. 2003. Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer. *The New England journal of medicine*. **349**(3), pp.247–257.

- Riccio, A., Aaltonen, L.A., Godwin, A.K., Loukola, A., Percesepe, A., Salovaara, R., Masciullo, V., Genuardi, M., Paravatou-Petsotas, M., Bassi, D.E., Ruggeri, B.A., Klein-Szanto, A.J., Testa, J.R., Neri, G. and Bellacosa, A. 1999. The DNA repair gene MBD4 (MED1) is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. *Nature Genetics*. **23**(3), pp.266–268.
- Rigbolt, K.T.G., Prokhorova, T.A., Akimov, V., Henningsen, J., Johansen, P.T., Kratchmarova, I., Kassem, M., Mann, M., Olsen, J.V. and Blagoev, B. 2011. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Science Signaling*. **4**(164), p.rs3.
- Rios, P., Carter, T.S., Mooibroek, T.J., Crump, M.P., Lisbjerg, M., Pittelkow, M., Supekar, N.T., Boons, G.-J. and Davis, A.P. 2016. Synthetic Receptors for the High-Affinity Recognition of O-GlcNAc Derivatives. *Angewandte Chemie*. **128**(10), pp.3448–3453.
- Ripberger, E., Linnebacher, M., Schwitalle, Y., Gebert, J. and von Knebel Doeberitz, M. 2003. Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene. *Journal of Clinical Immunology*. **23**(5), pp.415–423.
- Roos, M.D. and Hanover, J.A. 2000. Structure of O-linked GlcNAc transferase: mediator of glycan-dependent signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **271**(2), pp.275–280.
- Roos, M.D., Su, K., Baker, J.R. and Kudlow, J.E. 1997. O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Molecular and Cellular Biology*. **17**(11), pp.6472–6480.
- Roos, M.D., Xie, W., Su, K., Clark, J.A., Yang, X., Chin, E., Paterson, A.J. and Kudlow, J.E. 1998. Streptozotocin, an analog of N-acetylglucosamine, blocks the removal of O-GlcNAc from intracellular proteins. *Proceedings of the Association of American Physicians*. **110**(5), pp.422–432.
- Roquemore, E.P., Chevrier, M.R., Cotter, R.J. and Hart, G.W. 1996. Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein alpha B-crystallin. *Biochemistry*. **35**(11), pp.3578–3586.
- Rossetti, L., Hawkins, M., Chen, W., Gindi, J. and Barzilai, N. 1995. In vivo glucosamine infusion induces insulin resistance in normoglycemic but not in hyperglycemic conscious rats. *The Journal of Clinical Investigation*. **96**(1), pp.132–140.
- Rosson, D., Otwell, H.B. and Dunlap, R.B. 1980. Essential tyrosyl residues in *Lactobacillus casei* thymidylate synthetase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **97**(2), pp.500–505.
- Rozanski, W., Krzeslak, A., Forma, E., Brys, M., Blewniewski, M., Wozniak, P. and Lipinski, M. 2012. Prediction of bladder cancer based on urinary content of MGEA5 and OGT mRNA level. *Clinical Laboratory*. **58**(5–6), pp.579–583.
- Ruan, H.-B., Han, X., Li, M.-D., Singh, J.P., Qian, K., Azarhoush, S., Zhao, L., Bennett, A.M., Samuel, V.T., Wu, J., Yates, J.R. and Yang, X. 2012. O-GlcNAc Transferase/Host Cell Factor C1 Complex Regulates Gluconeogenesis by Modulating PGC-1 α Stability. *Cell metabolism*. **16**(2), pp.226–237.
- Ruan, H.-B., Nie, Y. and Yang, X. 2013. Regulation of Protein Degradation by O-GlcNAcylation: Crosstalk with Ubiquitination. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. **12**(12), pp.3489–3497.
- Ruan, H.-B., Singh, J.P., Li, M.-D., Wu, J. and Yang, X. 2013. Cracking the O-GlcNAc Code in Metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. **24**(6), pp.301–309.
- Rutman, R.J., Cantarow, A., Paschkis, E. and Allanoff, B. 1953. Studies on uracil utilization normal and acetaminofluorene-treated rats. *Science (New York, N.Y.)*. **117**(3037), pp.282–283.
- Ryan, P., Xu, M.-M., Davey, A.K., Kassiou, M., Mellick, G.D. and Rudrawar, S. 2020. O-GlcNAcylation of truncated NAC segment alters peptide-dependent effects on α -synuclein aggregation. *Bioorganic Chemistry*. **94**, p.103389.
- Ryu, I.-H. and Do, S.-I. 2011. Denitrosylation of S-nitrosylated OGT is triggered in LPS-stimulated innate immune response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **408**(1), pp.52–57.
- Ryu, I.-H., Lee, K.-Y. and Do, S.-I. 2016. A β -affected pathogenic induction of S-nitrosylation of OGT and identification of Cys-NO linkage triplet. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1864**(5), pp.609–621.
- Saha, A.K., Xu, X.J., Lawson, E., Deoliveira, R., Brandon, A.E., Kraegen, E.W. and Ruderman, N.B. 2010. Downregulation of AMPK accompanies leucine- and glucose-induced increases in protein synthesis and insulin resistance in rat skeletal muscle. *Diabetes*. **59**(10), pp.2426–2434.

- Sakabe, K. and Hart, G.W. 2010. O-GlcNAc Transferase Regulates Mitotic Chromatin Dynamics. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**(45), pp.34460–34468.
- Sakabe, K., Wang, Z. and Hart, G.W. 2010. β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**(46), pp.19915–19920.
- Sakaidani, Y., Nomura, T., Matsuura, A., Ito, M., Suzuki, E., Murakami, K., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K. and Okajima, T. 2011. O-linked-N-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell-matrix interactions. *Nature Communications*. **2**, p.583.
- Salonga, D., Danenberg, K.D., Johnson, M., Metzger, R., Groshen, S., Tsao-Wei, D.D., Lenz, H.-J., Leichman, C.G., Leichman, L., Diasio, R.B. and Danenberg, P.V. 2000. Colorectal Tumors Responding to 5-Fluorouracil Have Low Gene Expression Levels of Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Thymidylate Synthase, and Thymidine Phosphorylase. *Clinical Cancer Research*. **6**(4), pp.1322–1327.
- Saltz, L.B., Cox, J.V., Blanke, C., Rosen, L.S., Fehrenbacher, L., Moore, M.J., Maroun, J.A., Ackland, S.P., Locker, P.K., Pirodda, N., Elfring, G.L. and Miller, L.L. 2000. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *The New England Journal of Medicine*. **343**(13), pp.905–914.
- Samsonoff, W.A., Reston, J., McKee, M., O'Connor, B., Galivan, J., Maley, G. and Maley, F. 1997. Intracellular Location of Thymidylate Synthase and Its State of Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. **272**(20), pp.13281–13285.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S.M., Riggins, G.J., Willson, J.K.V., Markowitz, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Velculescu, V.E. 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science (New York, N.Y.)*. **304**(5670), p.554.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L., Unsal-Kaçmaz, K. and Linn, S. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. - PubMed - NCBI. *Annual Review of Biochemistry*. **73**, pp.39–85.
- Sandström, M., Freij, A., Larsson, R., Nygren, P., Fjällskog, M.L., Bergh, J. and Karlsson, M.O. 2016. Lack of relationship between systemic exposure for the component drug of the fluorouracil, epirubicin, and 4-hydroxycyclophosphamide regimen in breast cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*.
- Sansom, O.J., Zabkiewicz, J., Bishop, S.M., Guy, J., Bird, A. and Clarke, A.R. 2003. MBD4 deficiency reduces the apoptotic response to DNA-damaging agents in the murine small intestine. *Oncogene*. **22**(46), p.7130.
- Sarkar, M., Khare, V., Guturi, K.K.N., Das, N. and Ghosh, M.K. 2015. The DEAD box protein p68: a crucial regulator of AKT/FOXO3a signaling axis in oncogenesis. *Oncogene*. **34**(47), pp.5843–5856.
- Sasaki, S., Watanabe, T., Kobunai, T., Konishi, T., Kitayama, J. and Nagawa, H. 2005. High hRFI expression correlates with resistance to fluoropyrimidines in human colon cancer cell lines and in xenografts. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*. **24**(3), pp.397–403.
- Sasaki, S., Watanabe, T., Kobunai, T., Konishi, T., Nagase, H., Sugimoto, Y., Oka, T. and Nagawa, H. 2006. hRFI overexpressed in HCT116 cells modulates Bcl-2 family proteins when treated with 5-fluorouracil. *Oncology Reports*. **15**(5), pp.1293–1298.
- Sawaguchi, S., Varshney, S., Ogawa, M., Sakaidani, Y., Yagi, H., Takeshita, K., Murohara, T., Kato, K., Sundaram, S., Stanley, P. and Okajima, T. 2017. O-GlcNAc on NOTCH1 EGF repeats regulates ligand-induced Notch signaling and vascular development in mammals. *eLife*. **6**.
- Sayat, R., Leber, B., Grubac, V., Wiltshire, L. and Persad, S. 2008. O-GlcNAc-glycosylation of β -catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Experimental Cell Research*. **314**(15), pp.2774–2787.
- Schaefer, M., Roots, I. and Gerloff, T. 2006. In-vitro transport characteristics discriminate wild-type ABCB1 (MDR1) from ALA893SER and ALA893THR polymorphisms. *Pharmacogenetics and Genomics*. **16**(12), pp.855–861.
- Schetter, A., Leung, S., Sohn, J., Zanetti, K., Browman, E., Yanaihara, N., Yuen, S., Chan, T., Kwong, D., Au, G., Liu, C., Calin, G., Croce, C. and Harris, C. 2008. MicroRNA Expression Profiles Associated With Prognosis and Therapeutic Outcome in Colon Adenocarcinoma. *JAMA*. **299**(4), pp.425–436.

- Schiffer, C.A., Davisson, V.J., Santi, D.V. and Stroud, R.M. 1991. Crystallization of human thymidylate synthase. *Journal of Molecular Biology*. **219**(2), pp.161–163.
- Schirm, M., Kalmokoff, M., Aubry, A., Thibault, P., Sandoz, M. and Logan, S.M. 2004. Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine. *Journal of Bacteriology*. **186**(20), pp.6721–6727.
- Schorderet-Slatkine, S. 1972. Action of progesterone and related steroids on oocyte maturation in *Xenopus laevis*. An in vitro study. *Cell Differentiation*. **1**(3), pp.179–189.
- Schultz, J. and Pils, B. 2002. Prediction of structure and functional residues for O-GlcNAcase, a divergent homologue of acetyltransferases. *FEBS Letters*. **529**(2–3), pp.179–182.
- Schwartz, E.L., Baptiste, N., Wadler, S. and Makower, D. 1995. Thymidine phosphorylase mediates the sensitivity of human colon carcinoma cells to 5-fluorouracil. *The Journal of Biological Chemistry*. **270**(32), pp.19073–19077.
- Seeliger, H., Guba, M., Koehl, G.E., Doenecke, A., Steinbauer, M., Bruns, C.J., Wagner, C., Frank, E., Jauch, K.-W. and Geissler, E.K. 2004. Blockage of 2-Deoxy-d-Ribose-Induced Angiogenesis with Rapamycin Counteracts a Thymidine Phosphorylase-Based Escape Mechanism Available for Colon Cancer under 5-Fluorouracil Therapy. *Clinical Cancer Research*. **10**(5), pp.1843–1852.
- Sekine, H., Okazaki, K., Kato, K., Alam, M.M., Shima, H., Katsuoka, F., Tsujita, T., Suzuki, N., Kobayashi, A., Igarashi, K., Yamamoto, M. and Motohashi, H. 2018. O-GlcNAcylation Signal Mediates Proteasome Inhibitor Resistance in Cancer Cells by Stabilizing NRF1. *Molecular and Cellular Biology*. **38**(17).
- Selnick, H.G., Hess, J.F., Tang, C., Liu, K., Schachter, J.B., Ballard, J.E., Marcus, J., Klein, D.J., Wang, X., Pearson, M., Savage, M.J., Kaul, R., Li, T.-S., Vocadlo, D.J., Zhou, Y., Zhu, Y., Mu, C., Wang, Y., Wei, Z., Bai, C., Duffy, J.L. and McEachern, E.J. 2019. Discovery of MK-8719, a Potent O-GlcNAcase Inhibitor as a Potential Treatment for Tauopathies. *Journal of Medicinal Chemistry*. **62**(22), pp.10062–10097.
- Senderek, J., Müller, J.S., Dusl, M., Strom, T.M., Guergueltcheva, V., Diepolder, I., Laval, S.H., Maxwell, S., Cossins, J., Krause, S., Muelas, N., Vilchez, J.J., Colomer, J., Mallebrera, C.J., Nascimento, A., Nafissi, S., Kariminejad, A., Nilipour, Y., Bozorgmehr, B., Najmabadi, H., Rodolico, C., Sieb, J.P., Steinlein, O.K., Schlotter, B., Schoser, B., Kirschner, J., Herrmann, R., Voit, T., Oldfors, A., Lindbergh, C., Urtizbera, A., von der Hagen, M., Hübner, A., Palace, J., Bushby, K., Straub, V., Beeson, D., Abicht, A. and Lochmüller, H. 2011. Hexosamine Biosynthetic Pathway Mutations Cause Neuromuscular Transmission Defect. *American Journal of Human Genetics*. **88**(2), pp.162–172.
- Seo, H.G., Kim, H.B., Kang, M.J., Ryum, J.H., Yi, E.C. and Cho, J.W. 2016. Identification of the nuclear localisation signal of O-GlcNAc transferase and its nuclear import regulation. *Scientific Reports*. **6**, p.34614.
- Shafi, R., Iyer, S.P., Ellies, L.G., O'Donnell, N., Marek, K.W., Chui, D., Hart, G.W. and Marth, J.D. 2000. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**(11), pp.5735–5739.
- Shah, O.J., Wang, Z. and Hunter, T. 2004. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Current biology: CB*. **14**(18), pp.1650–1656.
- Shaheen, R., Aglan, M., Keppler-Noreuil, K., Faqeh, E., Ansari, S., Horton, K., Ashour, A., Zaki, M.S., Al-Zahrani, F., Cueto-González, A.M., Abdel-Salam, G., Temtamy, S. and Alkuraya, F.S. 2013. Mutations in EOGT confirm the genetic heterogeneity of autosomal-recessive Adams-Oliver syndrome. *American Journal of Human Genetics*. **92**(4), pp.598–604.
- Shang, S., Hua, F. and Hu, Z.-W. 2017. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget*. **8**(20), pp.33972–33989.
- Shang, X., Li, Yanping, Liu, A., Zhang, Q., Hu, X., Du, S., Ma, J., Xu, G., Li, Ying, Guo, H., Du, L. and Ma, G. 2012. Dietary pattern and its association with the prevalence of obesity and related cardiometabolic risk factors among Chinese children. *PloS One*. **7**(8), p.e43183.
- Sharma, K., D'Souza, R.C.J., Tyanova, S., Schaab, C., Wiśniewski, J.R., Cox, J. and Mann, M. 2014. Ultradeep Human Phosphoproteome Reveals a Distinct Regulatory Nature of Tyr and Ser/Thr-Based Signaling. *Cell Reports*. **8**(5), pp.1583–1594.

- Shen, D.L., Gloster, T.M., Yuzwa, S.A. and Vocadlo, D.J. 2012. Insights into O-linked N-acetylglucosamine ([O-9]O-GlcNAc) processing and dynamics through kinetic analysis of O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase activity on protein substrates. *The Journal of Biological Chemistry*. **287**(19), pp.15395–15408.
- Shen, D.L., Liu, T.-W., Zandberg, W., Clark, T., Eskandari, R., Alteen, M.G., Tan, H.Y., Zhu, Y., Cecioni, S. and Vocadlo, D. 2017. Catalytic Promiscuity of O-GlcNAc Transferase Enables Unexpected Metabolic Engineering of Cytoplasmic Proteins with 2-Azido-2-deoxy-glucose. *ACS chemical biology*. **12**(1), pp.206–213.
- Shen, L., Toyota, M., Kondo, Y., Lin, E., Zhang, L., Guo, Y., Hernandez, N.S., Chen, X., Ahmed, S., Konishi, K., Hamilton, S.R. and Issa, J.-P.J. 2007. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**(47), pp.18654–18659.
- Shi, H., Munk, A., Nielsen, T.S., Daughtry, M.R., Larsson, L., Li, S., Høyer, K.F., Geisler, H.W., Sulek, K., Kjøbsted, R., Fisher, T., Andersen, M.M., Shen, Z., Hansen, U.K., England, E.M., Cheng, Z., Højlund, K., Wojtaszewski, J.F.P., Yang, X., Hulver, M.W., Helm, R.F., Treebak, J.T. and Gerrard, D.E. 2018. Skeletal muscle O-GlcNAc transferase is important for muscle energy homeostasis and whole-body insulin sensitivity. *Molecular Metabolism*. **11**, pp.160–177.
- Shi, J., Gu, Jin-hua, Dai, C., Gu, Jianlan, Jin, X., Sun, J., Iqbal, K., Liu, F. and Gong, C.-X. 2015. O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling. *Scientific Reports*. **5**, p.14500.
- Shi, Y., Tomic, J., Wen, F., Shaha, S., Bahlo, A., Harrison, R., Dennis, J., Williams, R., Gross, B., Walker, S., Zuccolo, J., Deans, J., Hart, G. and Spaner, D. 2010. Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. **24**(9), pp.1588–1598.
- Shin, H., Cha, H.-J., Na, K., Lee, M.J., Cho, J.-Y., Kim, C.-Y., Kim, E.K., Kang, C.M., Kim, H. and Paik, Y.-K. 2018. O-GlcNAcylation of the Tumor Suppressor FOXO3 Triggers Aberrant Cancer Cell Growth. *Cancer Research*. **78**(5), pp.1214–1224.
- Shin, S.-H., Love, D.C. and Hanover, J.A. 2011. Elevated O-GlcNAc-dependent signaling through inducible mOGT expression selectively triggers apoptosis. *Amino Acids*. **40**(3), pp.885–893.
- Shrikhande, G.V., Scali, S.T., da Silva, C.G., Damrauer, S.M., Csizmadia, E., Putheti, P., Matthey, M., Arjoon, R., Patel, R., Siracuse, J.J., Maccariello, E.R., Andersen, N.D., Monahan, T., Peterson, C., Essayagh, S., Studer, P., Padilha Guedes, R., Kocher, O., Usheva, A., Veves, A., Kaczmarek, E. and Ferran, C. 2010. O-Glycosylation Regulates Ubiquitination and Degradation of the Anti-Inflammatory Protein A20 to Accelerate Atherosclerosis in Diabetic ApoE-Null Mice. *PLoS ONE*. **5**(12).
- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. and Jemal, A. 2014. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. **64**(1), pp.9–29.
- Singh, J.P., Qian, K., Lee, J.-S., Zhou, J., Han, X., Zhang, B., Ong, Q., Ni, W., Jiang, M., Ruan, H.-B., Li, M.-D., Zhang, K., Ding, Z., Lee, P., Singh, K., Wu, J., Herzog, R.I., Kaech, S., Wendel, H.-G., Yates, J.R., Han, W., Sherwin, R.S., Nie, Y. and Yang, X. 2020. O-GlcNAcase targets pyruvate kinase M2 to regulate tumor growth. *Oncogene*. **39**(3), pp.560–573.
- Skorobogatko, Y., Landicho, A., Chalkley, R.J., Kossenkov, A.V., Gallo, G. and Vosseller, K. 2014. O-Linked β -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Site Thr-87 Regulates Synapsin I Localization to Synapses and Size of the Reserve Pool of Synaptic Vesicles. *The Journal of Biological Chemistry*. **289**(6), pp.3602–3612.
- Slawson, C., Lakshmanan, T., Knapp, S. and Hart, G.W. 2008. A Mitotic GlcNAcylation/Phosphorylation Signaling Complex Alters the Posttranslational State of the Cytoskeletal Protein Vimentin. *Molecular Biology of the Cell*. **19**(10), pp.4130–4140.
- Slawson, C., Shafii, S., Amburgey, J. and Potter, R. 2002. Characterization of the O-GlcNAc protein modification in *Xenopus laevis* oocyte during oogenesis and progesterone-stimulated maturation. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1573**(2), pp.121–129.
- Slawson, C., Zachara, N.E., Vosseller, K., Cheung, W.D., Lane, M.D. and Hart, G.W. 2005. Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**(38), pp.32944–32956.
- Smet-Nocca, C., Broncel, M., Wieruszkeski, J.-M., Tokarski, C., Hanouille, X., Leroy, A., Landrieu, I., Rolando, C., Lippens, G. and Hackenberger, C.P.R. 2011. Identification of O-GlcNAc sites within

- peptides of the Tau protein and their impact on phosphorylation. *Molecular bioSystems*. **7**(5), pp.1420–1429.
- Snow, C.M., Senior, A. and Gerace, L. 1987. Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *The Journal of Cell Biology*. **104**(5), pp.1143–1156.
- Sodi, V.L., Khaku, S., Krutilina, R., Schwab, L.P., Vocadlo, D.J., Seagroves, T.N. and Reginato, M.J. 2015. mTOR/MYC Axis Regulates O-GlcNAc Transferase (OGT) Expression and O-GlcNAcylation in Breast Cancer. *Molecular cancer research : MCR*. **13**(5), pp.923–933.
- Sohn, K.-C. and Do, S.-I. 2005. Transcriptional regulation and O-GlcNAcylation activity of zebrafish OGT during embryogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **337**(1), pp.256–263.
- Sohn, K.-C., Lee, K.-Y., Park, J.E. and Do, S.-I. 2004. OGT functions as a catalytic chaperone under heat stress response: a unique defense role of OGT in hyperthermia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **322**(3), pp.1045–1051.
- Sohn, K.-J., Croxford, R., Yates, Z., Lucock, M. and Kim, Y.-I. 2004. Effect of the Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism on Chemosensitivity of Colon and Breast Cancer Cells to 5-Fluorouracil and Methotrexate. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. **96**(2), pp.134–144.
- Solomon, D.A., Wang, Y., Fox, S.R., Lambeck, T.C., Giesting, S., Lan, Z., Senderowicz, A.M. and Knudsen, E.S. 2003. Cyclin D1 Splice Variants DIFFERENTIAL EFFECTS ON LOCALIZATION, RB PHOSPHORYLATION, AND CELLULAR TRANSFORMATION. *Journal of Biological Chemistry*. **278**(32), pp.30339–30347.
- Song, M., Kim, H.-S., Park, J.-M., Kim, S.-H., Kim, I.-H., Ryu, S.H. and Suh, P.-G. 2008. o-GlcNAc transferase is activated by CaMKIV-dependent phosphorylation under potassium chloride-induced depolarization in NG-108-15 cells. *Cellular Signalling*. **20**(1), pp.94–104.
- Soong, R., Shah, N., Salto-Tellez, M., Tai, B.C., Soo, R.A., Han, H.C., Ng, S.S., Tan, W.L., Zeps, N., Joseph, D., Diasio, R.B. and Iacopetta, B. 2008. Prognostic significance of thymidylate synthase, dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidine phosphorylase protein expression in colorectal cancer patients treated with or without 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. **19**(5), pp.915–919.
- Spano, J.-P., Lagorce, C., Atlan, D., Milano, G., Domont, J., Benamouzig, R., Attar, A., Benichou, J., Martin, A., Morere, J.-F., Raphael, M., Penault-Llorca, F., Breau, J.-L., Fagard, R., Khayat, D. and Wind, P. 2005. Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. **16**(1), pp.102–108.
- Springhorn, C., Matsha, T.E., Erasmus, R.T. and Essop, M.F. 2012. Exploring leukocyte O-GlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **97**(12), pp.4640–4649.
- Sprung, R., Chen, Y., Zhang, K., Cheng, D., Zhang, T., Peng, J. and Zhao, Y. 2008. Identification and Validation of Eukaryotic Aspartate and Glutamate Methylation in Proteins. *Journal of proteome research*. **7**(3), pp.1001–1006.
- Sprung, R., Nandi, A., Chen, Y., Kim, S.C., Barma, D., Falck, J.R. and Zhao, Y. 2005. Tagging-via-Substrate Strategy for Probing O-GlcNAc Modified Proteins. *Journal of Proteome Research*. **4**(3), pp.950–957.
- Srikanth, B., Vaidya, M.M. and Kalraiya, R.D. 2010. O-GlcNAcylation Determines the Solubility, Filament Organization, and Stability of Keratins 8 and 18. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**(44), pp.34062–34071.
- Stankova, J., Shang, J. and Rozen, R. 2005. Antisense Inhibition of Methylenetetrahydrofolate Reductase Reduces Cancer Cell Survival In vitro and Tumor Growth In vivo. *Clinical Cancer Research*. **11**(5), pp.2047–2052.
- Starska, K., Forma, E., Brzezińska-Błaszczyk, E., Lewy-Trenda, I., Bryś, M., Józwiak, P. and Krześlak, A. 2015. Gene and protein expression of O-GlcNAc-cycling enzymes in human laryngeal cancer. *Clinical and Experimental Medicine*. **15**(4), pp.455–468.
- Staudt, L.M. 2010. Oncogenic Activation of NF-κB. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **2**(6).

- Steen, E., Terry, B.M., Rivera, E.J., Cannon, J.L., Neely, T.R., Tavares, R., Xu, X.J., Wands, J.R. and de la Monte, S.M. 2005. Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. **7**(1), pp.63–80.
- Steenackers, A., Olivier-Van Stichelen, S., Baldini, S.F., Dehennaut, V., Toillon, R.-A., Le Bourhis, X., El Yazidi-Belkoura, I. and Lefebvre, T. 2016. Silencing the Nucleocytoplasmic O-GlcNAc Transferase Reduces Proliferation, Adhesion, and Migration of Cancer and Fetal Human Colon Cell Lines. *Frontiers in Endocrinology*. **7**.
- Stichelen, S.O.-V., Wang, P., Comly, M., Love, D.C. and Hanover, J.A. 2017. Nutrient-driven O-GlcNAc cycling impacts neurodevelopmental timing and metabolism. *Journal of Biological Chemistry*., jbc.M116.774042.
- Stoehlmacher, J., Goekkurt, E., Mogck, U., Aust, D.E., Kramer, M., Baretton, G.B., Liersch, T., Ehninger, G. and Jakob, C. 2008. Thymidylate synthase genotypes and tumour regression in stage II/III rectal cancer patients after neoadjuvant fluorouracil-based chemoradiation. *Cancer Letters*. **272**(2), pp.221–225.
- Sturm, I., Rau, B., Schlag, P.M., Wust, P., Hildebrandt, B., Riess, H., Hauptmann, S., Dörken, B. and Daniel, P.T. 2006. Genetic dissection of apoptosis and cell cycle control in response of colorectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy. *BMC Cancer*. **6**(1), p.124.
- Sulzyc-Bielicka, V., Domagala, P., Bielicki, D., Safranow, K., Rogowski, W. and Domagala, W. 2016. E2F1/TS Immunophenotype and Survival of Patients with Colorectal Cancer Treated with 5FU-Based Adjuvant Therapy. *Pathology Oncology Research*. **22**, pp.601–608.
- Sümeği, M., Hunyadi-Gulyás, E., Medzihradzsky, K.F. and Udvardy, A. 2003. 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **312**(4), pp.1284–1289.
- Sun, L., Yao, Y., Liu, B., Lin, Z., Lin, L., Yang, M., Zhang, W., Chen, W., Pan, C., Liu, Q., Song, E. and Li, J. 2012. MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1. *Oncogene*. **31**(4), pp.432–445.
- Suzuki, S., Iwaizumi, M., Tseng-Rogenski, S., Hamaya, Y., Miyajima, H., Kanaoka, S., Sugimoto, K. and Carethers, J.M. 2016. Production of truncated MBD4 protein by frameshift mutation in DNA mismatch repair-deficient cells enhances 5-fluorouracil sensitivity that is independent of hMLH1 status. *Cancer Biology & Therapy*. **17**(7), pp.760–768.
- Swain, S.M., Tseng, T. and Olszewski, N.E. 2001. Altered Expression of SPINDLY Affects Gibberellin Response and Plant Development. *Plant Physiology*. **126**(3), pp.1174–1185.
- Swarup, S. and Zeltser, R. 2019. Metabolic Syndrome *In: StatPearls* [Online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. [Accessed 3 January 2020]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459248/>.
- Tai, H., Khidekel, N., Ficarro, S., Peters, E. and Hsieh-Wilson, L. 2004. Parallel identification of O-GlcNAc-modified proteins from cell lysates. - PubMed - NCBI. *Journal of the American Chemical Society*. **126**(34), pp.10500–1.
- Tai, N., Schmitz, J.C., Liu, J., Lin, X., Bailly, M., Chen, T. and Chu, E. 2004. Translational autoregulation of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. **9**, pp.2521–2526.
- Tajima, A., Hess, M.T., Cabrera, B.L., Kolodner, R.D. and Carethers, J.M. 2004. The mismatch repair complex hMutS α recognizes 5-fluorouracil-modified DNA: Implications for chemosensitivity and resistance. *Gastroenterology*. **127**(6), pp.1678–1684.
- Tajima, A., Iwaizumi, M., Tseng-Rogenski, S., Cabrera, B.L. and Carethers, J.M. 2011. Both hMutS α and hMutS β DNA Mismatch Repair Complexes Participate in 5-Fluorouracil Cytotoxicity. *PLoS ONE*. **6**(12).
- Takebayashi, Y., Akiyama, S., Akiba, S., Yamada, K., Miyadera, K., Sumizawa, T., Yamada, Y., Murata, F. and Aikou, T. 1996. Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*. **88**(16), pp.1110–1117.
- Takebe, N., Zhao, S.C., Ural, A.U., Johnson, M.R., Banerjee, D., Diasio, R.B. and Bertino, J.R. 2001. Retroviral transduction of human dihydropyrimidine dehydrogenase cDNA confers resistance

- to 5-fluorouracil in murine hematopoietic progenitor cells and human CD34+-enriched peripheral blood progenitor cells. *Cancer Gene Therapy*. **8**(12), pp.966–973.
- Takeishi, K., Kaneda, S., Ayusawa, D., Shimizu, K., Gotoh, O. and Seno, T. 1985. Nucleotide sequence of a functional cDNA for human thymidylate synthase. *Nucleic Acids Research*. **13**(6), pp.2035–2043.
- Tan, D.-Q. 2019. Influence of ABCB1 (1236C > T, 2677G > T and 3435C > T) polymorphisms on the transport ability of P-gp-mediated sunitinib in Caco-2 cell line. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems.*, pp.1–8.
- Tan, E.P., McGreal, S.R., Graw, S., Tessman, R., Koppel, S.J., Dhakal, P., Zhang, Z., Machacek, M., Zachara, N.E., Koestler, D.C., Peterson, K.R., Thyfault, J.P., Swerdlow, R.H., Krishnamurthy, P., DiTacchio, L., Apte, U. and Slawson, C. 2017. Sustained O-GlcNAcylation reprograms mitochondrial function to regulate energy metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*. **292**(36), pp.14940–14962.
- Tan, E.P., Villar, M.T., E, L., Lu, J., Selfridge, J.E., Artigues, A., Swerdlow, R.H. and Slawson, C. 2014. Altering O-linked β -N-acetylglucosamine cycling disrupts mitochondrial function. *The Journal of Biological Chemistry*. **289**(21), pp.14719–14730.
- Tanaka, M., Yoshida, S., Saneyoshi, M. and Yamaguchi, T. 1981. Utilization of 5-fluoro-2'-deoxyuridine triphosphate and 5-fluoro-2'-deoxycytidine triphosphate in DNA synthesis by DNA polymerases alpha and beta from calf thymus. *Cancer Research*. **41**(10), pp.4132–4135.
- Tanaka-Nozaki, M., Onda, M., Tanaka, N. and Kato, S. 2001. Variations in 5-Fluorouracil Concentrations of Colorectal Tissues as Compared with Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Enzyme Activities and DPD Messenger RNA Levels. *Clinical Cancer Research*. **7**(9), pp.2783–2787.
- Tanaka-Nozaki, M., Tajiri, T., Tanaka, N., Furukawa, K., Takasaki, H., Yoshimura, K., Suzuki, H., Naito, Z., Sugizaki, Y., Merk, H.F., Blömeke, B. and Kato, S. 2003. Intratumoral induction of thymidylate synthase mRNA by 5-FU in colorectal cancer patients: association with survival. *Oncology Reports*. **10**(5), pp.1425–1429.
- Tarbet, H.J., Toleman, C.A. and Boyce, M. 2018. A Sweet Embrace: Control of Protein–Protein Interactions by O-Linked β -N-Acetylglucosamine. *Biochemistry*. **57**(1), pp.13–21.
- Tarrant, M.K., Rho, H.-S., Xie, Z., Jiang, Y.L., Gross, C., Culhane, J.C., Yan, G., Qian, J., Ichikawa, Y., Matsuoka, T., Zachara, N., Etkorn, F.A., Hart, G.W., Jeong, J.S., Blackshaw, S., Zhu, H. and Cole, P.A. 2012. Regulation of CK2 by phosphorylation and O-GlcNAcylation revealed by semisynthesis. *Nature Chemical Biology*. **8**(3), pp.262–269.
- Tashima, Y. and Stanley, P. 2014. Antibodies That Detect O-Linked β -d-N-Acetylglucosamine on the Extracellular Domain of Cell Surface Glycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. **289**(16), pp.11132–11142.
- Tashiro, A., Tatsumi, S., Takeda, R., Naka, A., Matsuoka, H., Hashimoto, Y., Hatta, K., Maeda, K. and Kamoshida, S. 2014. High expression of organic anion transporter 2 and organic cation transporter 2 is an independent predictor of good outcomes in patients with metastatic colorectal cancer treated with FOLFOX-based chemotherapy. *American Journal of Cancer Research*. **4**(5), pp.528–536.
- Taylor, R., Parker, G., Hazel, M., Soesanto, Y., Fuller, W., Yazzie, M. and McClain, D. 2008. Glucose Deprivation Stimulates O-GlcNAc Modification of Proteins through Up-regulation of O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. **283**(10), pp.6050–7.
- Temmink, O.H., Bijnsdorp, I.V., Prins, H.-J., Losekoot, N., Adema, A.D., Smid, K., Honeywell, R.J., Ylstra, B., Eijk, P.P., Fukushima, M. and Peters, G.J. 2010. Trifluorothymidine resistance is associated with decreased thymidine kinase and equilibrative nucleoside transporter expression or increased secretory phospholipase A2. *Molecular Cancer Therapeutics*. **9**(4), pp.1047–1057.
- Teo, C.F., Ingale, S., Wolfert, M.A., Elsayed, G.A., Nöt, L.G., Chatham, J.C., Wells, L. and Boons, G.-J. 2010. Glycopeptide-specific monoclonal antibodies suggest new roles for O-GlcNAc. *Nature Chemical Biology*. **6**(5), pp.338–343.
- Thirion, P., Michiels, S., Pignon, J.P., Buyse, M., Braud, A.C., Carlson, R.W., O'Connell, M., Sargent, P. and Piedbois, P. 2004. Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer: evidence in terms of response rate. Advanced Colorectal Cancer Meta-Analysis Project.: *Journal of Clinical Oncology: Vol 10, No 6. Journal of Clinical Oncology*. **22**(18), pp.3766–75.

- Tian, T., Li, X. and Zhang, J. 2019. mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. **20**(3).
- Tillman, D.M., Petak, I. and Houghton, J.A. 1999. A Fas-dependent Component in 5-Fluorouracil/Leucovorin-induced Cytotoxicity in Colon Carcinoma Cells. *Clinical Cancer Research*. **5**(2), pp.425–430.
- Todaro, M., Alea, M.P., Di Stefano, A.B., Cammareri, P., Vermeulen, L., Iovino, F., Tripodo, C., Russo, A., Gulotta, G., Medema, J.P. and Stassi, G. 2007. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell*. **1**(4), pp.389–402.
- Tokunaga, Y., Sasaki, H. and Saito, T. 2007. Clinical role of orotate phosphoribosyl transferase and dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer treated with postoperative fluoropyrimidine. *Surgery*. **141**(3), pp.346–353.
- Tokunaga, Y., Takahashi, K. and Saito, T. 2005. Clinical role of thymidine phosphorylase and dihydropyrimidine dehydrogenase in colorectal cancer treated with postoperative fluoropyrimidine. *Hepato-Gastroenterology*. **52**(66), pp.1715–1721.
- Toleman, C., Paterson, A.J., Shin, R. and Kudlow, J.E. 2006. Streptozotocin inhibits O-GlcNAcase via the production of a transition state analog. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **340**(2), pp.526–534.
- Toleman, C., Paterson, A.J., Whisenhunt, T.R. and Kudlow, J.E. 2004. Characterization of the Histone Acetyltransferase (HAT) Domain of a Bifunctional Protein with Activable O-GlcNAcase and HAT Activities. *Journal of Biological Chemistry*. **279**(51), pp.53665–53673.
- Toleman, C.A., Paterson, A.J. and Kudlow, J.E. 2006. The Histone Acetyltransferase NCOAT Contains a Zinc Finger-like Motif Involved in Substrate Recognition. *Journal of Biological Chemistry*. **281**(7), pp.3918–3925.
- Torres, C.R. and Hart, G.W. 1984. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *The Journal of Biological Chemistry*. **259**(5), pp.3308–3317.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B. and Issa, J.-P.J. 1999. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96**(15), pp.8681–8686.
- Trapannone, R., Mariappa, D., Ferenbach, A.T. and Aalten, D.M.F. van 2016. Nucleocytoplasmic human O-GlcNAc transferase is sufficient for O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins. *Biochemical Journal*. **473**(12), pp.1693–1702.
- Tremblay, F., Gagnon, A., Veilleux, A., Sorisky, A. and Marette, A. 2005. Activation of the mammalian target of rapamycin pathway acutely inhibits insulin signaling to Akt and glucose transport in 3T3-L1 and human adipocytes. *Endocrinology*. **146**(3), pp.1328–1337.
- Trembley, J.H., Wang, G., Unger, G., Slaton, J. and Ahmed, K. 2009. CK2: A key player in cancer biology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **66**(0), pp.1858–1867.
- Triantafyllidis, J.K., Nasioulas, G. and Kosmidis, P.A. 2009. Colorectal Cancer and Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Risk Factors, Mechanisms of Carcinogenesis and Prevention Strategies. *Anticancer Research*. **29**(7), pp.2727–2737.
- Trinca, G.M., Goodman, M.L., Papachristou, E.K., D'Santos, C.S., Chalise, P., Madan, R., Slawson, C. and Hagan, C.R. 2018. O-GlcNAc-dependent regulation of progesterone receptor function in breast cancer. *Hormones & cancer*. **9**(1), pp.12–21.
- Trinidad, J.C., Barkan, D.T., Gullledge, B.F., Thalhammer, A., Sali, A., Schoepfer, R. and Burlingame, A.L. 2012. Global Identification and Characterization of Both O-GlcNAcylation and Phosphorylation at the Murine Synapse. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. **11**(8), pp.215–229.
- Tsai, C.-F., Wang, Y.-T., Yen, H.-Y., Tsou, C.-C., Ku, W.-C., Lin, P.-Y., Chen, H.-Y., Nesvizhskii, A.I., Ishihama, Y. and Chen, Y.-J. 2015. Large-scale determination of absolute phosphorylation stoichiometries in human cells by motif-targeting quantitative proteomics. *Nature Communications*. **6**, p.6622.
- Tsikitis, V.L., Malireddy, K., Green, E.A., Christensen, B., Whelan, R., Hyder, J., Marcello, P., Larach, S., Lauter, D., Sargent, D.J. and Nelson, H. 2009. Postoperative Surveillance Recommendations for Early Stage Colon Cancer Based on Results From the Clinical Outcomes of Surgical Therapy Trial. *Journal of Clinical Oncology*. **27**(22), pp.3671–3676.

- Tsujitani, S., Saito, H., Maeta, Y., Yamaguchi, K., Tatebe, S., Kondo, A. and Kaibara, N. 2004. Neoangiogenesis in patients with gastric carcinoma in relation to the expression of vascular endothelial growth factor and thymidine phosphorylase. *Anticancer Research*. **24**(3b), pp.1853–1859.
- Tzatsos, A. and Kandror, K.V. 2006. Nutrients Suppress Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling via Raptor-Dependent mTOR-Mediated Insulin Receptor Substrate 1 Phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*. **26**(1), pp.63–76.
- Udeshi, N.D., Svinkina, T., Mertins, P., Kuhn, E., Mani, D.R., Qiao, J.W. and Carr, S.A. 2013. Refined preparation and use of anti-diglycine remnant (K-ε-GG) antibody enables routine quantification of 10,000s of ubiquitination sites in single proteomics experiments. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **12**(3), pp.825–831.
- Ulrich, C.M., Bigler, J., Velicer, C.M., Greene, E.A., Farin, F.M. and Potter, J.D. 2000. Searching expressed sequence tag databases: discovery and confirmation of a common polymorphism in the thymidylate synthase gene. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. **9**(12), pp.1381–1385.
- Vaidyanathan, K., Niranjana, T., Selvan, N., Teo, C.F., May, M., Patel, S., Weatherly, B., Skinner, C., Opitz, J., Carey, J., Viskochil, D., Gecz, J., Shaw, M., Peng, Y., Alexov, E., Wang, T., Schwartz, C. and Wells, L. 2017. Identification and characterization of a missense mutation in the O-linked β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase gene that segregates with X-linked intellectual disability. *The Journal of Biological Chemistry*. **292**(21), pp.8948–8963.
- Vakoc, C.R., Sachdeva, M.M., Wang, H. and Blobel, G.A. 2006. Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Molecular and Cellular Biology*. **26**(24), pp.9185–9195.
- Valeri, N., Gasparini, P., Braconi, C., Paone, A., Lovat, F., Fabbri, M., Sumani, K., Alder, H., Amadori, D., Patel, T., Nuovo, G., Fishel, R. and Croce, C. 2010. MicroRNA-21 induces resistance to 5-fluorouracil by down-regulating human DNA MutS homolog 2 (hMSH2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**(49), pp.21098–21103.
- Van Cutsem, E., Twelves, C., Cassidy, J., Allman, D., Bajetta, E., Boyer, M., Bugat, R., Findlay, M., Frings, S., Jahn, M., McKendrick, J., Osterwalder, B., Perez-Manga, G., Rosso, R., Rougier, P., Schmiegel, W.H., Seitz, J.F., Thompson, P., Viteitez, J.M., Weitzel, C., Harper, P. and Xeloda Colorectal Cancer Study Group 2001. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **19**(21), pp.4097–4106.
- Vanderford, N.L., Andrali, S.S. and Özcan, S. 2007. Glucose Induces MafA Expression in Pancreatic Beta Cell Lines Via the Hexosamine Biosynthetic Pathway. *The Journal of biological chemistry*. **282**(3), pp.1577–1584.
- Veerababu, G., Tang, J., Hoffman, R.T., Daniels, M.C., Hebert, L.F., Crook, E.D., Cooksey, R.C. and McClain, D.A. 2000. Overexpression of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase in the liver of transgenic mice results in enhanced glycogen storage, hyperlipidemia, obesity, and impaired glucose tolerance. *Diabetes*. **49**(12), pp.2070–2078.
- Veigl, M.L., Kasturi, L., Olechnowicz, J., Ma, A.H., Lutterbaugh, J.D., Periyasamy, S., Li, G.M., Drummond, J., Modrich, P.L., Sedwick, W.D. and Markowitz, S.D. 1998. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**(15), pp.8698–8702.
- Vermeulen, L., Todaro, M., de Sousa Mello, F., Sprick, M.R., Kemper, K., Perez Alea, M., Richel, D.J., Stassi, G. and Medema, J.P. 2008. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**(36), pp.13427–13432.
- Very, N., Lefebvre, T. and El Yazidi-Belkoura, I. 2017. Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer. *Oncotarget*. **9**(1), pp.1380–1402.

- Very, N., Vercoutter-Edouart, A.-S., Lefebvre, T., Hardivillé, S. and El Yazidi-Belkoura, I. 2018. Cross-Dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR Axis in Human Chronic Diseases. *Frontiers in Endocrinology*. **9**.
- Visanji, N.P., Wislet-Gendebien, S., Oschipok, L.W., Zhang, G., Aubert, I., Fraser, P.E. and Tandon, A. 2011. Effect of Ser-129 phosphorylation on interaction of α -synuclein with synaptic and cellular membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**(41), pp.35863–35873.
- Vocadlo, D.J. 2012. O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*. **16**(5–6), pp.488–497.
- Vocadlo, D.J., Hang, H.C., Kim, E.-J., Hanover, J.A. and Bertozzi, C.R. 2003. A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**(16), pp.9116–9121.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Kern, S.E., Hamilton, Preisinger, A.C., Nakamura, Y. and White, R. 1989. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*. **244**(4901), pp.207–211.
- Wagner, S.A., Beli, P., Weinert, B.T., Nielsen, M.L., Cox, J., Mann, M. and Choudhary, C. 2011. A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **10**(10), M111.013284.
- Walgren, J.L.E., Vincent, T.S., Schey, K.L. and Buse, M.G. 2003. High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. **284**(2), pp.E424-434.
- Wang, J., Liu, R., Hawkins, M., Barzilai, N. and Rossetti, L. 1998. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*. **393**(6686), pp.684–688.
- Wang, J., Torii, M., Liu, H., Hart, G.W. and Hu, Z.-Z. 2011. dbOGAP - an integrated bioinformatics resource for protein O-GlcNAcylation. *BMC bioinformatics*. **12**, p.91.
- Wang, L., Chen, S., Zhang, Z., Zhang, J., Mao, S., Zheng, J., Xuan, Y., Liu, M., Cai, K., Zhang, W., Guo, Y., Zhai, W. and Yao, X. 2018. Suppressed OGT expression inhibits cell proliferation while inducing cell apoptosis in bladder cancer. *BMC Cancer*. **18**(1), p.1141.
- Wang, P., Peng, C., Liu, X., Liu, H., Chen, Y., Zheng, L., Han, B. and Pei, H. 2015. OGT mediated histone H2B S112 GlcNAcylation regulates DNA damage response. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*. **42**(9), pp.467–475.
- Wang, P., Yu, J. and Zhang, L. 2007. The nuclear function of p53 is required for PUMA-mediated apoptosis induced by DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **104**(10), pp.4054–4059.
- Wang, S., Huang, X., Sun, D., Xin, X., Pan, Q., Peng, S., Liang, Z., Luo, C., Yang, Y., Jiang, H., Huang, M., Chai, W., Ding, J. and Geng, M. 2012. Extensive Crosstalk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Akt Signaling. *PLoS ONE*. **7**(5).
- Wang, T., Chen, Z., Zhu, Y., Pan, Q., Liu, Y., Qi, X., Jin, L., Jin, J., Ma, X. and Hua, D. 2015. Inhibition of Transient Receptor Potential Channel 5 Reverses 5-Fluorouracil Resistance in Human Colorectal Cancer Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **290**(1), pp.448–456.
- Wang, T., Ning, K., Lu, T.-X. and Hua, D. 2017. Elevated expression of TrpC5 and GLUT1 is associated with chemoresistance in colorectal cancer. *Oncology Reports*. **37**(2), pp.1059–1065.
- Wang, W., McLeod, H.L., Cassidy, J. and Collie-Duguid, E.S.R. 2007. Mechanisms of acquired chemoresistance to 5-fluorouracil and tomudex: thymidylate synthase dependent and independent networks. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. **59**(6), pp.839–845.
- Wang, Y., Liu, J., Jin, X., Zhang, D., Li, D., Hao, F., Feng, Y., Gu, S., Meng, F., Tian, M., Zheng, Y., Xin, L., Zhang, X., Han, X., Aravind, L. and Wei, M. 2017. O-GlcNAcylation destabilizes the active tetrameric PKM2 to promote the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **114**(52), pp.13732–13737.
- Wang, Y., Yao, X., Ge, J., Hu, F. and Zhao, Y. 2014. Can Vascular Endothelial Growth Factor and Microvessel Density Be Used as Prognostic Biomarkers for Colorectal Cancer? A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Scientific World Journal*. **2014**.
- Wang, Z., Gucek, M. and Hart, G.W. 2008. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**(37), pp.13793–13798.

- Wang, Z., Pandey, A. and Hart, G.W. 2007. Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **6**(8), pp.1365–1379.
- Wang, Z., Park, K., Comer, F., Hsieh-Wilson, L.C., Saudek, C.D. and Hart, G.W. 2009. Site-Specific GlcNAcylation of Human Erythrocyte Proteins. *Diabetes*. **58**(2), pp.309–317.
- Wang, Z., Udeshi, N.D., O'Malley, M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Hart, G.W. 2010. Enrichment and Site Mapping of O-Linked N-Acetylglucosamine by a Combination of Chemical/Enzymatic Tagging, Photochemical Cleavage, and Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. **9**(1), pp.153–160.
- Wang, Z., Udeshi, N.D., Slawson, C., Compton, P.D., Sakabe, K., Cheung, W.D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Hart, G.W. 2010. Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Science Signaling*. **3**(104), p.ra2.
- Wani, W.Y., Ouyang, X., Benavides, G.A., Redmann, M., Cofield, S.S., Shacka, J.J., Chatham, J.C., Darley-Usmar, V. and Zhang, J. 2017. O-GlcNAc regulation of autophagy and α -synuclein homeostasis; implications for Parkinson's disease. *Molecular Brain*. **10**.
- Warburg, O. 1956. On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*. **123**(3191), pp.309–314.
- Webster, D.M., Teo, C.F., Sun, Y., Wloga, D., Gay, S., Klonowski, K.D., Wells, L. and Dougan, S.T. 2009. O-GlcNAc modifications regulate cell survival and epiboly during zebrafish development. *BMC developmental biology*. **9**, p.28.
- Wee, P. and Wang, Z. 2017. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*. **9**(5).
- Weisberg, I., Tran, P., Christensen, B., Sibani, S. and Rozen, R. 1998. A Second Genetic Polymorphism in Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Associated with Decreased Enzyme Activity. *Molecular Genetics and Metabolism*. **64**(3), pp.169–172.
- Wells, L., Gao, Y., Mahoney, J.A., Vosseller, K., Chen, C., Rosen, A. and Hart, G.W. 2002. Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *The Journal of Biological Chemistry*. **277**(3), pp.1755–1761.
- Wells, L., Kreppel, L.K., Comer, F.I., Wadzinski, B.E. and Hart, G.W. 2004. O-GlcNAc Transferase Is in a Functional Complex with Protein Phosphatase 1 Catalytic Subunits. *Journal of Biological Chemistry*. **279**(37), pp.38466–38470.
- Wells, L., Slawson, C. and Hart, G.W. 2011. The E2F-1 associated retinoblastoma-susceptibility gene product is modified by O-GlcNAc. *Amino Acids*. **40**(3), pp.877–883.
- Wells, L., Vosseller, K., Cole, R.N., Cronshaw, J.M., Matunis, M.J. and Hart, G.W. 2002. Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **1**(10), pp.791–804.
- Welsh, S.J., Titley, J., Brunton, L., Valenti, M., Monaghan, P., Jackman, A.L. and Aherne, G.W. 2000. Comparison of thymidylate synthase (TS) protein up-regulation after exposure to TS inhibitors in normal and tumor cell lines and tissues. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. **6**(6), pp.2538–2546.
- Whelan, S.A., Dias, W.B., Thiruneelakantapillai, L., Lane, M.D. and Hart, G.W. 2010. Regulation of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1)/AKT Kinase-mediated Insulin Signaling by O-Linked β -N-Acetylglucosamine in 3T3-L1 Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**(8), pp.5204–5211.
- Whelan, S.A., Lane, M.D. and Hart, G.W. 2008. Regulation of the O-Linked β -N-Acetylglucosamine Transferase by Insulin Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. **283**(31), pp.21411–21417.
- Whisenhunt, T.R., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., Van Tine, B.A. and Kudlow, J.E. 2006. Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology*. **16**(6), pp.551–563.
- White, B.D., Chien, A.J. and Dawson, D.W. 2012. Dysregulation of Wnt/ β -catenin signaling in gastrointestinal cancers. *Gastroenterology*. **142**(2), pp.219–232.
- Whitfield, M.L., Sherlock, G., Saldanha, A.J., Murray, J.I., Ball, C.A., Alexander, K.E., Matese, J.C., Perou, C.M., Hurt, M.M., Brown, P.O. and Botstein, D. 2002. Identification of genes periodically

- expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Molecular Biology of the Cell*. **13**(6), pp.1977–2000.
- Wichelecki, D.J., Froese, D.S., Kopec, J., Muniz, J.R.C., Yue, W.W. and Gerlt, J.A. 2014. Enzymatic and Structural Characterization of rTS γ Provides Insights into the Function of rTS β . *Biochemistry*. **53**(16), pp.2732–2738.
- Wilcken, B., Bamforth, F., Li, Z., Zhu, H., Ritvanen, A., Renlund, M., Stoll, C., Alembik, Y., Dott, B., Czeizel, A.E., Gelman-Kohan, Z., Scarano, G., Bianca, S., Ettore, G., Tenconi, R., Bellato, S., Scala, I., Mutchinick, O.M., López, M.A., de Walle, H., Hofstra, R., Joutchenko, L., Kavteladze, L., Bermejo, E., Martínez-Frías, M.L., Gallagher, M., Erickson, J.D., Vollset, S.E., Mastroiacovo, P., Andria, G., Botto, L.D. and Redlund, M. 2003. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas world wide. *Journal of Medical Genetics*. **40**(8), pp.619–625.
- Wilson, A.C., Peterson, M.G. and Herr, W. 1995. The HCF repeat is an unusual proteolytic cleavage signal. *Genes & Development*. **9**(20), pp.2445–2458.
- Wilson, B.J., Schatton, T., Zhan, Q., Gasser, M., Ma, J., Saab, K.R., Schanche, R., Waaga-Gasser, A.-M., Gold, J.S., Huang, Q., Murphy, G.F., Frank, M.H. and Frank, N.Y. 2011. ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Research*. **71**(15), p.5307.
- Winer, I.S., Bommer, G.T., Gonik, N. and Fearon, E.R. 2006. Lysine residues Lys-19 and Lys-49 of beta-catenin regulate its levels and function in T cell factor transcriptional activation and neoplastic transformation. *The Journal of Biological Chemistry*. **281**(36), pp.26181–26187.
- Wińska, P., Skierka, K., Łukowska-Chojnacka, E., Koronkiewicz, M., Cieśla, J. and Bretner, M. 2018. Effect of Simultaneous Inhibition of Protein Kinase CK2 and Thymidylate Synthase in Leukemia and Breast Cancer Cells. *Anticancer Research*. **38**(8), pp.4617–4627.
- Woeller, C.F., Anderson, D.D., Szebenyi, D.M.E. and Stover, P.J. 2007. Evidence for Small Ubiquitin-like Modifier-dependent Nuclear Import of the Thymidylate Biosynthesis Pathway. *Journal of Biological Chemistry*. **282**(24), pp.17623–17631.
- Woerner, S.M., Gebert, J., Yuan, Y.P., Sutter, C., Ridder, R., Bork, P. and Doeberitz, M. von K. 2001. Systematic identification of genes with coding microsatellites mutated in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *International Journal of Cancer*. **93**(1), pp.12–19.
- Woosley, B., Xie, M., Wells, L., Orlando, R., Garrison, D., King, D. and Bergmann, C. 2006. Comprehensive glycan analysis of recombinant *Aspergillus niger* endo-polygalacturonase C. *Analytical Biochemistry*. **354**(1), pp.43–53.
- Worth, M., Hu, C.-W., Li, H., Fan, D., Estevez, A., Zhu, D., Wang, A. and Jiang, J. 2019. Targeted covalent inhibition of O-GlcNAc transferase in cells. *Chemical Communications (Cambridge, England)*. **55**(88), pp.13291–13294.
- Wrabl, J.O. and Grishin, N.V. 2001. Homology between O-linked GlcNAc transferases and proteins of the glycogen phosphorylase superfamily. *Journal of Molecular Biology*. **314**(3), pp.365–374.
- Wu, C., Zheng, X., Li, X., Fesler, A., Hu, W., Chen, L., Xu, B., Wang, Q., Tong, A., Burke, S., Ju, J. and Jiang, J. 2016. Reduction of gastric cancer proliferation and invasion by miR-15a mediated suppression of Bmi-1 translation. *Oncotarget*. **7**(12), pp.14522–14536.
- Wu, J., Hu, D. and Zhang, R. 2012. Depletion of Bmi-1 enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Letters*. **4**(4), pp.723–726.
- Wu, N., Jiang, M., Han, Y., Liu, Haiming, Chu, Y., Liu, Hao, Cao, J., Hou, Q., Zhao, Y., Xu, B. and Xie, X. 2019. O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer progression by regulating protein stability and potential catcinogenic function of DDX5. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **23**(2), pp.1354–1362.
- Wyatt, M.D. and Wilson, D.M. 2009. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. **66**(5), pp.788–799.
- Wysocka, J., Allis, C.D. and Coonrod, S. 2006. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. **11**, pp.344–355.
- Xi, Y., Formentini, A., Nakajima, G., Kornmann, M. and Ju, J. 2008. Validation of biomarkers associated with 5-fluorouracil and thymidylate synthase in colorectal cancer. *Oncology Reports*. **19**(1), pp.257–262.

- Xiao, Z., Xue, J., Sowin, T.J., Rosenberg, S.H. and Zhang, H. 2005. A novel mechanism of checkpoint abrogation conferred by Chk1 downregulation. *Oncogene*. **24**(8), pp.1403–1411.
- Xiu, J., El-Deiry, W.S., Campbell, P., Zhou, L., Duncan, J.S., Gatalica, Z., Reddy, S.K., Chernoff, J. and Cohen, S.J. 2017. RAS family mutation patterns in a large cohort of CRCs.: *Journal of Clinical Oncology*. *Journal of Clinical Oncology*. **34**(15).
- Xu, D., Wang, W., Bian, T., Yang, W., Shao, M. and Yang, H. 2019. Increased expression of O-GlcNAc transferase (OGT) is a biomarker for poor prognosis and allows tumorigenesis and invasion in colon cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. **12**(4), pp.1305–1314.
- Xu, J., Wang, S., Viollet, B. and Zou, M.-H. 2012. Regulation of the Proteasome by AMPK in Endothelial Cells: The Role of O-GlcNAc Transferase (OGT). *PLoS ONE*. **7**(5).
- Xu, Q., Yang, C., Du, Y., Chen, Y., Liu, H., Deng, M., Zhang, H., Zhang, L., Liu, T., Liu, Q., Wang, L., Lou, Z. and Pei, H. 2014. AMPK regulates histone H2B O-GlcNAcylation. *Nucleic Acids Research*. **42**(9), pp.5594–5604.
- Yanagisawa, Y., Maruta, F., Iinuma, N., Ishizone, S., Koide, N., Nakayama, J. and Miyagawa, S. 2007. Modified Irinotecan/5FU/Leucovorin therapy in advanced colorectal cancer and predicting therapeutic efficacy by expression of tumor-related enzymes. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. **42**(4), pp.477–484.
- Yang, C., Peng, P., Li, L., Shao, M., Zhao, J., Wang, L., Duan, F., Song, S., Wu, H., Zhang, J., Zhao, R., Jia, D., Zhang, M., Wu, W., Li, C., Rong, Y., Zhang, L., Ruan, Y. and Gu, J. 2016. High expression of GFAT1 predicts poor prognosis in patients with pancreatic cancer. *Scientific Reports*. **6**(1), pp.1–9.
- Yang, S., Zou, L.-Y., Bounelis, P., Chaudry, I., Chatham, J.C. and Marchase, R.B. 2006. Glucosamine administration during resuscitation improves organ function after trauma hemorrhage. *Shock (Augusta, Ga.)*. **25**(6), pp.600–607.
- Yang, S.-Z., Xu, F., Yuan, K., Sun, Y., Zhou, T., Zhao, X., McDonald, J.M. and Chen, Y. 2020. Regulation of pancreatic cancer TRAIL resistance by protein O-GlcNAcylation. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*.
- Yang, W.H., Kim, J.E., Nam, H.W., Ju, J.W., Kim, H.S., Kim, Y.S. and Cho, J.W. 2006. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nature Cell Biology*. **8**(10), pp.1074–1083.
- Yang, W.H., Park, S.Y., Nam, H.W., Kim, D.H., Kang, J.G., Kang, E.S., Kim, Y.S., Lee, H.C., Kim, K.S. and Cho, J.W. 2008. NFκB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**(45), pp.17345–17350.
- Yang, X., Ongusaha, P.P., Miles, P.D., Havstad, J.C., Zhang, F., So, W.V., Kudlow, J.E., Michell, R.H., Olefsky, J.M., Field, S.J. and Evans, R.M. 2008. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*. **451**(7181), pp.964–969.
- Yang, X., Zhang, F. and Kudlow, J.E. 2002. Recruitment of O-GlcNAc Transferase to Promoters by Corepressor mSin3A: Coupling Protein O-GlcNAcylation to Transcriptional Repression. *Cell*. **110**(1), pp.69–80.
- Yang, Y., Fu, M., Li, M.-D., Zhang, K., Zhang, B., Wang, S., Liu, Y., Ni, W., Ong, Q., Mi, J. and Yang, X. 2020. O -GlcNAc transferase inhibits visceral fat lipolysis and promotes diet-induced obesity. *Nature Communications*. **11**(1), p.181.
- Yang, Y., Yin, X., Yang, H. and Xu, Y. 2015. Histone Demethylase LSD2 Acts as an E3 Ubiquitin Ligase and Inhibits Cancer Cell Growth through Promoting Proteasomal Degradation of OGT. *Molecular Cell*. **58**(1), pp.47–59.
- Yang, Y.R., Jang, H.-J., Lee, Y.H., Kim, I.S., Lee, H., Ryu, S.H. and Suh, P.-G. 2015. O-GlcNAc cycling enzymes control vascular development of the placenta by modulating the levels of HIF-1α. *Placenta*. **36**(10), pp.1063–1068.
- Yang, Y.R., Jang, H.-J., Yoon, S., Lee, Y.H., Nam, D., Kim, I.S., Lee, H., Kim, H., Choi, J.H., Kang, B.H., Ryu, S.H. and Suh, P.-G. 2014. OGA heterozygosity suppresses intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice. *Oncogenesis*. **3**(7), p.e109.
- 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., Kim, J.-M., Choi, E.-J., Moon, H.Y., Kim, I.S., Choi, J.H., Lee, H., Ryu, S.H., Cocco,

- L. and Suh, P.-G. 2015. Elevated O-GlcNAcylation promotes colonic inflammation and tumorigenesis by modulating NF- κ B signaling. *Oncotarget*. **6**(14), pp.12529–12542.
- Yang, Y.R., Song, M., Lee, H., Jeon, Y., Choi, E.-J., Jang, H.-J., Moon, H.Y., Byun, H.-Y., Kim, E.-K., Kim, D.H., Lee, M.N., Koh, A., Ghim, J., Choi, J.H., Lee-Kwon, W., Kim, K.T., Ryu, S.H. and Suh, P.-G. 2012. O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell*. **11**(3), pp.439–448.
- Yang, Y.-X., Hennessy, S. and Lewis, J.D. 2005. Type 2 diabetes mellitus and the risk of colorectal cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*. **3**(6), pp.587–594.
- Yao, C.W., Kang, K.A., Piao, M.J., Ryu, Y.S., Fernando, P.M.D.J., Oh, M.C., Park, J.E., Shilnikova, K., Na, S.-Y., Jeong, S.U., Boo, S.-J. and Hyun, J.W. 2017. Reduced Autophagy in 5-Fluorouracil Resistant Colon Cancer Cells. *Biomolecules & Therapeutics*. **25**(3), pp.315–320.
- Yao, S.Y.M., Ng, A.M.L., Cass, C.E., Baldwin, S.A. and Young, J.D. 2011. Nucleobase Transport by Human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 (hENT1). *The Journal of Biological Chemistry*. **286**(37), pp.32552–32562.
- Ychou, M., Rivoire, M., Thezenas, S., Quenet, F., Delpero, J.-R., Rebischung, C., Letoublon, C., Guimbaud, R., Francois, E., Ducreux, M., Desseigne, F., Fabre, J.-M. and Assenat, E. 2013. A Randomized Phase II Trial of Three Intensified Chemotherapy Regimens in First-Line Treatment of Colorectal Cancer Patients with Initially Unresectable or Not Optimally Resectable Liver Metastases. The METHEP Trial. *Annals of Surgical Oncology*. **20**(13), pp.4289–4297.
- Ye, L., Jiang, T., Shao, H., Zhong, L., Wang, Z., Liu, Y., Tang, H., Qin, B., Zhang, X. and Fan, J. 2017. miR-1290 Is a Biomarker in DNA-Mismatch-Repair-Deficient Colon Cancer and Promotes Resistance to 5-Fluorouracil by Directly Targeting hMSH2 - ScienceDirect. *Molecular Therapy Nucleic Acids*. **7**, pp.453–464.
- Yehezkel, G., Cohen, L., Kliger, A., Manor, E. and Khalaila, I. 2012. O-Linked β -N-Acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) in Primary and Metastatic Colorectal Cancer Clones and Effect of N-Acetyl- β -d-glucosaminidase Silencing on Cell Phenotype and Transcriptome. *The Journal of Biological Chemistry*. **287**(34), pp.28755–28769.
- Yi, W., Clark, P.M., Mason, D.E., Keenan, M.C., Hill, C., Goddard, W.A., Peters, E.C., Driggers, E.M. and Hsieh-Wilson, L.C. 2012. PFK1 Glycosylation Is a Key Regulator of Cancer Cell Growth and Central Metabolic Pathways. *Science (New York, N.Y.)*. **337**(6097), pp.975–980.
- Yoo, B.K., Gredler, R., Vozhilla, N., Su, Z., Chen, D., Forcier, T., Shah, K., Saxena, U., Hansen, U., Fisher, P.B. and Sarkar, D. 2009. Identification of genes conferring resistance to 5-fluorouracil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106**(31), pp.12938–12943.
- Yoshinare, K., Kubota, K., Watanabe, M., Wada, N., Nishibori, H., Hasegawa, H., Kitajima, M., Takechi, T. and Fukushima, M. 2003. Gene expression in colorectal cancer and in vitro chemosensitivity to 5-fluorouracil: a study of 88 surgical specimens. - PubMed - NCBI. *Cancer Science*. **94**(7), pp.633–638.
- Yu, M., Chu, S., Fei, B., Fang, X. and Liu, Z. 2019. O-GlcNAcylation of ITGA5 facilitates the occurrence and development of colorectal cancer. *Experimental Cell Research*. **382**(2), p.111464.
- Yu, Y., Zhang, L., Li, X., Run, X., Liang, Z., Li, Y., Liu, Y., Lee, M.H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Vocadlo, D.J., Liu, F. and Gong, C.-X. 2012. Differential effects of an O-GlcNAcase inhibitor on tau phosphorylation. *PLoS One*. **7**(4), p.e35277.
- Yuan, X., Gajan, A., Chu, Q., Xiong, H., Wu, K. and Wu, G.S. 2018. Developing TRAIL/TRAIL-death receptor-based cancer therapies. *Cancer metastasis reviews*. **37**(4), pp.733–748.
- Yuzwa, S.A., Macauley, M.S., Heinonen, J.E., Shan, X., Dennis, R.J., He, Y., Whitworth, G.E., Stubbs, K.A., McEachern, E.J., Davies, G.J. and Vocadlo, D.J. 2008. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nature Chemical Biology*. **4**(8), pp.483–490.
- Yuzwa, S.A., Shan, X., Jones, B.A., Zhao, G., Woodward, M.L., Li, X., Zhu, Y., McEachern, E.J., Silverman, M.A., Watson, N.V., Gong, C.-X. and Vocadlo, D.J. 2014. Pharmacological inhibition of O-GlcNAcase (OGA) prevents cognitive decline and amyloid plaque formation in bigenic tau/APP mutant mice. *Molecular Neurodegeneration*. **9**, p.42.

- Yuzwa, S.A., Shan, X., Macauley, M.S., Clark, T., Skorobogatko, Y., Vosseller, K. and Vocadlo, D.J. 2012a. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nature Chemical Biology*. **8**(4), pp.393–399.
- Yuzwa, S.A., Shan, X., Macauley, M.S., Clark, T., Skorobogatko, Y., Vosseller, K. and Vocadlo, D.J. 2012b. Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nature Chemical Biology*. **8**(4), pp.393–399.
- Zaborska, K.E., Edwards, G., Austin, C. and Wareing, M. 2017. The Role of O-GlcNAcylation in Perivascular Adipose Tissue Dysfunction of Offspring of High-Fat Diet-Fed Rats. *Journal of Vascular Research*. **54**(2), pp.79–91.
- Zachara, N.E., O'Donnell, N., Cheung, W.D., Mercer, J.J., Marth, J.D. and Hart, G.W. 2004. Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**(29), pp.30133–30142.
- Zahran, A.M., Rayan, A., Fakhry, H., Attia, A.M., Ashmawy, A.M., Soliman, A., Elkady, A. and Hetta, H.F. 2019. Pretreatment detection of circulating and tissue CD133+ CD44+ cancer stem cells as a prognostic factor affecting the outcomes in Egyptian patients with colorectal cancer. *Cancer Management and Research*. **11**, pp.1237–1248.
- Zanconato, F., Cordenonsi, M. and Piccolo, S. 2016. YAP/TAZ at the roots of cancer. *Cancer cell*. **29**(6), pp.783–803.
- Zeidan, Q., Wang, Z., De Maio, A. and Hart, G.W. 2010. O-GlcNAc Cycling Enzymes Associate with the Translational Machinery and Modify Core Ribosomal Proteins. *Molecular Biology of the Cell*. **21**(12), pp.1922–1936.
- Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J. and Kudlow, J.E. 2003. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell*. **115**(6), pp.715–725.
- Zhang, H., Jia, Y., Cooper, J.J., Hale, T., Zhang, Z. and Elbein, S.C. 2004. Common variants in glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase 2 (GFPT2) gene are associated with type 2 diabetes, diabetic nephropathy, and increased GFPT2 mRNA levels. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. **89**(2), pp.748–755.
- Zhang, H., Zdolsek, J.M. and Brunk, U.T. 1992. Alloxan cytotoxicity involves lysosomal damage. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. **100**(4), pp.309–316.
- Zhang, N. and Chen, X. 2016. Potential role of O-GlcNAcylation and involvement of PI3K/Akt1 pathway in the expression of oncogenic phenotypes of gastric cancer cells in vitro. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. **63**(6), pp.841–851.
- Zhang, P., Wang, C., Ma, T. and You, S. 2015. O-GlcNAcylation enhances the invasion of thyroid anaplastic cancer cells partially by PI3K/Akt1 pathway. *OncoTargets and Therapy*. **8**, pp.3305–3313.
- Zhang, S., Roche, K., Nasheuer, H.-P. and Lowndes, N.F. 2011. Modification of Histones by Sugar β -N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Occurs on Multiple Residues, Including Histone H3 Serine 10, and Is Cell Cycle-regulated. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**(43), pp.37483–37495.
- Zhang, X. and Bennett, V. 1996. Identification of O-linked N-acetylglucosamine modification of ankyrinG isoforms targeted to nodes of Ranvier. *The Journal of Biological Chemistry*. **271**(49), pp.31391–31398.
- Zhang, X., Ma, L., Qi, J., Shan, H., Yu, W. and Gu, Y. 2015. MAPK/ERK signaling pathway-induced hyper-O-GlcNAcylation enhances cancer malignancy. *Molecular and Cellular Biochemistry*. **410**(1–2), pp.101–110.
- Zhang, X., Qiao, Y., Wu, Q., Chen, Yan, Zou, S., Liu, X., Zhu, G., Zhao, Y., Chen, Yuxin, Yu, Y., Pan, Q., Wang, J. and Sun, F. 2017. The essential role of YAP O-GlcNAcylation in high-glucose-stimulated liver tumorigenesis. *Nature Communications*. **8**(1), pp.1–15.
- Zhang, Y., Jia, Q., Kadel, D., Zhang, X. and Zhang, Q. 2018. Targeting mTORC1/2 Complexes Inhibit Tumorigenesis and Enhance Sensitivity to 5-Flourouracil (5-FU) in Hepatocellular Carcinoma: A Preclinical Study of mTORC1/2-Targeted Therapy in Hepatocellular Carcinoma (HCC). *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. **24**, pp.2735–2743.
- Zhao, X., Ning, Q., Chai, H., Ai, M. and Ma, Z. 2015. PGlcS: Prediction of protein O-GlcNAcylation sites with multiple features and analysis. *Journal of Theoretical Biology*. **380**, pp.524–529.

- Zhao, X. and Yu, Y.-T. 2007. Incorporation of 5-fluorouracil into U2 snRNA blocks pseudouridylation and pre-mRNA splicing in vivo. *Nucleic Acids Research*. **35**(2), pp.550–558.
- Zhong, J., Martinez, M., Sengupta, S., Lee, A., Wu, X., Chaerkady, R., Chatterjee, A., O’Meally, R.N., Cole, R.N., Pandey, A. and Zachara, N.E. 2015. Quantitative Phosphoproteomics Reveals Crosstalk Between Phosphorylation and O-GlcNAc in the DNA Damage Response Pathway. *Proteomics*. **15**(0), pp.591–607.
- Zhou, F., Yang, X., Zhao, H., Liu, Y., Feng, Y., An, R., Lv, X., Li, J. and Chen, B. 2018. Down-regulation of OGT promotes cisplatin resistance by inducing autophagy in ovarian cancer. *Theranostics*. **8**(19), pp.5200–5212.
- Zhou, H. and Huang, S. 2011. Role of mTOR Signaling in Tumor Cell Motility, Invasion and Metastasis. *Current protein & peptide science*. **12**(1), pp.30–42.
- Zhou, L., Luo, M., Cheng, L., Li, R., Liu, B. and Linghu, H. 2019. Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 2 (GFPT2) promotes the EMT of serous ovarian cancer by activating the hexosamine biosynthetic pathway to increase the nuclear location of β -catenin. *Pathology - Research and Practice*. **215**(12), p.152681.
- Zhu, Q., Zhou, L., Yang, Z., Lai, M., Xie, H., Wu, L., Xing, C., Zhang, F. and Zheng, S. 2012. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*. **29**(2), pp.985–993.
- Zhu, Y., Liu, T.-W., Cecioni, S., Eskandari, R., Zandberg, W.F. and Vocadlo, D.J. 2015. O-GlcNAc occurs cotranslationally to stabilize nascent polypeptide chains. *Nature Chemical Biology*. **11**(5), pp.319–325.
- Zhu-Mauldin, X., Marsh, S.A., Zou, L., Marchase, R.B. and Chatham, J.C. 2012. Modification of STIM1 by O-linked N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Attenuates Store-operated Calcium Entry in Neonatal Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*. **287**(46), pp.39094–39106.
- Zou, L., Yang, S., Hu, S., Chaudry, I.H., Marchase, R.B. and Chatham, J.C. 2007. The protective effects of PUGNAc on cardiac function after trauma-hemorrhage are mediated via increased protein O-GlcNAc levels. *Shock (Augusta, Ga.)*. **27**(4), pp.402–408.