Université Lille Nord de France

Ecole doctorale Biologie-Santé de Lille

Thèse

en vue de l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Lille Nord de France

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Ludivine DROUGAT

le 07 décembre 2012

Etude de la dynamique de O-GlcNAcylation et identification de protéines différentiellement O-GlcNAcylées au cours de la transition G1/S du cycle cellulaire de cellules épithéliales humaines

<u>Membres du jury :</u>

Directeur de thèse :	**Jean-Claude MICHALSKI** – *DR INSERM (UMR8576, Lille)*
Co-directrice de thèse :	**Anne-Sophie VERCOUTTER-EDOUART** – *CR CNRS (UMR8576, Lille)*
Préseidente du jury :	**Annick PIERCE** – *Professeur université Lille (UMR8576)*
Rapporteurs :	**Daniel FISHER** – *DR INSERM (UMR5535, Monptellier)*
	Els VAN DAMME – *Professeur université de Gand*
Examinateurs :	**Franck BROUILLARD** – *MCF (U845, Paris)*
	Laurent MEIJER – *DR CNRS (USR3151, Roscoff)*

Thèse préparée au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UMR CNRS 8576)

Remerciements

Je ne peux penser en premier qu'au ***Dr Anne-sophie Vercoutter-Edouart***, que je remercie de m'avoir accompagnée pour relever ce challenge. Merci de m'avoir laissé tant d'autonomie et de m'avoir permis de participer à de multiples manifestations. Je souhaite également te remercier pour ton encadrement durant ces 3 années de thèse et pour la confiance que tu m'as accordée. Je suis très heureuse d'avoir été ta première étudiante de doctorat et j'espère sincèrement ne pas t'avoir donné trop de fils à retordre. Un grand merci!

Je tiens à remercier le ***Dr Jean-Claude Michalski*** de m'avoir accueillie dans le laboratoire et d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude à mon Jury de Thèse. Je remercie tout d'abord le ***Pr Els Van Damme*** et le ***Dr Daniel Fisher*** d'avoir accepté de juger mon manuscrit de thèse. Je remercie également le ***Pr Annick Pierce*** et les ***Drs Franck Brouillard*** et ***Laurent Meijer*** d'avoir accepté l'invitation à ma soutenance de thèse.

Je souhaite remercier le ***Pr Tony Lefebvre*** pour les nombreux éclaircissements et conseils scientifiques que tu m'as apportés ainsi que pour ton aide lors de cette thèse. Merci Tony pour ces trois belles années de thèse que j'ai passées dans le laboratoire grâce à ton humour quotidien. Je n'oublierai jamais que sans toi je ne serais pas en train de rédiger ce manuscrit car tu es le premier à m'avoir fait confiance lors de mon master 2.

Marlène, un immense et chaleureux Merci. Merci pour ton sourire matinal, merci de m'avoir accompagnée pendant ces longues heures passées au laboratoire, merci pour l'aide et le soutien précieux que tu as pu m'apporter durant ces 4 ans. Oh oui!! Je vais te regretter mais la vie continue et je suis sûre que nous continuerons à rester en contact. Ta p'tite lulu t'appellera encore de longues heures pour te raconter sa vie, ses peines et surtout ses joies à venir. Milles merci!

Je ne garderais pas un bon souvenir de ces trois années de thèse, si je n'avais bénéficié d'une si bonne équipe. Je voudrais aussi saluer les membres du laboratoire avec lesquelles j'ai eu la joie d'interagir : ***Céline, Ikram, Anne-marie, Vanessa, Stéphanie.*** Je vous remercie pour toutes les petites choses qui m'ont permis de travailler dans une atmosphère agréable. ***Céline,*** pour ta gentillesse, ta sympathie et pour ton coup de pouce. ***Ikram***, je suis heureuse d'avoir partagé mon bureau avec toi durant ces 2 dernières années et merci pour ton écoute et ton regard objectif pour chaque situation. ***Vanessa,*** de m'avoir fait découvrir le monde de la *O*-GlcNAc et de m'avoir donné l'envie de faire de la recherche. Merci à ***Anne-marie! Stéphanie*** sans qui cette thèse aurait été totalement différente. A la fois cul et chemise et chien et chat, je ne suis pas prête d'oublier les

moments complices et de solidarité que nous avons pu avoir. ***Steffi,*** je te souhaite beaucoup de courage pour ton Master 2 et surtout garde cette même motivation jusqu'au bout!

Un grand merci à l'équipe du labo 020. Un merci particulier à toi, ***François***. Je souhaite te remercier pour nos nombreuses discussions scientifiques et tes conseils avisés qui m'ont permis de prendre du recul à des moments clés de ma thèse. Je t'adresse également un immense merci pour ta grande disponibilité tout au long de cette thèse. Merci beaucoup François! Merci ***Dominique***, pour tes compliments quotidiens qui ont égayé mes journées quelque soit mon humeur du jour. Merci ***Sandrine,*** pour avoir été ma première tutrice de stage, fait découvrir le monde de la recherche et pour "tes gentillesses" quotidiennes que je ne suis pas prête d'oublier. Merci ***Claire*** pour nos discussions et bon courage pour la suite. Merci à ***Marie-Ange*** pour ton soutien mais aussi pour toutes nos discussions scientifiques ou non qui ont été une vraie source d'enrichissement. Merci ***Cindy*** d'avoir partagé mes repas du midi pendant cette dernière année, ce fut des moments plus que sympathiques. Je suis vraiment très heureuse d'avoir pu te rencontrer.

Je n'oublierai pas de dire merci à ***Joël Mazurier*** pour l'apprentissage de la cytométrie. Encore désolé pour ma maladresse!

Merci à tous les doctorants ***Marie, Karine, Agata, Florent, Ali*** de l'unité pour tous les bons moments passés ensemble.

Merci à tous les enseignants avec qui j'ai pu partager les travaux pratiques lors de mes heures de monitorat : ***Isabelle Huvent, Florence Delplace, Cécile Fort…***

Une pensée pour ***Martine***, ***Gaëlle*** *et* ***Nadège*** merci pour votre investissement dans mes démarches administratives mais aussi pour toutes les discussions chaleureuses et bons moments passés en votre compagnie. Merci également à ***Yvon,*** pour tes connaissances informatiques.

Mes derniers « remerciements scientifiques » se tournent vers l'autre bout du monde. Et oui ***Yobana***, je ne t'oublie pas! Je garde un excellent souvenir de ta venue en France et j'espère sincèrement que nos vies se recroiseront en France ou en Amérique Latine.

Un grand merci à Humberto, Reyna et leurs filles ***Carmen et Marie-France*** de nous avoir fait découvrir le Mexique. Ce voyage restera, pour Cyril et moi, un souvenir impérissable… Merci aussi à ***Liliana*** pour ton accueil et ta disponibilité lors de ce voyage.

Je tiens à témoigner mon affection à ceux que j'ai eu la chance de compter parmi mes amis et qui m'on tant donné : ***Elodie,*** pour tous les bons moments que nous avons partagé aussi bien aux restos que lors de nos longues heures à papoter au« Zein » Vivement le prochain!; ***Hélène***, non pas d'être partie à Paris pour aller faire ta thèse mais

pour la merveilleuse et sincère amitié qui nous lie depuis 8 ans maintenant ; ***Caro*** alias Madame « Star Lab» : merci d'être toi! Tu es tout simplement géniale! Merci aussi de te soucier de mon bien-être! ***Marie*** merci d'être l'amie que l'on rêverait tous d'avoir! ***Hélène*** ton tour arrive l'année prochaine alors je te souhaite beaucoup de courage et ***Maximilien***, merci pour ton amitié sur laquelle je peux compter depuis maintenant 13 ans.

Je voudrais dire un grand merci à ma famille : mon jumeau ***Alex,*** ma sœur ***Elodie,*** *mon frère* ***Cédric*** et leurs "pièces rapportées", ***Jérôme*** et ***Hélène*** ainsi qu'à mon filleul, ma nièce et mes neveux ***Paul, Emma, Florian et Mathys***, plus formidables les uns que les autres. C'est toujours un plaisir de se réunir et j'espère que cela se poursuivra encore très longtemps. Merci aussi à toi ***Marcel*** de me supporter avec tant de patience au quotidien.

Mes remerciements les plus vifs vont à toi, ma ***Moon***, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour. Je ne sais par où les commencer tellement j'ai à te remercier ma petite maman pour tout ce que tu as su m'apporter pendant toutes ces années. Je te remercierai simplement, ici, d'être celle que tu es c'est à dire une formidable maman! Je crains même qu'il n'en existe pas de meilleure!

Je finirai par remercier mon ***'grand billy'***. Voilà presque 2 ans que tes allers-retours Lille/Paris rythment nos semaines! Malgré la distance, tu as su me donner le sourire et me faire rire chaque jour, et c'est un vrai bonheur pour moi de te retrouver tous les week-ends! (Il n'y en a d'ailleurs pas assez dans l'année). Je te remercie également pour ton soutien sans égal durant cette thèse car je sais que cela n'a pas été facile tous les jours. Les rôles vont bientôt s'inverser et je te promets à mon tour d'être là pour toi pendant ta thèse. Ah! Une dernière chose! Es-tu sur d'avoir bien profité de ta tranquillité hebdomadaire parisienne ?

Hâtez-vous lentement, et, sans perdre courage,
Vingt fois sur le métier remettez votre ouvrage :
Polissez-le sans cesse et le repolissez ;
Ajoutez quelquefois, et souvent effacez. [...]

Nicolas BOILEAU, 1674, l'art poétique (chant I)

A ma moon,

TABLE DES MATIERES

Table des matières

Remerciements

Table des figures

Table des tableaux

Liste des abréviations

Résumé/Summary

Préambule

Introduction **1**

I- Le cycle cellulaire : phases, acteurs et systèmes de sa régulation **1**

1.1 Les phases du cycle cellulaire 1

1.1.1 L'interphase 3

1.1.2 La mitose 3

1.2 Acteurs de la régulation du cycle cellulaire 5

1.2.1 Les kinases cyclines-dépendantes 7

1.2.1.1 Régulations positives des CDKs 9

a- Régulations des CDKs par leur association à une cycline 9

b- Régulations des CDKs par la CAK 9

1.2.1.2 Régulations négatives des CDKs 11

a- Régulations des CDKs par les phosphorylations inhibitrices 11

b- Régulations des CDKs par leur interaction avec les CKI 13

1.2.1.3 Les CDKs et les thérapies anti-cancéreuses 13

1.2.2 Les Cyclines 15

1.2.3 Les complexes Cycline/CDK du cycle cellulaire 17

1.2.4 La dégradation des protéines régulatrices du cycle cellulaire 19

1.3 Systèmes de régulation du cycle cellulaire 21

1.3.1 Les *DNA response checkpoint* 23

1.3.1.1 Point de contrôle G1/S 25

1.3.1.2 Point de contrôle en phase S 27
1.3.1.3 Point de contrôle G2/M 27
1.3.2 Le Spindle Assembly Checkpoint (SAC) 27

II. De la quiescence à l'entrée en phase S 31

2.1 La quiescence 31
2.2 L'entrée dans le cycle cellulaire 31
2.2.1 La transduction du signal 31
2.2.2 La voie Raf/MEK/ERK 33
2.2.3 La voie PI3K/AKT 35
2.3 La progression en phase G1 37
2.3.1 La synthèse protéique 37
2.3.2 Le métabolisme cellulaire 39
2.3.4 Le point de restriction 43
2.3.5 La voie pRb/E2F 43
2.4 La transition G1/S 45
2.4.1 L'initiation de la réplication de l'ADN 45
2.4.2 Mise en place du complexe de pré-réplication 47
2.4.3 Le rôle de la phosphorylation sur les protéines MCMs 47
2.4.4 Formation du complexe d'initiation 51

III. La *O*-GlcNAcylation 53

3.1 Description générale 53
3.2 Les enzymes de la *O*-GlcNAcylation 57
3.2.1 L'UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase ou OGT 57
3.2.1.1 Structure de l'OGT 59
3.2.1.2 Les inhibiteurs de l'OGT 61
3.2.1.3 Modifications post-traductionnelles de l'OGT 63
3.2.2 La N-acétyl-βD glucosaminidase ou OGA 65
3.2.2.1 Structure de l'OGA 67
3.2.2.2 Les inhibiteurs de l'OGA 69
3.2.2.3 Modifications post-traductionnelles de l'OGA 69
3.3 La voie de biosynthèse des hexosamines 71
3.4 *O*-GlcNAcylation et phosphorylation : un dialogue complexe 75
3.4.1 Vision globale du dialogue *O*-GlcNAcylation/phosphorylation 75

3.4.2 Exemples du dialogue *O*-GlcNAcylation/phosphorylation 77
3.4.3. Les complexes OGT/OGA/phosphatases/kinases..... 79
3.5 Régulation des protéines par la *O*-GlcNAcylation 81
3.5.1 Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la localisation subcellulaire des protéines..... 81
3.5.2 Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la stabilité des protéines 83
3.5.3 Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'interaction protéine-protéine 85
3.5.4 Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'activité des protéines 89
3.6 Processus biologiques régulés par la *O*-GlcNAcylation 91
3.6.1 La *O*-GlcNAcylation et la transcription.....91
3.6.2 La *O*-GlcNAcylation et la traduction 93

IV. La *O*-GlcNAc : Du cycle cellulaire au cancer 95

4.1 Impact de la balance *O*-GlcNAc sur le cycle cellulaire 95
4.2 La *O*-GlcNAcylation des protéines dans le cycle cellulaire..... 97
4.3 Impact biologique de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation sur la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses. 103
4.4 Impact de la dérégulation de la balance de *O*-GlcNAcylation sur des protéines particulières 109

***Matériel et Méthodes* 113**

I. Culture cellulaire 113

1.1. Entretien des cellules..... 113
1.2. Synchronisation et traitement des cellules..... 113

II. Analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux..... 114

III. Lyse cellulaire et Western blot..... 114

3.1. Lyse cellulaire..... 114
3.2. Dosage protéique 115
3.3. Immunoprécipitation 115

IV. Immunorévélation des protéines 115

V. Mesure de l'activité de l'OGA..... 116

VI. Immunofluorescence..... 117

VII. Fractionnement cellulaire & Electrophorèse bidimensionnelle (2D) 118

VIII. Identification des protéines par spectrométrie de masse en tandem 119

***Résultats*.....123**

I. Analyse du cycle cellulaire des cellules MCF7 stimulées par le sérum 123

1.1 Analyse du cycle cellulaire des cellules MCF7 par cytométrie en flux.....123

1.2 Analyse de l'activation des voies de signalisation mitogènes et de l'expression des cyclines par Western blot 125

II. Mise en évidence de la dynamique de *O*-GlcNAcylation au cours de la progression du cycle cellulaire induite par les facteurs mitogènes du sérum.....127

2.1. Analyse de la *O*-GlcNAcylation des protéines au cours du cycle cellulaire.....127

2.2. Effet de l'inhibition de la voie PI3K/AKT sur le cycle cellulaire et sur la balance *O*-GlcNAc 129

III. Etude de la dynamique de *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S 131

3.1 Etude de la balance *O*-GlcNAc entre les phases G1 et S dans les cellules MCF7 synchronisées..... 131

3.2 Etude de la dynamique de *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S après synchronisation des cellules MCF7 par l'hydroxyurée 133

3.3 Etude de la dynamique de la *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S dans les cellules épithéliales mammaires normales MCF10A et les fibroblastes Wi38.....135

IV. Etude du couple OGT/OGA à la transition G1/S 141

4.1 Effet de la cycloheximide sur l'expression de l'OGT et de l'OGA dans les cellules en phases G1 et S du cycle cellulaire 141

4.2. Dosage de l'activité de l'OGA endogène à la transition G1/S 143

V. Etude de la localisation de l'OGT et l'OGA dans les phases précoces du cycle cellulaire 145

5.1. Détection par immunofluorescence en microscopie confocale.....145

5.2 Effet de la leptomycine B sur la localisation subcellulaire de l'OGT entre les phases G1 et S 149

VI. Identification des protéines cytosoliques et nucléaires différentiellement *O*-GlcNAcylées à la transition G1/S.....153

6.1 Profil global des protéines *O*-GlcNAc identifiées 153

6.2 Validation des variations de *O*-GlcNAcylation de 3 protéines cytosoliques 157

VII. Conclusion générale 165

Discussion et Perspectives **..... 169**

Bibliographie 181

Annexes

TABLES DES FIGURES &

TABLEAUX

Table des figures

Figure 1. Les différentes phases du cycle cellulaire 2
Figure 2. Changement de conformation d'une CDK suite à son association à une cycline 8
Figure 3. Activation de la CDK par la phosphorylation activatrice de la CAK 8
Figure 4. Phosphorylations inhibitrices des CDKs 10
Figure 5. Les différents complexes Cycline/CDK du cycle cellulaire 16
Figure 6. Cibles majeures des complexes SCF et APC/C au cours du cycle cellulaire 20
Figure 7. Voies de signalisation du point de contrôle G1/S 24
Figure 8. Voies de signalisation du point de contrôle de la phase S 26
Figure 9. Voies de signalisation du point de contrôle G2/M 26
Figure 10. Transition Métaphase/Anaphase en condition normale (SAC inactif) et lors d'une mauvaise orientation des chromosomes (SAC actif) 28
Figure 11. Activation des récepteurs RTK et RCPG suite à la liaison avec leur ligand 30
Figure 12. Schéma simplifié de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK 32
Figure 13. Schéma simplifié de la voie de signalisation PI3K/AKT 34
Figure 14. Activation de la synthèse protéique par la voie mTOR 36
Figure 15. Importance du métabolisme cellulaire lors de la progression en G1 38
Figure 17. Mise en place du complexe de pré-réplication 44
Figure 16. La sortie de quiescence et le franchissement du point de restriction dépendent du complexe pRB/E2F 44
Figure 18. Mise en place du complexe de pré-initiation 50
Figure 19. Régulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation par le couple OGT/OGA 56
Figure 20. Structure des 3 isoformes de l'OGT 60
Figure 21. Localisation des sites de phosphorylation et de *O*-GlcNAcylation de la ncOGT 62
Figure 22. Structure des 2 isoformes de l'OGA, la fOGA et la sOGA 66
Figure 23. Localisation des sites de phosphorylation et de *O*-GlcNAcylation de l'OGA 68
Figure 24. Voie de biosynthèse de l'UDP-GlcNAc dépendante des flux entrants de glucose et glucosamine dans la cellule 70
Figure 25. Dialogue complexe entre la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation 76
Figure 26. Régulation de la protéine p53 par la *O*-GlcNAcylation 82
Figure 27. Influence de la *O*-GlcNAcylation sur la localisation et l'activité de NF-kB 86
Figure 28. Régulation de l'interaction Sp1/TAF110 par la *O*-GlcNAcylation 86
Figure 29. Action de l'OGT sur la voie PI3K/AKT suite à une stimulation par le sérum 88
Figure 30. Régulation de la transcription par la *O*-GlcNAcylation 92
Figure 31. Actions directes et indirectes du couple OGT/OGA 102

Figure 32. Analyse du cycle cellulaire des cellules MCF7 par cytométrie en flux et de l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire par Western blot 122
Figure 33. Variations de la *O*-GlcNAcylation au cours de la progression du cycle cellulaire des cellules MCF7..... 126
Figure 34. Effet de la wortmannine sur le cycle cellulaire et la dynamique de *O*-GlcNAcylation dans les cellules MCF7 128
Figure 35. La dynamique de la *O*-GlcNAcylation est régulée à la transition G1/S.... 130
Figure 36. Dynamique de *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S après synchronisation des cellules MCF7 par l'hydroxyurée.....132
Figure 37. Dynamique de la *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S dans les cellules MCF10A et Wi38..... 134
Figure 38. Effet de différents inhibiteurs de la dégradation des protéines sur la dynamique de O-GlcNAcylation à la transition G1/S 136
Figure 39. La cycloheximide inhibe l'expression protéique de l'OGT et de l'OGA induite par le sérum au cours de la transition G1/S des cellules MCF7 140
Figure 40. L'activité de l'OGA endogène est augmentée à la transition G1/S..... 142
Figure 41. Localisation des protéines *O*-GlcNAcylées, de l'OGT et de l'OGA endogènes à la transition G1/S 146
Figure 42. Effet de la leptomycine B sur la balance *O*-GlcNAc et sur la localisation de l'OGT à la transition G1/S..... 148
Figure 43. Détection des protéines cytosoliques et nucléaires dont la *O*-GlcNAcylation est dépendante du cycle cellulaire 152
Figure 44. Distribution des protéines *O*-GlcNAcylées identifiées par protéomique en fonction du processus biologique dans lequel elles sont impliquées.....154
Figure 45. Variation de la *O*-GlcNAcylation de l'HnRNP K, la Cytokératine 8 et la Caprine-1 160
Figure 46. Variations de la *O*-GlcNAcylation de la MCM2, MCM3, MCM6 et MCM7 dans les phases précoces du cycle cellulaire..... 162

Table des tableaux

Tableau 1. Récapitulatif des différents anticorps utilisés pour les immunorévélations 116
Tableau 2. Protéines différentiellement *O*-GlcNAcylées en G1/S identifiées dans la fraction cytosolique.....156
Tableau 3. Protéines différentiellement *O*-GlcNAcylées en G1/S identifiées dans la fraction nucléaire 158

ABREVIATIONS

Liste des abréviations

4E-BP1	Eukaryotic initiation factor 4E binding protein 1

A

ADN	Acide désoxyribonucléique
APC/C	Anaphase promoting complex/Cyclosome
ARN	Acide ribonucléique
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adénosine-5'-Trisphosphate
ATR	Ataxia telangiectasia ans Rad3 related

C

CAK	CDK-activating kinase
Caprine-1	Cytoplasmic activation/proliferation-associated protein-1
Cdc	Cell division cycle
CDKs	Cycline Dependent Kinases
Cdt1	Cdc10-dependent transcrit
CIP/KIP	CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein
CKI	CDK inhibitors
CKII	Caséine kinase II
CREB	Cyclic AMP response element binding protein
CRM-1	Chromosomal region maintenance protein 1

D

dbcAMP	Dibutyryl-cyclic adenosine monophosphate
DDK	Dbf4-dependent kinase
DON	6-diazo-5-oxo-norleucine
DP	Dimerization partner

E

ECD	Electron capture dissociation
ERK1/2	Extracellular-signal-regulated-kinase
ETD	Electron transfert dissociation

F

fOGA	Full-lenght OGA
FOXM1	Fork head box protein M1

G

G1/G2	Gap 1/Gap2 (Gap = Intervalle)
GAPDH	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GDP	Guanosine diphosphate
GFAT	L-glutamine :D-fructose-6-phosphate amidotransferase
GINS	Go-Ichi-Ni-San

GlcNAc	N-acétylglucosamine
GlcNAc-1-P	N-acétylglucosamine-1-phosphate
$GlcNH_2$	Glucosamine
GlcNH2-6-P	Glucosamine-6-phosphate
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
GTP	Guanosine triphosphate

H

HAT	Histone acetyltransferase domain
HBP	Hexosamine biosynthesis pathway (voie de biosynthèse des hexosamines)
HCF1	Host Cell Factor C1
HDAC	Histone deacetylases
HnRNPs	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
HSP	Heat shock protein

I

IkB	Inhibitor of NF-kB
INK4s	Inhibitors of CDK4
IR	Récepteur à l'insuline
IRS	Insulin receptor substrates

K

KAP	CDK-associated protein phosphatase
kDa	Kilo Dalton

L

LDH-A	Lactate deshydrogénase-A

M

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MCC	Mitotic checkpoint complex
MCM	Mini-chromosome maintenance
Mdm2	Murine Double Minute 2 oncogene
Mek1/2	Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase
MGEA5	Meningioma expressed antigen 5
mOGT	Mitochondrial OGT
MPF	M-phase promoting factor
MPTs	Modifications post-traductionnelles
MRM	Mre1, Rad 50, Nbs1
mTOR	Target of rapamycin
MTS	Mitochondria-targeting sequence
MW	Masse Moléculaire en kDa

N

NAG-thiazoline	1, 2-dideoxy-2-methyl-alpha-d-glucopyranoso(2,1-d)à-Delta2-thiazoline
ncOGT	Nucleocytoplasmic OGT

NEBD	Nuclear Envelope Breakdown
NF-kB	Nuclear Factor-KappaB
NLS	Nuclear localization sequence

O

OGA	*O*-GlcNAcase ou *O*-GlcNAc hydrolase
O-GlcNAcylation	β-linked *O*-N-acetylglucosaminylation (ou *O*-GlcNAc)
OGT	*O*-GlcNAc transférase ou *O*-linked N-acetylglucosaminyltransférase
OGTi	OGT inhibitor
ORC	Origin recognition complex

P

PDK1	Phosphoinositol dependent kinase-1
PFK	Phosphofrutcokinase
PH	Pleckstrin homology domain
pI	Point Isoélectrique
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIKK	Phosphoionositide 3-kinase-related-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3, 4, 5, triphosphate
PMA	Phorbol myristate acetate
PPO	PIP-binding domain activity of OGT
PRb	Protéine du rétinoblastome
PTB	Phosphotyrosine binding
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUGNAc	O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbanate

R

RAPTOR	Regulatory Associated Protein of mTOR
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines-G
RFC like	Replication Factor C-like
rp6S	Ribosomal protein S6
RPA	Replication protein A
RPL	Ribosomal Protein, Large subunit
RPS	Ribosomal Protein, Small subunit
RSK	Ribosomal S6 kinase
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase

S

SAC	Spindle Assembly Checkpoint
SCF	Skp1, Cdc53p/cullin et F-box protein
SH2	Src homology region 2
SHC	SH2 containing protein
sOGA	Short OGA
sOGT	Short OGT
SOS	Son of Sevenless

SP1	Specificity protein 1
SREBP2	Sterol regulatory element binding protein
SSB	Single strand binding
STZ	Streptozotocine

T

TAF110	TATA-binding-protein associated factor
TPR	Tetratricopeptide repeats

U

UDP-GlcNAc	Uridine diphosphate N-acetylglucosamine

Y

YY1	Yin Yang 1

RESUME/SUMMARY

Résumé

Il est connu depuis longtemps que la phosphorylation et l'ubiquitination des protéines jouent un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire. Depuis une dizaine d'années, plusieurs travaux dont ceux de notre équipe, ont montré l'importance d'une autre modification post-traductionnelle pour la progression normale du cycle cellulaire et plus particulièrement de la mitose : la *O*-GlcNAcylation. C'est une *O*-glycosylation atypique car dynamique et réversible, très conservée chez les Eucaryotes. Elle est régulée par l'OGT (*O*-GlcNAc transférase) qui transfère un résidu unique de GlcNAc à partir de l'UDP-GlcNAc sur les sérines ou thréonines de protéines intracellulaires, et l'OGA (*O*-GlcNAcase) capable d'hydrolyser ce résidu.

L'objectif de mes travaux de thèse était de mieux comprendre comment la balance *O*-GlcNAc participe au contrôle de la prolifération cellulaire en se focalisant sur l'entrée dans le cycle cellulaire et la transition G1/S. Dans un premier temps, grâce à différentes approches expérimentales, nous avons caractérisé la dynamique de *O*-GlcNAcylation au cours des phases précoces du cycle cellulaire. Nous avons mis en évidence dans différentes lignées cellulaires une baisse importante du niveau global de *O*-GlcNAcylation lors de l'entrée des cellules synchronisées en phase S. Nous avons montré dans les cellules MCF7 que cette diminution est corrélée à une augmentation de l'expression et de l'activité de l'OGA endogène. Dans un second temps, en couplant la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle, la détection des protéines *O*-GlcNAcylées par western-blot et le séquençage peptidique par spectrométrie de masse en tandem, nous avons identifié une soixantaine de protéines cytosoliques et nucléaires différentiellement *O*-GlcNAcylées entre les phases G0, G1 et S. Ces protéines interviennent dans des processus cellulaires essentiels à la phase G1 tels que la mise en conformation des protéines ou la régulation de la transcription et de la traduction. Par immunoprécipitation, nous avons validé les variations de la *O*-GlcNAcylation de la cytokératine 8, de l'hnRNP K impliquée dans la maturation des ARNm, de la Caprine-1 (cell-cycle associated protein-1) et des protéines MiniChromosome Maintenance MCM3, MCM6 et MCM7 impliquées dans la formation du complexe de pré-réplication.

L'ensemble de ces travaux indique que la progression des cellules dans les phases G1 et S du cycle cellulaire est étroitement liée à la dynamique de *O*-GlcNAcylation, à travers la régulation de l'expression protéique de l'OGT et l'OGA et de l'activité de l'OGA. De plus, les résultats de protéomique apportent pour la première fois une vision globale des protéines différentiellement *O*-GlcNAcylées à la transition G1/S. Ils soulignent un rôle potentiel de la *O*-GlcNAcylation dans les mécanismes intracellulaires contrôlant l'initiation de la synthèse d'ADN et par là même, le maintien de l'intégrité génomique.

Summary

It is known for a long time that phosphorylation and ubiquitination of proteins play a key role in the cell cycle control. Over the last decade, we and others have shown that *O*-GlcNAcylation is also an important post-translational modification in regulating cell cycle progression, and more particularly, the mitosis events. *O*-GlcNAcylation is, an atypical O-glycosylation because it is highly dynamic and reversible, governed by *O*-GlcNAc transferase (OGT) that transfers the N-acetylglucosamine (GlcNAc) residue onto Ser/Thr of intracellular proteins from the nucleotide-sugar donor UDP-GlcNAc, and *O*-GlcNAcase (OGA) that removes the sugar from proteins. This couple of enzymes finely regulates their target proteins by modifying, for example, the rate of phosphorylation of key residues.

The aim of my work was to explore how *O*-GlcNAc balance is implicated in the control of cellular proliferation, by focusing on the entry into the cell cycle and the G1/S transition. First, using several experimental approaches, we characterized the *O*-GlcNAc dynamics during the early phases of the cell cycle. We highlighted in several cell lines that S-phase entry was associated with a marked decrease in the overall level of *O*-GlcNAcylated proteins. We further showed in MCF7 cells that this decrease was correlated with an increase in both expression and activity of endogenous OGA. Then, using a proteomic approach based on separation of proteins by two-dimensional electrophoresis, detection of *O*-GlcNAcylated proteins by western-blot and peptide sequencing by tandem mass spectrometry, we identified around 60 cytoplasmic and nuclear proteins differentially *O*-GlcNAcylated between G0, G1 and S phases. These proteins are involved in key cellular functions that are essential for G1 and S progression, such as protein folding, transcription or translation regulation. By immunoprecipitation, we validated the cell cycle-dependent *O*-GlcNAc variations of cytokeratin 8, hnRNP K which is involved in mRNA processing, Caprin-1 (cell-cycle associated protein 1) and MCM3, MCM6 and MCM7 (MiniChromosome Maintenance) which are all components of the pre-replicative complex.

Taken together, our results show that there is a close link between the dynamics of *O*-GlcNAc and the progression of cells into the early steps of the cell cycle, through the regulation of OGA activity and protein levels of OGT and OGA. In addition, this study provides for the first time a descriptive overview of differentially *O*-GlcNAcylated proteins at the G1/S transition, highlighting a potential role of *O*-GlcNAcylation in the initiation of DNA synthesis and therefore in the maintenance of genome integrity.

AVANT-PROPOS

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une bourse cofinancée par la région Nord-pas-de Calais et le CNRS (Centre National de Recherche Scientifique) au sein de l'Unité de Glyciobologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), dans l'équipe "glycobiologie de la signalisation cellulaire et des glycopathologies" dirigée par le Dr Jean-Claude MICHALSKI, sous la direction scientifique du Dr Anne-sophie VERCOUTTER-EDOUART.

L'ensemble de ces travaux de thèse a fait l'objet des publications et communications scientifiques suivantes :

Publications Scientifiques

Drougat L, Olivier-Van Stichelen S, Mortuaire M, Foulquier F, Lacoste AS, Michalski JC, Lefebvre T and Vercoutter-Edouart AS. **Characterization of *O*-GlcNAc Cycling and Proteomic Identification of Differentially *O*-GlcNAcylated Proteins during G1/S transition.** *Biochim Biophys Acta.* 2012 Sep 3;1820(12):1839-1848.

Olivier-Van Stichelen S, **Drougat L,** Dehennaut V, El Yazidi-Belkoura I, Guinez C, Mir AM, Michalski JC, Vercoutter-Edouart AS and Lefebvre T. **Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression**. Oncogenesis. *In press*

Lefebvre T, **Drougat L**, Olivier-Van Stichelen S, Michalski JC and Vercoutter-Edouart AS. **Antibodies and Activity Measurements for the Detection of *O*-GlcNAc Transferase and Assay of its Substrate, UDP-GlcNAc' by for the issue 'Glycosyltransferases**. Methods and Protocols' of Methods in Molecular Biology, published by Humana Press, Totowa NY (ed. I. Brockhausen). *In press*

Lefebvre T, Dehennaut V, Guinez C, Olivier S, **Drougat L**, Mir AM, Mortuaire M, Vercoutter-Edouart AS and Michalski JC. (2010) **Dysregulation of the nutrient/stress sensor *O*-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease.** *Biochim Biophys Acta.* 1800(2):67-79.

Communication Orale

22nd joint meeting, November 27-29 2011, Lille (France).
« Deciphering the *O*-GlcNAc code during G1/S transition of DNA replication is associated with modulation of *O*-GlcNAc balance. »

Communication par affiche

Cell cycle, Cancer & Development, May 25-28, 2011, Saint Malo (France).
Drougat L, Mortuaire M, Foulquier F, Michalski JC, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS.
« Deciphering the *O*-GlcNAc code during G1/S transition in synchronized human epithelial cells. »

21nd Joint meeting, November 7-9, 2010, Ghent (Belgique).
Drougat L, Mortuaire M, Michalski JC, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS.
« *O*-GlcNAcylation is alterated during the S-phase of the cell cycle. »

3ème Journées scientifiques du Cancéropole Nord-Ouest, 6-7 Mai 2010, Deauville (France).
Drougat L, Mortuaire M, Michalski JC, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS.
« Dynamics of *O*-GlcNAcylation is modified during the re-entry in the cell cycle and is connected with mitogenic signaling pathway in human epithelial cells. »

20nd Joint Meeting, November 8-11, 2009, Köln (Allemagne).
Drougat L, Mortuaire M, Michalski JC, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS.
« Dynamics of *O*-GlcNAcylation is modified during the re-entry in the cell cycle and is connected with mitogenic signaling pathway in human epithelial cells. »

Distinction

Prix du meilleur poster : 20ème Joint Meeting, November 8-11, 2009, Köln (Allemagne)

INTRODUCTION

Préambule

La cellule, connue pour être l'unité fondamentale de la vie, est à la base de tout être vivant aussi bien unicellulaire que multicellulaire. Elle est capable de grandir, de se reproduire, de réagir à son environnement extérieur en intégrant l'information et en y répondant de façon appropriée. Un seul processus permet à la cellule de se reproduire, véhiculant ainsi son matériel génétique et assurant la continuité de la vie, connu sous le nom de cycle cellulaire. La théorie cellulaire est formulée par le botaniste Theodor Schwann et le physiologiste Matthias Schleiden en 1839. Elle est ensuite confirmée en 1858 suite aux observations microscopiques du physiologiste Allemand Rudolf Virchow qui formule l'axiome de la théorie cellulaire « *omni cellula e cellula* », toute cellule provient d'une autre cellule. Le concept de cycle cellulaire est introduit un siècle plus tard en 1953 par A. Howard et S.R. Pelc identifiant les quatre phases du cycle cellulaire. Depuis, notre compréhension des mécanismes participant au déroulement et au contrôle de ce processus biologique n'a cessé de progresser, avec pour dernière distinction en date celle du prix Nobel de physiologie et médecine de R. Hartwell, P. Nurse, et T. Hunt décerné en 2001 pour leur découverte sur les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire.

Toutefois, tous les éléments participant à son contrôle ne sont pas entièrement élucidés ce qui en fait encore, actuellement, un des grands axes de recherche puisque son dérèglement conduit à une prolifération anarchique entraînant l'apparition de pathologies graves tels que les cancers.

Il est maintenant bien admis que le développement d'un cancer est un processus multifactoriel et multi-étapes dans lequel une cellule normale deviendra progressivement cancéreuse. L'altération d'expression de gènes, étape critique dans l'initiation et la progression de cancer, le dysfonctionnement des voies de signalisation, la perte des systèmes de contrôle du cycle cellulaire et une prolifération cellulaire aberrante sont reconnus pour être des marqueurs de cancérisation. Les modifications post-traductionnelles (MPTs), qui se définissent par la liaison covalente et spécifique d'un groupement chimique sur une protéine, jouent un rôle central dans tous ces processus biologiques. Ces dernières années, un grand nombre d'études a permis de mieux comprendre le rôle des MPTs dans ces divers processus biologiques. Elles ont montré que des altérations aussi bien des protéines cibles que des protéines responsables de ces MPTs peuvent être impliquées dans la transformation de cellules normales en cellules

cancéreuses. Ces recherches permettent, notamment, de mettre en exergue le caractère dynamique des aberrations que peut subir une cellule aussi bien au niveau de sa structure, de

l'intégrité de ses composants que dans l'expression de ses gènes lors du processus de cancérisation (Krueger & Srivastava, 2006).

Dans ce cadre, les objectifs de mes travaux de thèse ont consisté à étudier le rôle d'une modification post-traductionnelle, la *O*-linked beta-N-Acetylglucosaminylation ou *O*-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire, en particulier lors de la transition G1/S au sein de cellules humaines.

L'introduction de ma thèse sera découpée en 4 parties. Une première partie sera consacrée à une description générale du cycle cellulaire eucaryote ainsi qu'aux systèmes et acteurs mis en jeu dans sa régulation. La seconde partie de l'introduction mettra l'accent sur l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire jusqu'à leur progression en phase S ainsi qu'aux voies de signalisation nécessaires au bon déroulement de ces évènements. La troisième partie de l'introduction présentera la *O*-GlcNAcylation et son rôle dans divers processus biologiques. Finalement, la quatrième et dernière partie de l'introduction portera une attention particulière sur nos connaissances actuelles de l'implication de la *O*-GlcNAcylation dans le cycle cellulaire et le cancer.

Après avoir replacé mon sujet de recherche dans son contexte scientifique, l'ensemble des résultats obtenus au cours de mes 3 années de thèse sera développé. Dans un premier temps, je vous présenterai le choix de la synchronisation du modèle cellulaire (MCF7) qui nous a permis d'étudier la *O*-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire. Dans un second temps, je vous exposerai les résultats mettant en évidence la relation entre la *O*-GlcNAcylation et le cycle cellulaire, plus particulièrement à la transition G1/S. Les résultats obtenus ont fait l'objet, tout d'abord, d'une étude descriptive mettant en évidence la régulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation au cours des étapes précoces du cycle cellulaire puis d'une étude ciblée qui a consisté dans l'identification des protéines différentiellement *O*-GlcNAcylées au cours de la transition G1/S. Finalement, l'ensemble de ces résultats seront replacés dans un cadre plus général lors de la discussion de mon manuscrit de thèse.

Introduction

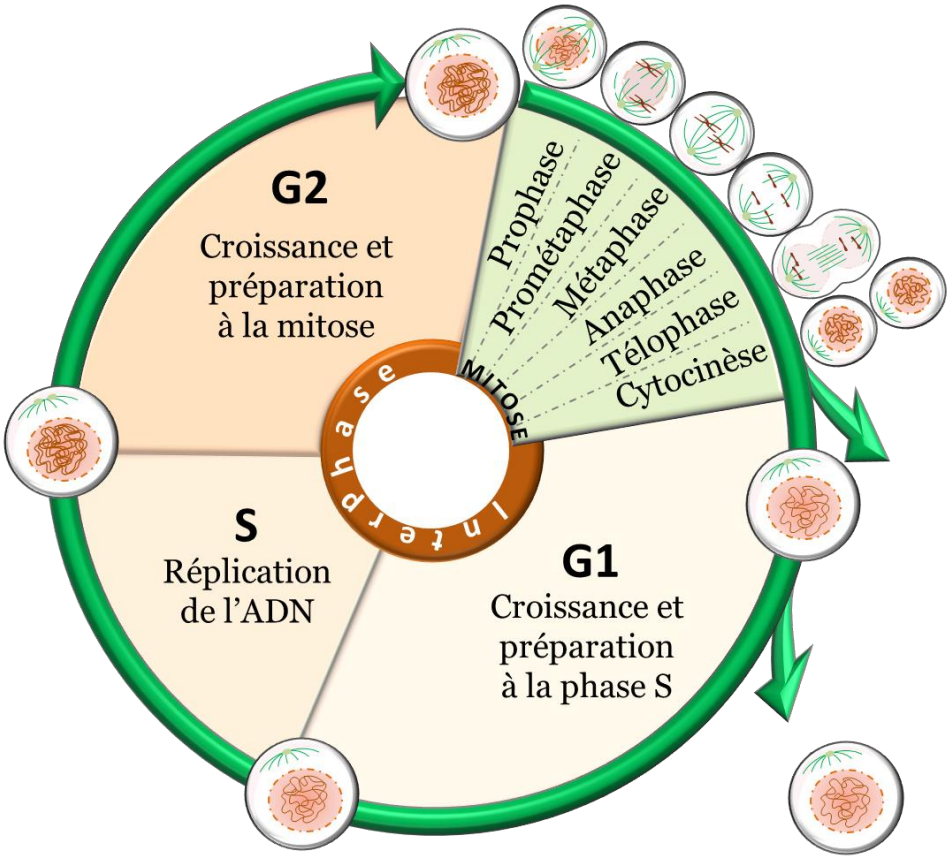
Dans notre organisme constitué d'environ de 10 000 milliards de cellules, nous pouvons distinguer 3 types de cellules en fonction de leur affinité pour le cycle cellulaire : les cellules différenciées qui ne se diviseront plus et qui sont associées à une fonction particulière, dépendante du tissu dans lequel elles se trouvent ; les cellules en division permanente contrôlant l'homéostasie cellulaire en contrebalançant le nombre de cellules mortes ; et des cellules dites quiescentes, c'est-à-dire non prolifératives, qui représentent la majorité des cellules de notre organisme.

Les cellules en division ne s'arrêteront de proliférer que si leur environnement est défavorable à leur progression dans le cycle, dans ce cas, elles entreront en quiescence. A l'inverse des cellules quiescentes pourront entrer dans le cycle cellulaire en réponse à des *stimuli* extracellulaires tels que des hormones et des facteurs de croissance. Une fois entrées dans le cycle cellulaire, les cellules vont dupliquer leur ADN et ainsi transmettre leur patrimoine génétique en donnant naissance à 2 cellules filles génétiquement identiques (Meijer L, 2003).

I- Le cycle cellulaire : phases, acteurs et systèmes de sa régulation

1.1 Les phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se déroule suivant une chronologie bien définie, sa durée est variable selon le type cellulaire mais pour des cellules humaines en culture il dure en moyenne 24 heures (Cooper GM, 2000). Le cycle cellulaire peut-être divisé, selon la morphologie nucléaire de la cellule, en 2 périodes distinctes : l'interphase et la mitose. Une cellule interphasique est caractérisée par la présence d'une chromatine décondensée dans son noyau, contrairement à une cellule mitotique où la chromatine est fortement condensée permettant de distinguer les chromosomes individualisés. L'interphase est la période la plus longue du cycle cellulaire et correspond à l'intervalle entre deux mitoses. La mitose est la division proprement dite des cellules. Deux évènements majeurs se produisent au cours de ces



<u>Figure 1</u>. Les différentes phases du cycle cellulaire

phases, la réplication de l'ADN lors de l'interphase et la ségrégation des chromosomes répliqués dans deux cellules filles lors de la mitose**.**

1.1.1 L'interphase

Le cycle cellulaire s'initie lors de l'interphase qui est composée de 3 phases : la phase G1 (gap 1), la phase S (synthèse) et la phase G2 (gap 2). Les phases G1 et G2 (gap = intervalle) sont des phases préparatrices qui précédent les évènements critiques du cycle cellulaire **(Figure 1)**.

La phase G1 est la phase la plus variable du cycle cellulaire dont la durée est directement dépendante du type cellulaire considéré et de l'environnement dans lequel se trouve la cellule. Lors de cette phase, la cellule présente un métabolisme très actif avec une synthèse accrue de protéines indispensables à la régulation du cycle cellulaire, qui se traduit par une croissance progressive de la taille de la cellule. Le passage en phase S n'a lieu que si la cellule a atteint la taille requise et une quantité de protéines suffisante pour progresser tout au long du cycle cellulaire. Durant cette phase, la cellule va pouvoir choisir de proliférer, de se différencier, d'entrer en quiescence, ou même en apoptose en activant les voies de signalisation appropriées (Blomen & Boonstra, 2007).

La phase S est l'étape durant laquelle l'ADN est dupliqué, la cellule va donc passer d'une quantité 2n chromosomes à 4n. Lors cette phase, il y a également la réplication des centrosomes indispensables à la ségrégation des chromosomes lors de la mitose (Nigg & Stearns, 2011).

La phase G2, plus courte que la phase G1, est la 2ème phase de croissance et de préparation du cycle cellulaire. Elle commence lorsque la réplication de l'ADN est complètement achevée, dès lors où la cellule est devenue tétraploïde. Au cours de cette phase, les protéines indispensables à la poursuite de la division cellulaire sont synthétisées et la cellule continue de croître en vue de la mitose (Cooper GM, 2000).

1.1.2 La mitose

La phase M ou mitose est la phase finale du cycle cellulaire. Elle se caractérise par des modifications structurales, nucléaires et cytoplasmiques, et des mouvements chromosomiques importants. La mitose concerne à la fois la division nucléaire et la division cytoplasmique, respectivement nommées caryocinèse et cytokinèse, et va se conclure par la

formation de 2 cellules filles diploïdes ayant les mêmes caractères morphologiques et physiologiques que la cellule mère. Cette dernière phase du cycle cellulaire est subdivisée en 5 sous-phases **(Figure 1)**:

La prophase correspond à la première étape de la mitose, et commence par la condensation progressive des chromosomes dans le noyau. Lors de la prophase, les centrosomes préalablement dupliqués vont migrer vers les pôles opposés de la cellule et les microtubules vont s'organiser pour commencer la formation du fuseau mitotique (Nigg EA, 2001).

La prométaphase est caractérisée par la rupture de l'enveloppe nucléaire (*Nuclear Envelope Breakdown ou NEBD*) permettant la formation complète du fuseau mitotique. Les chromatides sœurs de chaque chromosome répliqué vont alors pouvoir se connecter, par l'intermédiaire de leur kinétochore, aux microtubules de pôles opposés (Maiato *et al.*, 2004).

La métaphase est définie par le rassemblement des chromosomes condensés au niveau de la plaque équatoriale encore appelée plaque métaphasique (Maiato *et al.*, 2004).

L'anaphase est associée à la migration des chromatides sœurs homologues de chaque chromosome dupliqué à partir de la plaque équatoriale vers les pôles opposés de la cellule (Meijer L, 2003).

La télophase correspond à la disparition du fuseau mitotique suivie d'une décondensation des chromosomes. Une nouvelle enveloppe nucléaire va ensuite se former autour des chromosomes et autres composants nucléaires séparés et se mettra alors en place la cytokinèse (Meijer L, 2003).

La cytokinèse ou division cytoplasmique est l'étape ultime du cycle cellulaire qui se traduit par la séparation physique des deux cellules filles nouvellement formées.

La progression des cellules à travers les différentes phases et sous-phases du cycle cellulaire s'effectue toujours dans cet ordre précis et l'achèvement complet d'une phase est indispensable au commencement de la suivante.

1.2 Acteurs de la régulation du cycle cellulaire

La progression harmonieuse à travers les étapes séquentielles du cycle cellulaire est régulée par de nombreux acteurs dont les protéines clés sont les kinases dépendantes des cyclines ou CDKs (*Cyclin Dependent Kinases)*.

1.2.1 Les kinases cyclines-dépendantes

Initialement, les Cdc pour *Cell division cycle* ont été découvertes chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* à partir de souches mutantes s'arrêtant de proliférer à des endroits précis du cycle cellulaire. Les 1ères Cdc identifiées par Lee Hartwell et Paul Nurse dans les années 1970 sont, respectivement, la Cdc28 chez *S. cerevisiae* et la Cdc2 chez *S. pombe*. Dans les années 1980, leurs homologues sont découverts chez l'Homme par Paul Nurse qu'ils rebaptisent CDKs pour *Cyclin-Dependent Kinase*. Les CDKs appartiennent à la grande famille des sérine/thréonine kinases qui ont pour fonction de catalyser le transfert d'un groupement phosphate sur les résidus sérine et thréonine de leurs substrats. Ces protéines ont une taille comprise majoritairement entre 35 et 40 kDa mais peuvent atteindre jusqu'à 110 kDa en incluant les CDKs dernièrement découvertes, CDK11A et B (Malumbres *et al.*, 2009). La famille des CDKs comprend aujourd'hui 20 membres comportant des similarités de séquences dont 6, les CDKs 1, 2, 3, 4, 6 et 7, sont spécialement impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (Malumbres *et al.*, 2009). Les CDKs interviennent dans d'autres processus biologiques tels que le contrôle de la transcription pour les CDK7-11 et la fonction neuronale pour la CDK5 (Malumbres & Barbacid, 2005). Le niveau d'expression des CDKs reste constant tout au long du cycle cellulaire contrairement à leur activité qui oscille spécifiquement selon les phases du cycle cellulaire (Morgan DO, 1995).

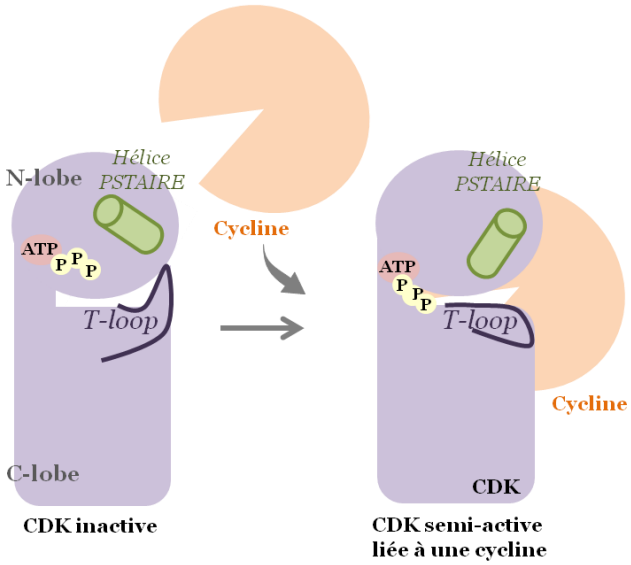
L'activité de ces kinases est contrôlée post-traductionnellement selon 4 niveaux de régulation, que je vais détailler ci-dessous :

- par l'association transitoire avec leur cycline partenaire

- par la phosphorylation activatrice de la CAK (*CDK-activating kinase*)

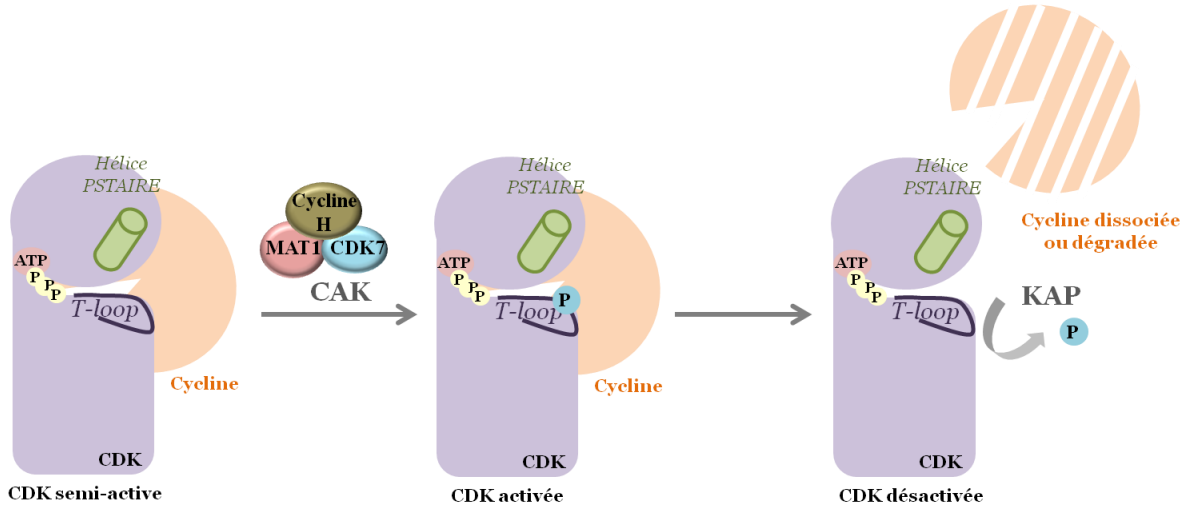
- par les phosphorylations inhibitrices des membres de la famille Wee1/Myt1/Mik1

- et par leur interaction transitoire avec des inhibiteurs spécifiques, les CKI (*CDK inhibitors*) (Pavletich NP, 1999).



<u>Figure 2.</u> Changement de conformation d'une CDK suite à son association à une cycline

(*Modifié à partir de Bartova et al., 2008 et Huse & Kuriyan, 2002)*



<u>Figure 3</u>. Activation de la CDK par la phosphorylation activatrice de la CAK

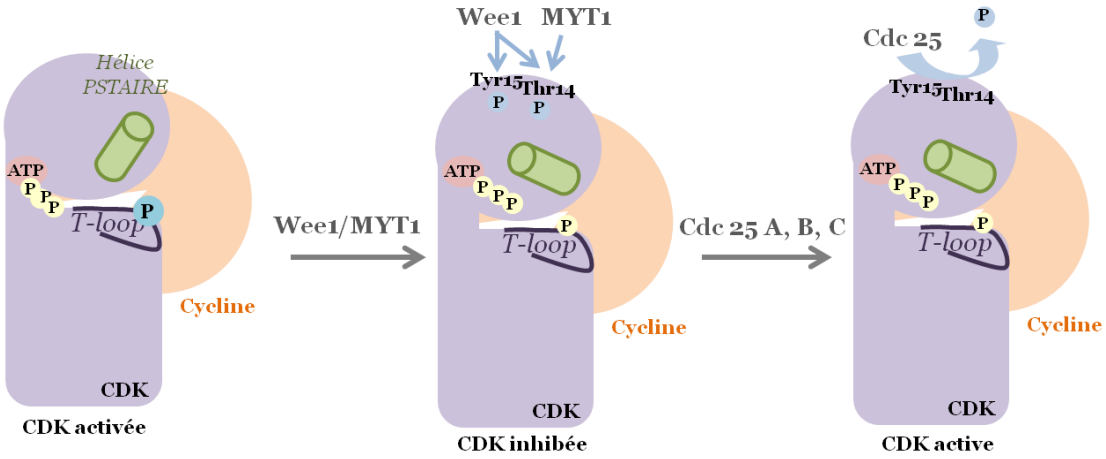
1.2.1.1 Régulations positives des CDKs

a- Régulations des CDKs par leur association à une cycline

L'association des CDKs avec leur cycline partenaire va moduler leur structure devenant favorable à une possible activation **(Figure 2)**. Les CDKs ont une structure bilobée, semblable à toutes les kinases, avec un lobe N-terminal riche en feuillets β et un lobe C-terminal riche en hélices α. Elles se différencient des autres kinases par la présence de 2 régions particulières, une hélice α comportant le motif PSTAIRE (nom des acides aminés en code une lettre) situé en N-terminal et une boucle régulatrice appelée *T-loop* ou boucle d'activation située en C-terminal. En absence de cycline, les configurations prises par l'hélice α présentant le motif PSTAIRE et par la *T-loop* rendent inaccessible le site catalytique aussi bien à la molécule d'ATP qu'aux substrats des CDKs. L'association d'une CDK à une cycline va moduler sa conformation par une rotation de 90°C de son hélice alpha et par un déplacement de sa *T-loop* (Pavletich NP, 1999). Les changements de position de ces deux régions permettent, respectivement, la fixation et une orientation correcte de l'ATP, au sein du site catalytique, compatible avec le transfert du phosphate sur son substrat ainsi que l'accessibilité du substrat à ce site **(Figure 2)**. Ceci étant vrai pour tous les complexes Cyclines/CDKs intervenant au cours du cycle cellulaire que l'on verra au §1.2.3.

b- Régulations des CDKs par la CAK

Suite à leur association à une cycline, les CDK deviennent semi-actives. Leur activation nécessite la phosphorylation d'un résidu thréonine, devenu accessible suite à cette interaction, situé en position 161 pour la CDK1, 160 pour la CDK2, 172 sur CDK4 et 177 pour la CDK6 dans la *T-loop* (Morgan DO, 1995 ; Gu *et al.*, 1992 ; Bockstaele *et al.*, 2009). Cette phosphorylation, catalysée par la kinase CAK (*CDK-activating kinase*), est nécessaire au maintien de l'ouverture du site catalytique indispensable dans la prise en charge des substrats par les CDKs **(Figure 3).** La CAK est une enzyme composée d'une sous-unité catalytique, la CDK7 ; d'une sous-unité régulatrice, la Cycline H, et d'une troisième sous-unité MAT1 (ménage à trois). La CAK est capable d'activer tous les complexes Cycline/CDK impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (Lolli & Johnson, 2005). Son activité est constante au cours du cycle cellulaire sauf dans les cellules quiescentes où elle est plus faible, due à une diminution d'activité de la CDK7, sa sous-unité catalytique (Lolli & Johnson, 2005).



<u>Figure 4.</u> Phosphorylations inhibitrices des CDKs

La phosphorylation de la CAK sur les CDKs peut être reversée par une phosphatase, la KAP (*CDK-associated protein phosphatase*) **(Figure 3)**. La KAP peut lier la CDK en absence ou présence de cycline mais ne peut la déphosphoryler que lorsque la cycline est dégradée ou dissociée de la CDK (Hannon *et al.*, 1994 ; Poon & Hunter, 1995 ; Chinami *et al.*, 2005).

1.2.1.2 Régulations négatives des CDKs

a- Régulations des CDKs par les phosphorylations inhibitrices

Opposé à la phosphorylation activatrice des CDKs par la CAK, le 3ème mécanisme régulant l'activité des CDKs sont les phosphorylations inhibitrices **(Figure 4)**. Pour CDK1 et CDK2, ces phosphorylations ont lieu sur la thréonine 14 et la tyrosine 15 situées près de la poche de fixation de l'ATP, et vont interférer avec la fixation de l'ATP, inhibant alors l'activité de la CDK (Jeffrey *et al.*, 1995). Ces phosphorylations sont assurées par les kinases Wee1 et Myt1. La kinase Wee1 peut catalyser la phosphorylation de la thréonine 14 et de la tyrosine 15, alors que Myt1 ne peut phosphoryler que la tyrosine 15 (Mueller *et al.*, 1995). Contrairement aux CDK1 et CDK2, la CDK4 n'est pas la cible de Wee1 (Bockstaele *et al.*, 2006). Dans certaines conditions (cellules quiescentes, cellules arrêtées en G1 après irradiation aux UV), une phosphorylation inhibitrice sur la tyrosine 17 a été reportée sur CDK4 (Jinno *et al.*, 1999). Ces phosphorylations inhibitrices sont dominantes sur la phosphorylation activatrice catalysée par la CAK, excepté pour la CDK4. Elles peuvent néanmoins être levées par des phosphatases de la famille des Cdc25 afin de permettre l'accès de l'ATP à son site de fixation **(Figure 4).** Dans les cellules humaines, 3 phosphatases de la famille des Cdc25 ont été identifiées : Cdc25A, B et C (Nilsson & Hoffmann, 2000). Les premières études réalisées sur les Cdc25 suggéraient qu'une isoforme régulait spécifiquement un ou plusieurs complexes Cycline/CDK en intervenant à des moments différents du cycle cellulaire (Donzelli & Draetta, 2003). L'expression des Cdc25 A et B varie au cours du cycle cellulaire, contrairement à celle de Cdc25C qui reste constante. La Cdc25A est induite suite aux stimulations des cellules quiescentes par des facteurs mitogènes, elle connaît un pic d'expression à la transition G1/S et va disparaître complètement en fin de mitose (Jinno *et al.*, 1994 ; Boutros *et al.*, 2006). Elle sera dégradée en phase S et G2 par le complexe SCF *(Skp1, cdc53p/cullin et F-box protein)* et en mitose par l'APC/C (*anaphase promoting complex/Cyclosome*). Quant à la Cdc25B, elle sera exprimée à partir de la transition G1/S, s'accumulera en phase S et sera dégradée en fin de mitose. Des travaux plus récents montrent que les 3 isoformes des Cdc25 agissent spécifiquement sur les différents complexes

Cycline/CDK aux transitions G1/S et G2/M jusqu'à la mitose, en passant par la phase S (Boutros *et al.*, 2006).

b- Régulations des CDKs par leur interaction avec les CKI

En plus d'être régulée, à la fois, par l'association à une cycline et par des phosphorylations activatrices et inhibitrices, l'activité des CDKs est aussi contrôlée par leur interaction transitoire à des protéines inhibitrices, les CKIs pour *CDK inhibitors*. Sur la base de leur homologie de séquence et de spécificité d'action, les CKIs sont divisés en deux familles. La famille CIP/KIP (*CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein*) capable d'inhiber toutes les CDKs des phases précoces du cycle cellulaire (G1 et S), et la famille des INK4s (*Inhibitors of CDK4*) qui sont des inhibiteurs spécifiques des CDK4 et CDK6 et qui interviennent en phase G1. Pour inhiber l'activité des CDKs, ces 2 familles emploient des stratégies différentes (Sherr & Roberts, 1999). Les membres de la famille CIP/KIP incluant p21CIP1, p27KIP1 et p57KIP2 s'associent directement au complexe Cycline/CDK afin d'inhiber son action. Alors que p15 INK4b, p16 INK4a, p18 INK4c et p19 INK4d, membres de la famille INK4, lient préférentiellement les CDKs isolées empêchant la formation des complexes Cycline D/CDK4-6 (Pavletich NP, 1999) **(Figure 5).**

Ces inhibiteurs sont aussi capables d'inhiber l'action de la CAK sans interaction directe mais en stabilisant les complexes Cycline/CDK dans une conformation inactive où la thréonine cible de la phosphorylation par la CAK est rendue inaccessible (Lolli & Johnson, 2005).

L'effet combiné de toutes ces régulations, qu'elles soient positives ou négatives, influencent l'activité des CDKs, protéines clés dans le contrôle de la succession harmonieuse des différentes phases du cycle cellulaire.

1.2.1.3 Les CDKs et les thérapies anti-cancéreuses

L'expression, l'activité et la régulation des différentes CDKs sont retrouvées dérégulées dans les cancers. La synthèse d'inhibiteurs des CDKs est donc, depuis plus de 15 ans et encore actuellement, un axe de recherche majeur pour des thérapies anti-cancéreuses. Les CDKs sont en effet la cible de nombreux inhibiteurs divisés en 2 catégories principales :
- les inhibiteurs à large spectre avec les inhibiteurs de 1ère génération comme le flavopiridol, capable d'inhiber les CDKs 1, 2, 4 et 7 (Losiewicz *et al.*, 1994 ; Carlson *et al.*, 1996).

Il a été le premier inhibiteur testé en phase I d'essai clinique (Senderowicz AM, 1999). Cependant les effets d'inhibitions sur plusieurs types de cancers se sont révélés décevants lors des essais cliniques en phase II. Il est actuellement testé en phase I et II d'essai clinique en combinaison avec une autre drogue dont les essais sont plus ou moins concluants selon les expériences; (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00094978). Un autre inhibiteur à large spectre, la (R)-Roscovitine, encore appelée CYC202 ou Seliciclib, inhibe les CDK1, 2, 5, 7 et 9, et plus faiblement les CDK4 et 6 (Bach *et al.*, 2005). Elle est actuellement testée en Phase II d'essai clinique sur des cancers du poumon à petites cellules (http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00372073?term=NCT00372073&rank=1).

- les inhibiteurs spécifiques tels que le AT-7519M et le PD-0332991 inhibent respectivement la CDK2 et la CDK4/6. Ces deux drogues sont actuellement testées en phases I et II d'essais cliniques : l'AT-7519M seul ou en combinaison avec le Bortezomib, inhibiteur du protéasome, sur des myélomes, lymphomes et leucémies et le PD-0332991 seul ou en combinaison avec diverses drogues sur différents types de cancers solides.

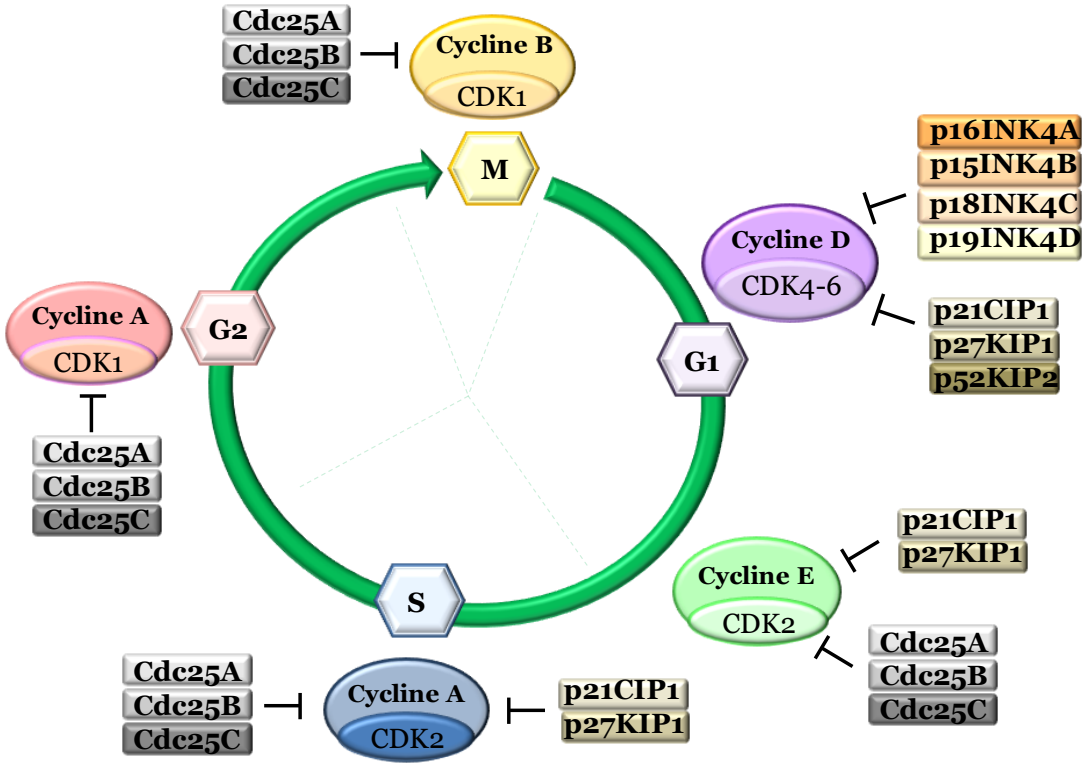
(http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/results?protocolsearchid=7644447)

(http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/results?protocolsearchid=10937776)

(pour revue Cicenas & Valius, 2011)

1.2.2 Les Cyclines

Les cyclines appartiennent à une large famille de protéines de 50 à 90 kDa capables de déterminer l'activité des CDKs. Leur niveau d'expression varie au cours du temps car ces protéines sont instables dû à un cycle de synthèse/dégradation spécifique des phases du cycle cellulaire **(Figure 6)**. Ces variations d'expression cycliques entraînent une activité transitoire et spécifique des CDKs. Les cyclines ont en commun une séquence hautement conservée de 100 acides aminés appelée *Cyclin Box*, requise pour leur interaction avec les CDKs (Malumbres & Barbacid, 2005). Elles contiennent aussi une région hydrophobe capable d'interagir avec les motifs RXL (ou 'Cy' motif) présents à la surface d'une majorité de leurs substrats et des inhibiteurs de CDKs. Les cyclines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire peuvent être divisées en 2 familles : les cyclines G1 composées des cyclines de type D (D1, D2 et D3) et de type E (E1 et E2), et les cyclines mitotiques incluant les cyclines de type A (A1 et A2) et de type B (B1-B3) (Schafer KA, 1998).



<u>Figure 5.</u> Les différents complexes Cycline/CDK du cycle cellulaire et leurs inhibiteurs

(Adapté de Schwartz & Shah, 2005 et de Boutros et al., 2007)

L'accumulation périodique de ces cyclines est essentielle à la succession correcte des phases du cycle cellulaire mais leur dégradation est tout aussi importante. Les cyclines G1 contiennent une séquence PEST riche en proline (P), glutamate (E), sérine (S) et thréonine (T) et les cyclines mitotiques, une région appelée boîte de destruction ou *D-box*. Ces deux séquences particulières sont la cible de la voie de dégradation dépendante de l'ubiquitine mais vont être prises en charge par deux complexes de dégradation différents, les complexes SCF et APC/C, intervenant à des moments précis du cycle cellulaire (comme décrit au §1.2.4) (Schafer KA, 1998). Entre le laps de temps où elles sont synthétisées puis dégradées, les cyclines vont se complexer spécifiquement avec une CDK afin de réguler transitoirement son activité.

1.2.3 Les complexes Cycline/CDK du cycle cellulaire

Les cellules de mammifère contiennent plusieurs cyclines et CDKs qui vont ainsi former différents complexes cycline/CDK spécifiques des phases du cycle cellulaire (Schafer KA, 1998) **(Figure 5).** Les CDKs sont les sous-unités catalytiques de ce complexe alors que les cyclines sont les sous-unités régulatrices.

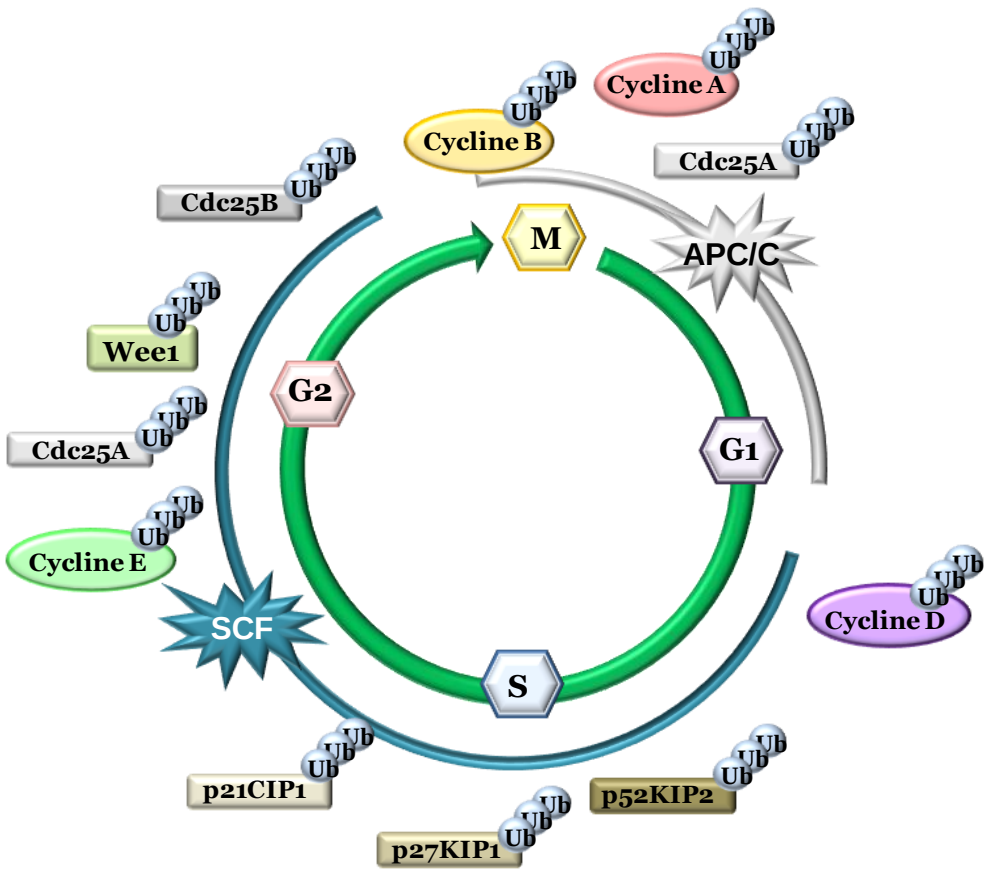
Lors de l'entrée des cellules dans le cycle, la synthèse de la cycline D est rapidement induite en réponse aux facteurs mitogènes, elle va alors pouvoir s'associer à la CDK 4 ou 6 et assurer la progression des cellules en phase G1. En fin de G1 se met en place le complexe Cycline E/CDK2 nécessaire à la transition G1/S où l'expression de la cycline E est maximale (Schafer KA, 1998). La cycline E est ensuite progressivement dégradée par le protéasome lors de la phase S. La CDK2 ainsi libérée va alors s'associer à la cycline A afin d'activer la réplication de l'ADN, indispensable au bon déroulement de la phase S (Woo & Poon, 2003). Les cyclines mitotiques qui peuvent s'associer toutes les 2 à la CDK1, vont ensuite prendre le relais pour assurer la progression des cellules dans les dernières étapes du cycle cellulaire. La CDK1 est d'abord activée par la cycline A en phase G2, puis par la cycline B. Le complexe Cycline B/CDK1 encore appelé MPF pour *M-phase promoting factor*, responsable de la transition G2/M, va se former au fur et à mesure de la synthèse de la cycline B **(Figure 5)**. Une fois les cellules entrées en mitose, la dégradation de la cycline B en métaphase et l'inactivation subséquente du MPF, sont indispensables pour déclencher la sortie de mitose (Clute & Pines, 1999 ; Parry *et al.*, 2003 ; Echard & O'Farrell, 2003).

Comme mentionné ci-dessus et décrit ensuite au §1.2.4, la dégradation spécifique des cyclines permet une action de sa CDK partenaire à un moment précis du cycle cellulaire. Une fois activés, les complexes Cycline/CDK phosphorylent spécifiquement leurs substrats qui contribuent à la progression des cellules dans les phases suivantes du cycle cellulaire. Les substrats de ces complexes possèdent une ou plusieurs séquences consensus de type S/T-P-X-(K/R) contenant les sites cibles de phosphorylation des CDKs (Moses *et al.*, 2007). Par exemple, la protéine du rétinoblastome contient 16 sites consensus pour la phosphorylation des CDKs (Harbour *et al.*, 1999). Elle est d'ailleurs la cible des complexes Cycline D/CDK4-6 et Cycline E/CDK2. Son hyperphosphorylation par ces complexes est indispensable à la libération du facteur E2F, qui sera alors capable de jouer son rôle de facteur de transcription (cf §2.3.5, **Figure 16**). Un autre exemple est celui des protéines MCM 2-7 (*MiniChromosome Maintenance 2-7*) qui sont des composants du complexe de pré-réplication. Les différentes MCMs de ce complexe sont des cibles des complexes Cycline E/CDK2 et Cycline B/CDK1 dont les phosphorylations identifiées sur les protéines MCMs seront détaillées dans le § 2.4.3.

1.2.4 La dégradation des protéines régulatrices du cycle cellulaire

Le passage d'une phase à une autre dans le cycle cellulaire doit se faire de manière unidirectionnelle et irréversible. Cela est possible grâce à la dégradation ciblée des protéines, aussi bien nucléaires que cytoplasmiques, par un complexe enzymatique, le protéasome 26S. Le protéasome 26S est un complexe multiprotéique formé d'un core catalytique, le protéasome 20S, et de deux sous-unités régulatrices, la 11S et la 19S. Avant que les protéines ne soient envoyées au protéasome, elles vont devoir être ubiquitinylées afin d'être reconnues et dégradées par ce complexe. L'ubiquitinylation des protéines est l'action successive d'une série de 3 enzymes : E1, l'enzyme activatrice, E2, l'enzyme de conjugaison et E3, l'ubiquitine ligase. L'ubiquitine est une protéine composée de 73 acides aminés qui se lie de façon covalente sur les résidus lysines des protéines (Herrmann *et al.*, 2007).

Les protéines régulatrices du cycle cellulaire sont ubiquitinylées par 2 complexes ubiquitine ligase majeurs : Le complexe SCF (*Skp1, cdc53p/cullin et F-box protein*) et le complexe APC/C (*anaphase promoting complex/Cyclosome).*



<u>Figure 6.</u> Cibles majeures des complexes SCF et APC/C au cours du cycle cellulaire

Pour chacun des complexes SCF et APC/C, la reconnaissance spécifique de leurs cibles est portée par des substrats variables essentiels: 3 protéines F-Box possibles pour le complexe SCF, SKP2 (*S-phase kinase-associated protein*), FBW7 (*F-box and WD-40 domain protein 7*) et β-TRCP (*β-transducin repeat-containing protein*), et 2 activateurs pour le complexe APC/C, CDC20 et CDH1.
Le complexe SCF intervient de la phase G1 jusqu'à la mitose sur des protéines contenant un domaine F-Box. Le complexe SCF agit sur de nombreuses cibles dont p21CIP1, p27KIP1, p57KIP2, WEE1, la cycline D et la cycline E, permettant la progression des cellules respectivement dans les phases G1 et G2/S (Spruck & Strohmaier, 2002) **(Figure 6).** Les cyclines G1 sont donc reconnues par la protéine F-box du complexe SCF grâce à leur domaine F-box, leur séquence PEST (§1.2.2) servant à leur ubiquitinylation par ce complexe. Une fois ubiquitinylées, elles seront dégradées vers le protéasome.

Le complexe APC/C va ensuite être actif de la mitose jusqu'à la phase G1 et reconnaît principalement les protéines mitotiques. Contrairement au complexe SCF, l'APC/C reconnaît une séquence spécifique contenue dans les boîtes de destruction situées à l'extrémité N-terminale des protéines cibles, la D-box (motif oligopeptidique RxxL) ou la KEN-box (K : lysine ; E : glutamate ; N : aspartate) (§1.2.2). Ces principales cibles sont les cyclines mitotiques dont la dégradation est requise pour initier la sortie de mitose (Peters JM, 2002) **(Figure 6)**.

1.3 Systèmes de régulation du cycle cellulaire

Chaque progression dans le cycle cellulaire est un nouvel enjeu pour la cellule afin qu'elle transmette son matériel génétique le plus fidèlement possible. Les différentes phases du cycle cellulaire se succèdent toujours dans le même ordre et une cellule est autorisée à passer à l'étape suivante si et seulement si l'étape précédente s'est déroulée et achevée correctement.

Pour pallier aux éventuelles anomalies, la cellule a mis en place un système de contrôle. Ce système comprend plusieurs points de contrôle, appelés aussi *checkpoints*, placés à différentes étapes du cycle cellulaire.

Deux types de points de contrôle existent : les *DNA damage checkpoint* ou *DNA response checkpoint* relatifs aux dommages à l'ADN et le *checkpoint* du fuseau (SAC ou *Spindle Assembly Checkpoint*) contrôlant la ségrégation des chromosomes. Les évènements essentiels du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN et la ségrégation des chromosomes, sont ainsi rigoureusement surveillés. En cas d'anomalies, ces points de contrôles sont activés et ont pour objectif de ralentir ou de bloquer la progression du cycle cellulaire. Des mécanismes de réparation ou de mort cellulaire lors de lésions irréparables sont alors induits (Kastan & Bartek, 2004).

1.3.1 Les *DNA response checkpoint*

Les *DNA response checkpoint* vont contrôler la qualité de l'ADN avant, pendant et après sa réplication pour assurer la transmission d'un génome correct aux générations suivantes. Les lésions causées à l'ADN peuvent être d'origine endogène (métabolisme oxydatif, défauts de réplication) ou exogène (agents physiques et/ou chimiques). Des protéines dites senseurs vont être capables de détecter l'ADN endommagé et se mettra alors en place un réseau de type médiateurs, transducteurs et effecteurs **(Figures 7, 8 et 9)**.

Les senseurs sont le complexe MRN (*Mre1, Rad50, Nbs1*), spécifique des cassures doubles brins de l'ADN car s'y lient directement les complexes 9-1-1 (*Rad9-Rad1-Hus1*) et RFC like (*Replication Factor C-like*) qui ne sont, quant à eux, pas spécifiques de la nature du dommage à l'ADN. Une fois les complexes mis en place, les kinases ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) et ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related*), appartenant à la famille PIKK (*Phosphoinositide 3-kinase-related kinase)* vont être rapidement recrutées.

Les protéines ATM et ATR vont ensuite activer par phosphorylation des médiateurs tels que BRCA1 et MDC1. Ces médiateurs sont essentiels pour l'amplification et à la modulation de l'activité d'ATM et d'ATR ainsi que pour l'interaction avec leurs substrats. Les kinases ATM et ATR sont aussi capables de phosphoryler, respectivement, Chk2 et Chk1 qui sont des kinases transductrices du signal. L'axe senseurs/transducteurs enclenché lors des *checkpoints* reflète le type de dommage à l'ADN. Par contre, les effecteurs et leurs cibles finales diffèrent selon la phase du cycle cellulaire **(Figures 7, 8 et 9).**

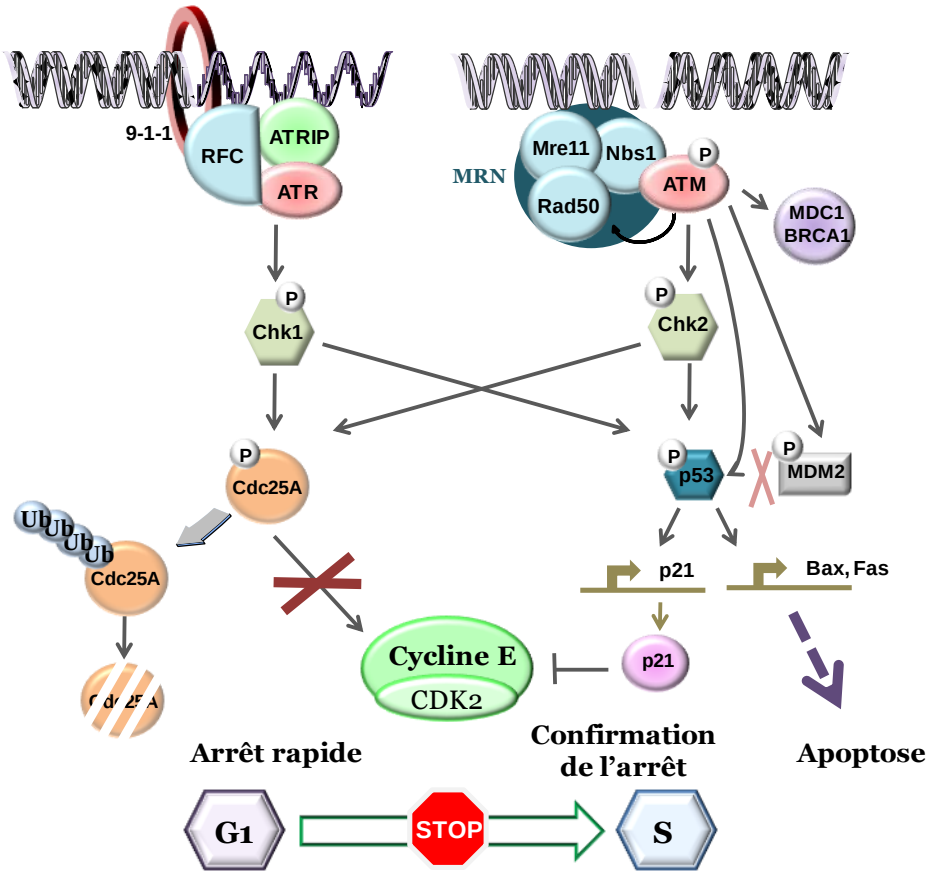


Figure 7. Voies de signalisation du point de contrôle G1/S

1.3.1.1 Point de contrôle G1/S

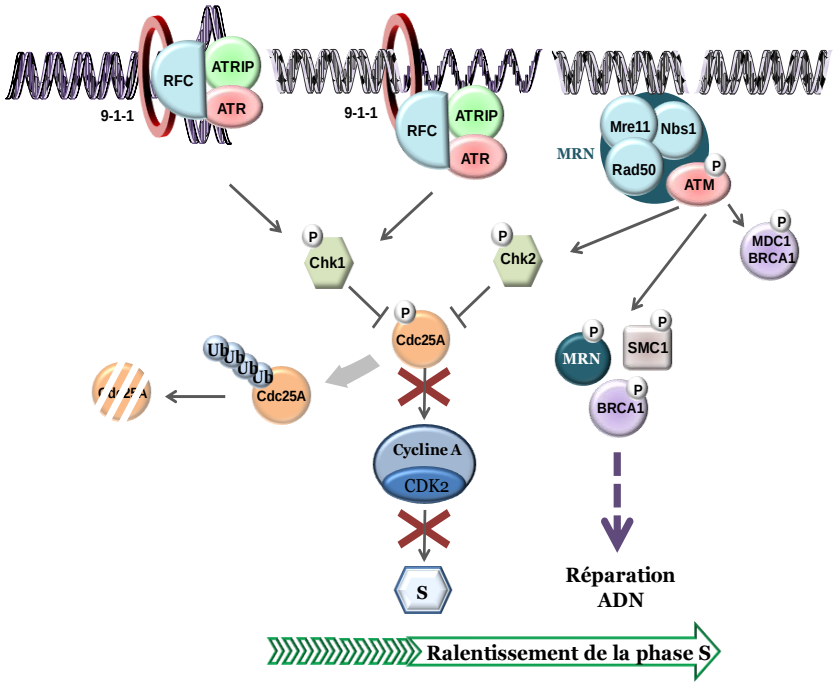
Le point de contrôle situé à la transition G1/S vérifie l'état de l'ADN afin d'empêcher la cellule d'entrer en phase S avec un ADN endommagé, de façon à maintenir l'intégrité du génome lors de la réplication de l'ADN.

Le suppresseur de tumeur p53 et l'inhibiteur de CDKs p21CIP1 sont les protéines clés dans l'arrêt des cellules à la transition G1/S. P53, surnommée la gardienne du génome, est connue pour être faiblement exprimée dans les cellules normales, en absence de stress. En condition normale, p53 connaît un turnover très rapide dû à sa séquestration par l'ubiquitine ligase Mdm2 (*Murine Double Minute 2 oncogene)*. Mdm2 permet son ubiquitinylation, favorisant ainsi sa dégradation par le protéasome 26S (Michael & Oren, 2001 ; Xirodimas *et al.*, 2003).

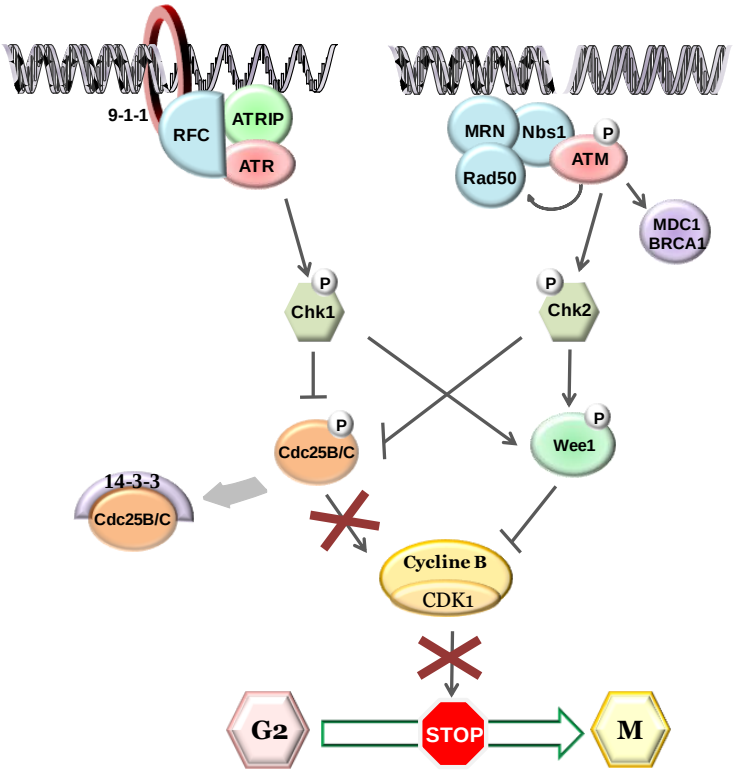
Lors de dommage à l'ADN, p53 est au contraire stabilisée par phosphorylation directe de Chk1, Chk2, ATR et d'ATM ou par la phosphorylation de son régulateur négatif Mdm2, empêchant ainsi sa dégradation (Rodier *et al.*, 2007). La protéine p53 est alors accumulée dans le noyau où elle va stimuler l'expression de ses gènes cibles comme p21CIP1. L'accumulation de p21 entraîne l'inhibition du complexe Cycline E/CDK2. Les cellules sont alors stoppées dans leur progression en phase G1. L'arrêt en G1 facilite la réparation de l'ADN et dans le cas de lésions irréparables, des protéines pro-apoptotiques comme Bax et Fas sont exprimées suite à l'induction de leur gène par p53, entraînant la mort cellulaire (Kastan & Bartek, 2004) **(Figure 7)**.

P53 est amplement régulée par les MPTs non seulement par l'ubiquitinylation et la phosphorylation, comme nous venons de le voir mais aussi par la *O*-GlcNAcylation, décrit au cours du §3.5.2 **(Figure 26)** dans la 2ème partie de l'introduction (Yang *et al.*, 2006). De plus, sa régulation est importante puisque dans plus de 50 % des tumeurs p53 est retrouvée inactivée (Vogelstein, 2000), ce qui explique le développement de nombreuses thérapies anti-cancéreuses qui ciblent p53.
(http://www.cancer.gov/clinicaltrials/search/view?cdrid=643716&version=HealthProfessional&protocolsearchid=10937897).

Dès la détection des dommages à l'ADN, lors de ce checkpoint, une autre voie de signalisation indépendante de p53 est mise en place plus rapidement. Les transducteurs Chk1 et Chk2 sont capables de phosphoryler directement Cdc25, conduisant à sa dégradation. La phosphatase Cdc25 n'étant plus présente, le complexe Cycline E/CDK2 utile à la progression des cellules en G1/S ne peut plus être activé (Kastan & bartek, 2004) **(Figure 7)**.



<u>Figure 8.</u> Voies de signalisation du point de contrôle de la phase S



<u>Figure 9.</u> Voies de signalisation du point de contrôle G2/M

1.3.1.2 Point de contrôle en phase S

Ce point de contrôle est enclenché si l'ADN est endommagé suite à des stress d'origine chimique (agents de l'environnement) ou physique (radiations ionisantes), ou lorsque la réplication ne se déroule pas correctement.

Il aboutit à un ralentissement réversible et transitoire de la phase S. L'axe ATM/ATR-Chk1/chk2-Cdc25A-Cycline E/CDK2, décrit ci-dessus, participe aussi à ce checkpoint (Lukas *et al.*, 2004). Cette cascade coopère avec une autre voie impliquant, entre autres, les protéines Nbs1, BRCA1 et SMC1, cibles d'ATM. Ces protéines sont impliquées dans la signalisation de ce checkpoint mais aussi directement dans le processus de réparation d'ADN (Sancar *et al.*, 2004) **(Figure 8)**.

1.3.1.3 Point de contrôle G2/M

La cible principale du point de contrôle G2/M est le complexe Cycline B/CDK1. Comme pour le point de contrôle G1/S, les cascades ATM/ATR-Chk1-Chk2 sont activées. Leur activation aboutit à la séquestration cytoplasmique par la protéine 14-3-3 des phosphatases Cdc25B/C qui activent normalement la CDK1 à la transition G2/M (Sancar *et al.*, 2004). Les phosphorylations inhibitrices sur les Thr14 et Tyr15 du complexe Cycline B/Cdk1 sont maintenues et assurées par Wee1 qui est activée par Chk1/2. Les cellules ne peuvent donc plus progresser entre la phase G2 et M du cycle cellulaire (Lukas *et al.*, 2004 ; Sancar *et al.*, 2004) **(Figure 9)**.

1.3.2 Le Spindle Assembly Checkpoint (SAC)

La progression du cycle cellulaire peut s'interrompre une dernière fois entre la métaphase et l'anaphase de la mitose. Ce dernier point de contrôle assure la ségrégation des chromosomes lors de la mitose en surveillant que leur attachement au fuseau mitotique est correct. Les principales cibles de ce checkpoint sont le complexe APC/C, la sécurine et la Cycline B (**Figure 10**). Lors d'un problème détecté dans l'attachement des chromosomes, le *mitotic checkpoint complex* (MCC) est activé et permet l'inhibition de l'APC/C. Le MCC est formé par les protéines MAD2, BUBR1/Mad3 et BUB3 (Musacchio *et al.*, 2007). Ces protéines sont concentrées au niveau des kinétochores permettant de générer le signal inhibiteur dès qu'un problème est détecté. Pour cela, le MCC est capable de séquestrer la protéine Cdc20, cofacteur du complexe APC/C afin de l'inhiber (Sudakin *et al.*, 2001).

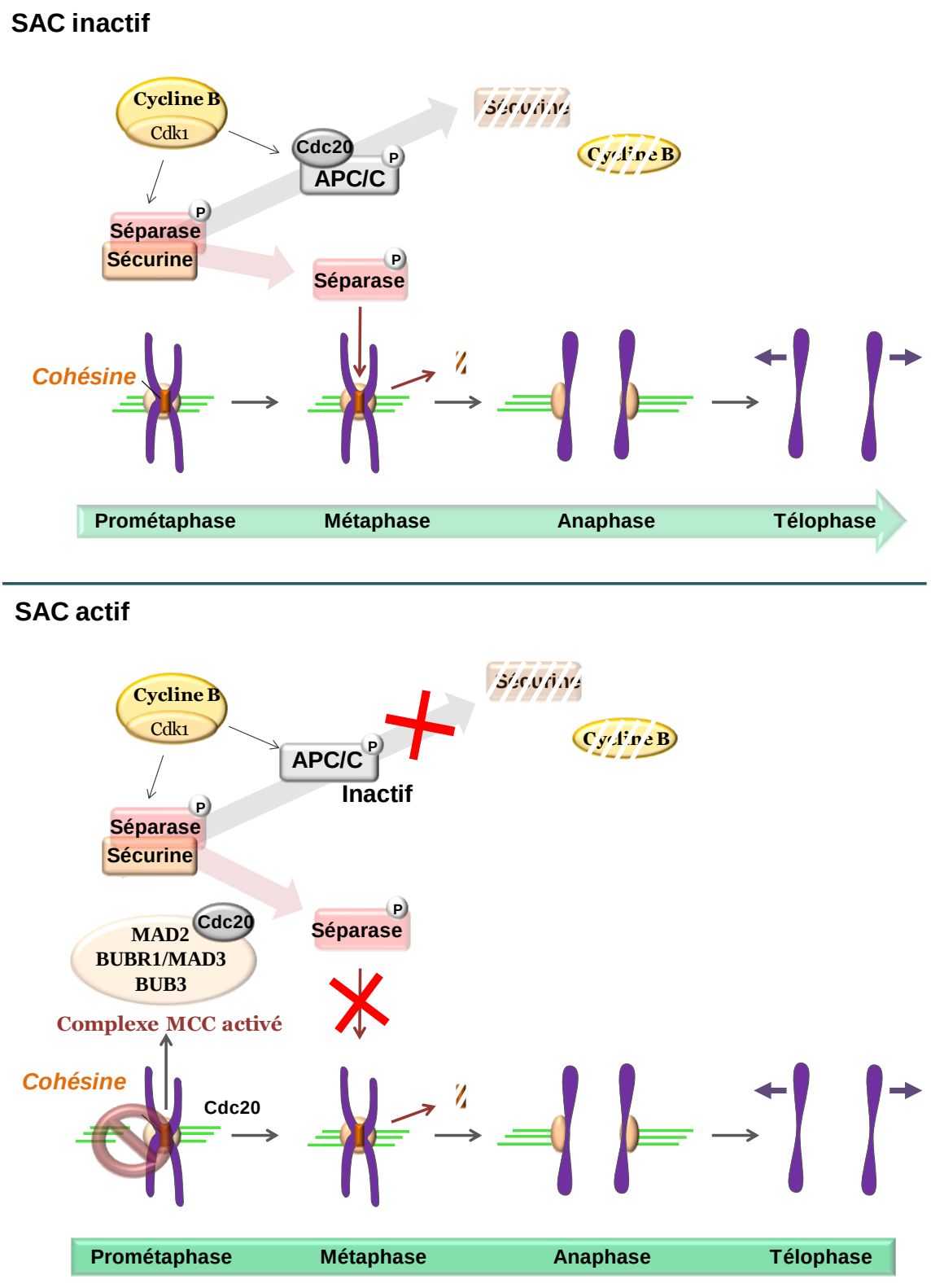
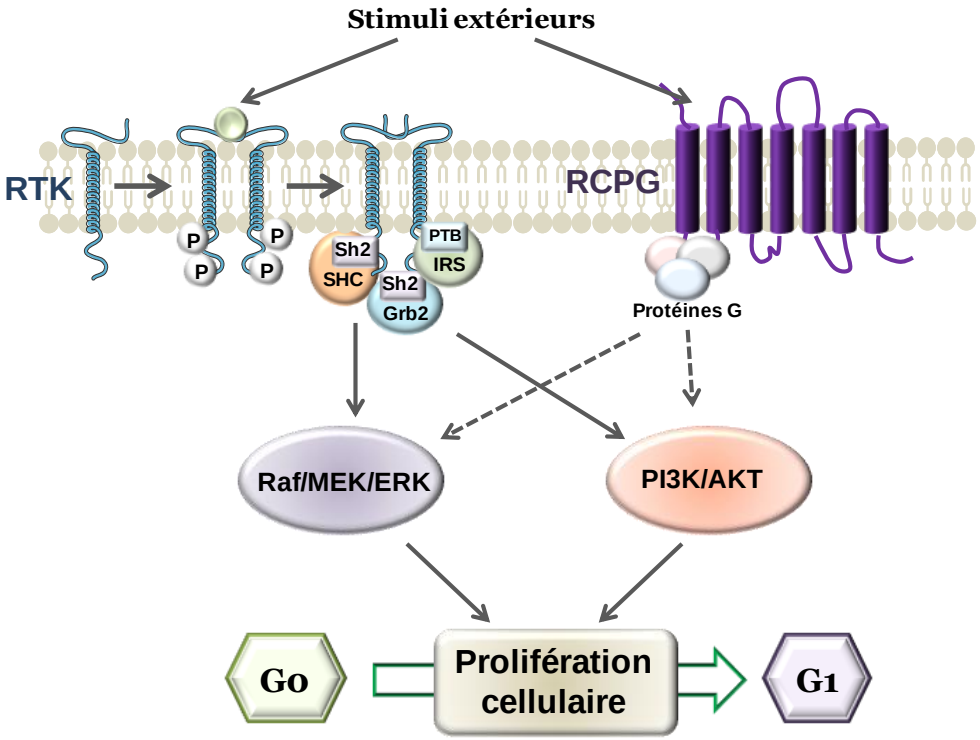


Figure 10. Transition Métaphase/Anaphase en condition normale (SAC inactif) et lors d'une mauvaise orientation des chromosomes (SAC actif)

L'APC/C inactivé ne peut plus ubiquitinyler ses cibles comme la cycline B, empêchant sa dégradation par le protéasome. Le partenaire de la cycline B, la CDK1 n'est donc pas inactivée, évènement indispensable à la sortie de mitose (Peters JM, 2006). Le SAC prolonge la métaphase en inhibant aussi la sécurine, un inhibiteur de la séparase. La séparase est une enzyme protéolytique de la famille des caspases. Elle permet la séparation les chromatides sœurs lors de l'anaphase en clivant les complexes cohésines, évènement essentiel à la ségrégation des chromosomes (Musacchio *et al.*, 2007).



<u>Figure 11.</u> Activation des récepteurs RTK et RCPG suite à la liaison avec leur ligand

Cette première partie introductive permet d'avoir une vue d'ensemble du cycle cellulaire, ainsi que des acteurs et des systèmes de régulation impliqués dans sa progression. Le travail de ma thèse s'est focalisé sur une étape particulière du cycle, la transition G1/S. La 2ème partie de l'introduction sera donc consacrée aux évènements nécessaires pour la progression des étapes précoces du cycle cellulaire.

II. De la quiescence à l'entrée en phase S

2.1 La quiescence

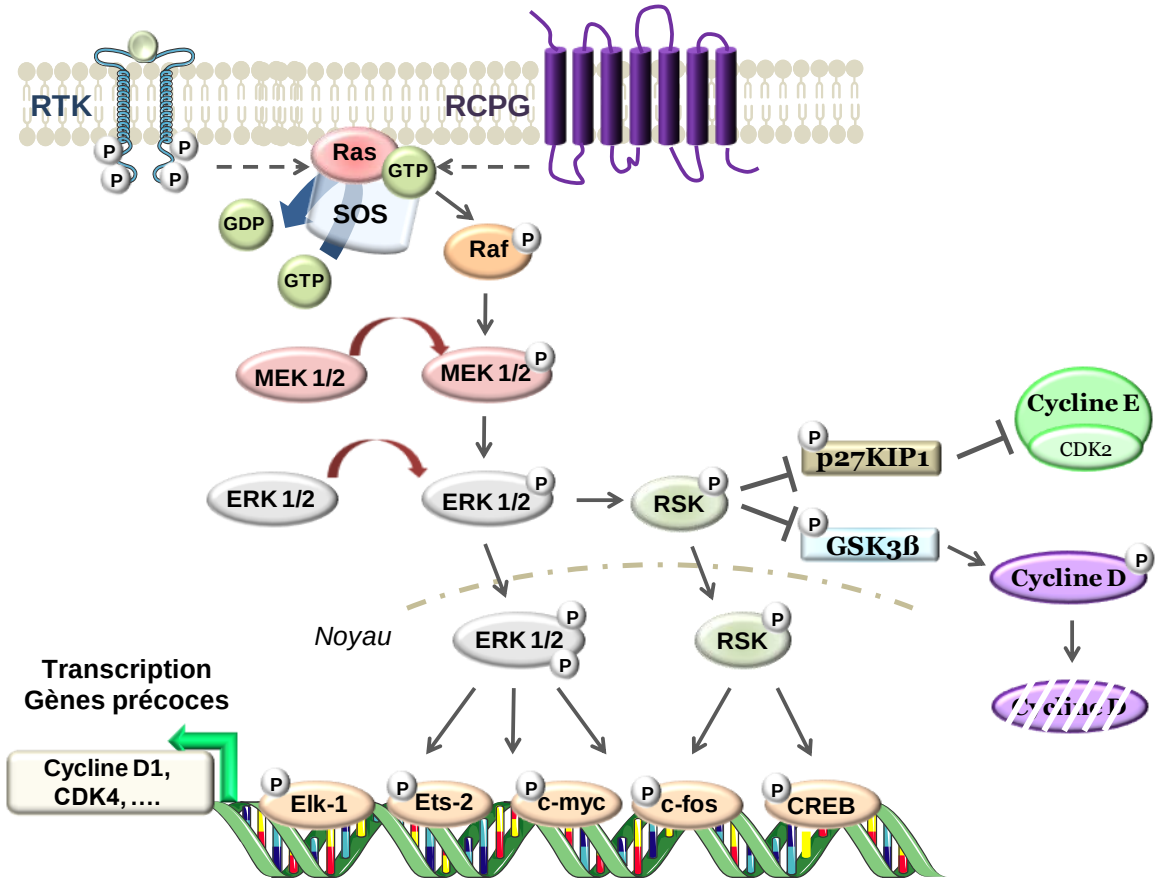
Les cellules quiescentes ou en phase G0 (G=Gap pour intervalle) sont caractérisées par une absence de prolifération. Elles présentent une croissance et un niveau de synthèse réduits bien que leur métabolisme soit actif. Certaines cellules de notre corps resteront jusqu'à leur mort dans cet état de dormance alors que d'autres en condition extracellulaire favorable s'engageront dans le cycle cellulaire (Cooper GM, 2000). *In vitro*, il est bien établi que des cellules en culture privées de sérum deviennent quiescentes et peuvent ainsi être synchronisées en phase G0 (Blomen & Boonstra, 2007).

2.2 L'entrée dans le cycle cellulaire

L'entrée dans le cycle cellulaire est contrôlée par l'intermédiaire de facteurs mitogènes présents dans l'environnement extracellulaire. Ils sont essentiels à 2 niveaux du cycle cellulaire, lors de la transition G0/G1 et au cours de la progression des cellules en phase G1. Tant que ces stimuli extracellulaires comme les facteurs de croissance et/ou hormones sont présents dans l'environnement, la cellule continuera de proliférer. Les cellules sont capables de détecter ces signaux grâce à une grande variété de récepteurs transmembranaires présents à la surface cellulaire. Ces facteurs mitogènes vont activer spécifiquement les récepteurs à activité tyrosine kinase ou couplés aux protéines G. L'activation de ces récepteurs va permettre la transduction du signal au sein de la cellule grâce à un réseau de voies de signalisation indiquant à la cellule de proliférer (Meijer L, 2003).

2.2.1 La transduction du signal

La première étape de la transduction du signal est la liaison spécifique entre les récepteurs et leurs ligands.



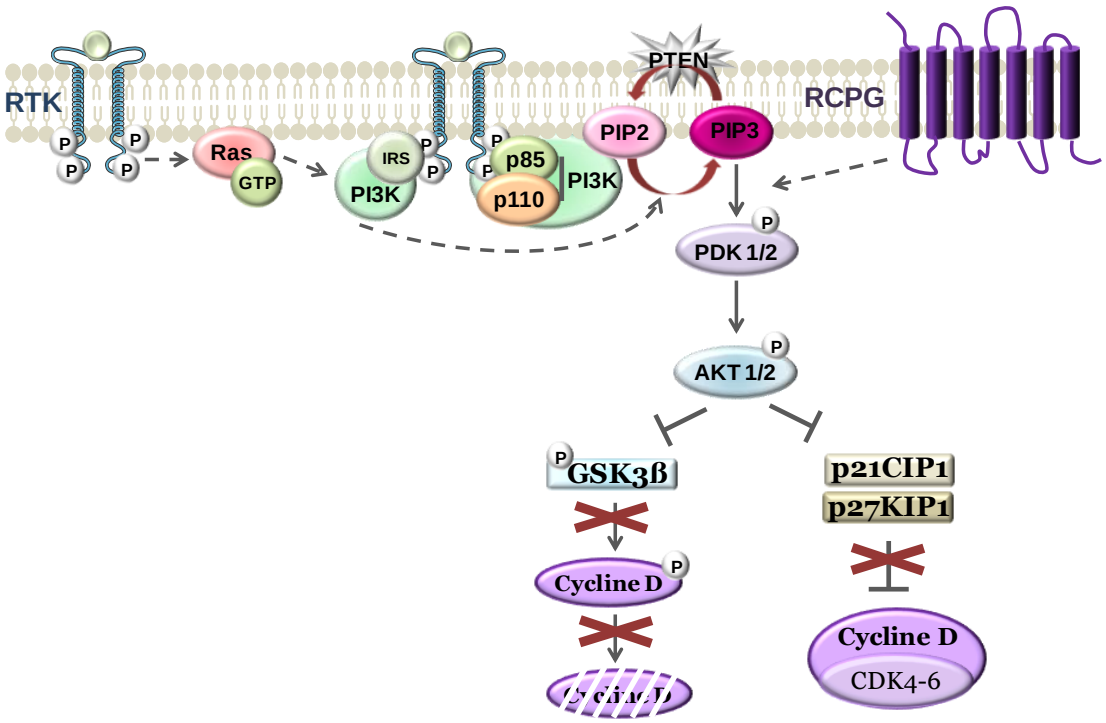
<u>Figure 12.</u> Schéma simplifié de la voie de signalisation Raf/MEK/ERK

Dans le cas d'une stimulation de récepteur à activité tyrosine kinase (RTK), la liaison de leur ligand entraîne une dimérisation du RTK et son autophosphorylation sur certains résidus tyrosine de sa partie C-terminale. Ces résidus tyrosine phosphorylés deviennent des points d'ancrage pour des protéines à domaines SH2 (*Src homology region* 2) ou PTB (*phosphotyrosine binding*). Une fois le récepteur activé et phosphorylé, diverses protéines adaptatrices (SHC (*SH2 containing protein*), IRS, Grb2) sont recrutées, initiant l'activation de nombreuses voies de signalisation notamment les voies Raf/MEK/ERK et PI3K/AKT. Ces cascades de phosphorylations ainsi activées induisent l'expression de gènes précoces nécessaires à l'entrée des cellules quiescentes dans le cycle cellulaire **(Figure 11)**.

Les récepteurs couplés aux protéines G sont capables de déclencher les mêmes voies de signalisation que celles activées par les RTK. Les ligands des RCPG induisent un changement de conformation tridimensionnelle leur permettant de se lier aux protéines G trimériques. Ces protéines G, placées en amont des voies de signalisation, participent à la régulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la progression des cellules en phase G1 (Roux & Blenis, 2004).

2.2.2 La voie Raf/MEK/ERK

Suite à l'activation de récepteur, Ras est activée par le facteur d'échange GDT/GTP, SOS (*Son of Sevenless*). La première MAP-kinase kinase kinase, Raf, est activée au niveau de la membrane plasmique à la suite de sa liaison avec Ras active, liée au GTP (Rubinfeld & Seger, 2005). Raf activée phosphoryle ensuite spécifiquement les MAP-kinase kinase, MEK 1 et MEK 2 *(Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase)* sur leurs résidus sérine et thréonine situés dans leur domaine catalytique (Mc Cubrey *et al.,* 2007). MEKs activées phosphorylent à leur tour les protéines ERK 1 et ERK 2 (*Extracellular-signal-regulated-kinase*) conduisant à leur activation. Une fois activées, ERK1/2, principalement localisées dans le cytoplasme, vont s'accumuler dans le noyau où elles vont phosphoryler et réguler de nombreuses cibles, comme les kinases p90RSK, ou encore des facteurs de transcription tels que Elk-1, CREB (*cyclic AMP response element binding protein*), Ets-2, c-Myc et c-Fos (Zhao et *al.*, 1996 ; Mc Cubrey *et al.*, 2007) **(Figure 12)**. Ces facteurs de transcription vont stimuler l'expression de gènes précoces et tardifs intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire. Les principales cibles sont les gènes de la cycline D et CDK4, nécessaires à la progression du cycle cellulaire en G1 (Mc Cubrey *et al.,* 2007) **(Figure 12)**.



<u>Figure 13.</u> Schéma simplifié de la voie de signalisation PI3K/AKT

Les kinases p90RSK, découvertes comme les premiers substrats de ERK, sont au nombre de 4 dans les cellules de mammifères, RSK1-4 (Zhao *et al.,* 1996 ; Carriere *et al.*, 2008). Elles interviennent dans divers processus biologiques tels que le cycle cellulaire, la survie cellulaire ou encore la synthèse protéique. Comme ERK, les protéines RSK sont capables d'interagir et/ou de phosphoryler les facteurs de transcription, c-Fos et CREB (Xing *et al.*,1996). Elles contrôlent la progression du cycle cellulaire en inhibant la GSK3ß et p27kip1 par phosphorylation (Sutherland *et al.*, 1993). La GSK3ß inactivée ne peut plus phosphoryler la cycline D, inhibant son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. La phosphorylation de p27kip1 empêche l'inhibition du complexe Cycline E/CDK2 (Anjum & Blenis, 2008) **(Figure 12)**.

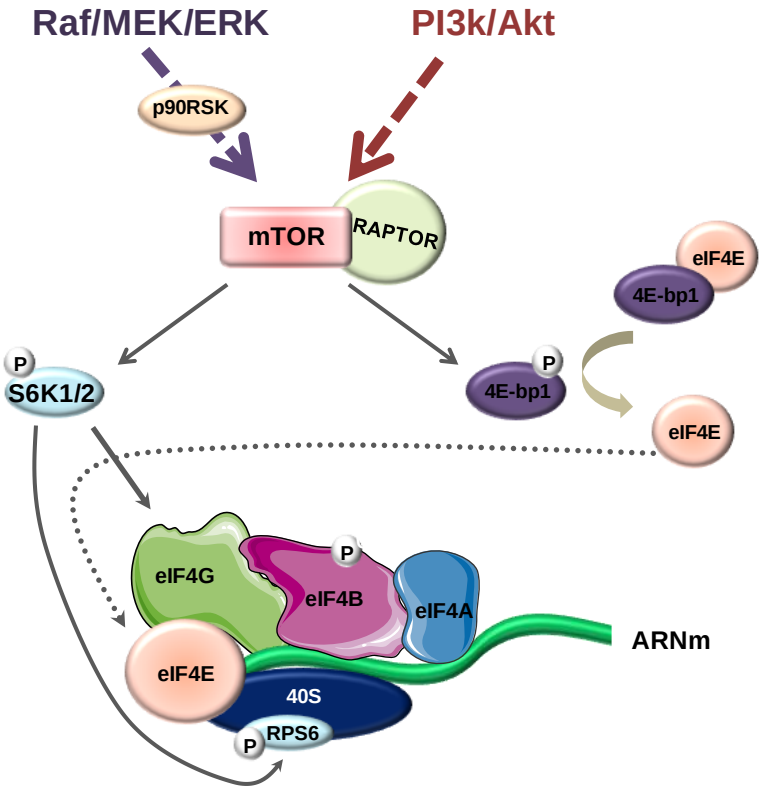
2.2.3 La voie PI3K/AKT

En coopération avec l'activation de la voie MAPK, les récepteurs activés par les stimuli mitogènes vont aussi aboutir à l'activation d'une seconde voie de signalisation : la voie PI3K/AKT **(Figure 13)**.

La PI3k est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique de 110kDa et d'une sous-unité régulatrice de 85kDa, et peut être activée de différentes façons :

- En se liant directement avec le RTK activé *via* les domaines SH2 de sa sous-unité régulatrice (p85) recrutant ainsi la sous-unité catalytrice (p110) à la membrane plasmique (Carpenter & Cantley, 1996).
- Par son association avec la protéine adaptatrice IRS recrutée au niveau du récepteur activé. Une fois activée, la PI3K va convertir les PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5 biphosphate*) en PIP3 (*phosphatidylinositol 3, 4, 5 phosphate*), conduisant au recrutement de protéines kinases possédant un domaine PH (*pleckstrin homology domain*), la PDK1 (*phosphoinositol dependent kinase-1*) et AKT (Yang *et al.*, 2002). AKT est alors phosphorylée sur les résidus T308 par la PDK1 et S473 par une kinase non-identifiée (McCubrey *et al.*, 2009)
- Par son interaction avec la protéine Ras activée (Castellano & Downward, 2011) **(Figure 13)**.

En l'absence de signal, la phosphatase PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) joue le rôle inverse des PI3K, empêchant l'activation d'AKT. AKT activée régule de nombreux processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, la survie cellulaire et la croissance cellulaire en agissant sur un nombre important de cibles. La voie PI3K/AKT est intensément régulée



<u>Figure 14.</u> Activation de la synthèse protéique par la voie mTOR

par la phosphorylation mais aussi par la *O*-GlcNAcylation comme nous le verrons dans le §3.5.4 de la 2ème partie de l'introduction (Yang *et al.*, 2008) **(Figure 13)**. AKT joue un rôle important dans la prolifération puisqu'elle permet la stabilisation de la cycline D en empêchant sa dégradation. AKT phosphoryle la GSK3ß provoquant son inhibition. La GSK3ß inhibée ne peut induire la phosphorylation de la cycline D, qui constitue un signal de dégradation. La cycline D peut alors s'accumuler dans la cellule et remplir son rôle (Diehl *et al.*, 1998). AKT permet aussi indirectement l'activation du complexe cycline D/CDK4-6 en affectant négativement l'expression des CKI tels que p21CIP1 et p27Kip1 (Chang *et al.*, 2003) **(Figure 13)**.

Les voies Raf/MAPK/ERK et PI3K/AKT intègrent et relayent donc le signal perçu par les différents récepteurs conduisant notamment à la synthèse et à la stabilisation de protéines régulatrices du cycle cellulaire telles que la cycline D, aboutissant à la formation et l'activation du complexe Cycline D/CDK4-6, indispensable à la progression des cellules en phase G1.

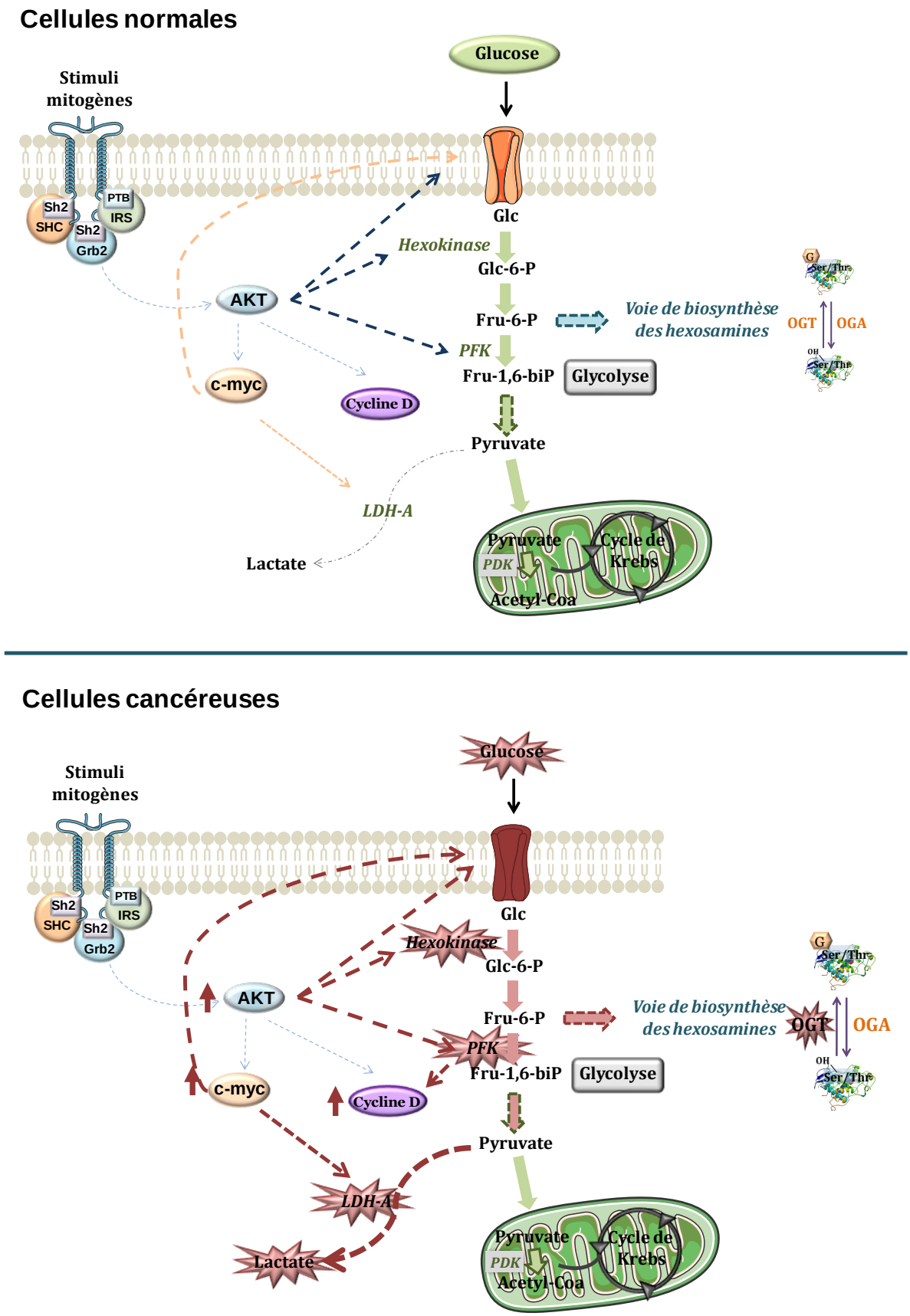
2.3 La progression en phase G1

Lors de la phase G1 qui est une phase de croissance et de préparation à la réplication de l'ADN, de nombreuses protéines intervenant dans la machinerie de la transcription et de la traduction vont être activées et/ou synthétisées.

2.3.1 La synthèse protéique

La croissance cellulaire de la progression en phase G1 traduisant une synthèse protéique accrue est assurée par la protéine mTOR (*target of rapamycin*). mTOR (aussi appelée FRAP1) est un membre de la famille PIKK (*Phosphoinositide 3-kinase-related kinase*), kinases très conservées de la levure à l'Homme (Ma & Blenis, 2009).

La protéine mTOR activée en réponse aux facteurs de croissances ou acides aminés va réguler la synthèse protéique en agissant sur 2 cibles principales, S6K1 et 4E-bp1 *via* sa protéine associée RAPTOR (*Regulatory Associated Protein of mTOR)* qui recrute les substrats de mTOR. mTOR est activée principalement par la voie PI3K/AKT *via* PDK1, mais peut aussi l'être par la voie Raf/MEK/ERK *via* les p90RSK (Anjum & Blenis, 2009) **(Figure 14)**. Le



<u>Figure 15.</u> Importance du métabolisme cellulaire lors de la progression en G1

facteur 4E-bp1 inhibe le facteur d'initiation de la traduction, eIF4E. En l'absence de stimulation, eIF4E est séquestré par 4E-bp1. Leur dissociation est favorisée suite à la phosphorylation de 4E-bp1 par mTOR. Le facteur eIF4E va alors se lier spécifiquement aux coiffes des ARNm (Schmelzle & Hall, 2000). La libération d'eIF4E, sous-unité du complexe eIF4F, permet l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction (Gingras *et al.*, 1999) **(Figure 14)**. S6K1 et S6K2, effecteurs de mTOR mais aussi de la PDK1, sont des membres de la famille p70RSK (Shahbazian *et al.*, 2006). S6K1/2 activées vont phosphoryler la protéine rp6S (*ribosomal protein S6*), un composant du ribosome 40S, et le facteur eIF4B (Magnuson *et al.*, 2012 ; Raught *et al.*, 2004). Les S6K ainsi que les p90RSK peuvent phosphoryler eIF4B. Une fois phosphorylé et activé, celui-ci stimule l'activité ARN hélicase du facteur eIF4E et permet le recrutement de la sous-unité ribosomale 40/43S (Raught *et al*, 2001 ; Shahbazian *et al.*, 2006). Ces différents facteurs recrutés au niveau de la coiffe de l'ARNm forment le complexe de pré-initiation de la traduction 48S. La sous-unité ribosomale 60S, d'autres facteurs d'initiation et d'élongation vont être ensuite recrutés afin d'assurer la traduction des protéines nécessaires à la phase G1 **(Figure 14).**

2.3.2 Le métabolisme cellulaire

La synthèse protéique accrue qui se produit lors de la phase G1 ainsi que celles des lipides, des carbohydrates et des nucléotides, requis pour la progression des cellules dans le cycle cellulaire, nécessite des apports énergétiques plus importants par rapport aux cellules quiescentes. Ces sources d'énergie provenant des nutriments extracellulaires, comme le glucose, vont être transformées par la cellule en molécules énergétiques et en précurseurs métaboliques lors des réactions du métabolisme cellulaire. Les diverses voies métaboliques sont finement ajustées, leur dérégulation est d'ailleurs associée à la cancérogenèse **(Figure 15)**.

En effet, l'une des caractéristiques biochimiques des cellules cancéreuses est l'effet Warburg (encore appelé glycolyse aérobie) qui se traduit par une consommation excessive de glucose dans les cellules cancéreuses comparées aux cellules normales, entraînant une surproduction des intermédiaires métaboliques et du lactate **(Figure 15)**. Il est donc indispensable que le métabolisme du glucose soit finement ajusté dans les cellules en prolifération. La voie PI3K/AKT et le facteur de transcription c-Myc sont 2 intermédiaires importants entre le métabolisme du glucose et la prolifération cellulaire.

Comme nous l'a vu dans le paragraphe précédent, la stimulation d'AKT entraîne une stabilisation de la cycline D. AKT est aussi capable de réguler différents composants de la voie de la glycolyse. Il augmente notamment l'expression des transporteurs du glucose à la surface de la cellule (Edinger & Thompson, 2002) et régule positivement des enzymes de la glycolyse comme l'hexokinase et la phosphofructokinase (PFK) (Gottlob *et al.*, 2001 ; Plas *et al.*, 2001). L'augmentation de la PFK provoque une surproduction du fructose-1,6-biphosphate, reflétant directement une activité métabolique élevée (Kandel & Hay, 1999). Il a aussi été montré que la surexpression de PFK entraînait une augmentation de la Cycline D (Yalcin *et al.*, 2009) **(Figure 15)**. AKT relie donc directement le métabolisme glucidique à la prolifération cellulaire.

Il en est de même pour le proto-oncogène c-Myc. c-Myc, absent dans les cellules quiescentes, est rapidement induit suite à la stimulation de facteurs mitogènes et est essentielle à la régulation du cycle cellulaire. Sa surexpression perturbe la progression des cellules dans le cycle mais entraîne aussi des altérations dans le métabolisme du glucose. En effet, c-Myc contrôle directement la prolifération cellulaire en activant la transcription de gènes importants pour la progression des cellules dans le cycle cellulaire tels que la Cycline D **(Figure 13)** mais aussi celle de gènes impliqués dans la glycolyse comme les transporteurs de glucose (GLUT1 et 4), la lactate deshydrogénase (LDH-A), enzyme responsable de la conversion du pyruvate en lactate (Gordan *et al.*, 2007 ; Osthus *et al.*, 2000) **(Figure 15)**.
Ces données reliant le métabolisme du glucose et la prolifération cellulaire ne sont pas exhaustives mais permettent de mettre en évidence le lien étroit entre ces 2 processus cellulaires dont une régulation mutuelle est indispensable au contrôle de la physiologie cellulaire.

Une autre voie métabolique alimentée par le glucose est la voie de biosynthèse des hexosamines. 2 à 5% du glucose entrant dans la cellule sont en effet orientés vers cette voie produisant *in fine* le nucléotide-sucre UDP-GlcNAc **(Figure 15)**. L'UDP-GlcNAc est le donneur de GlcNAc utilisé par différentes glycosyltransférases dont la *O*-GlcNAc transférase ou OGT qui est l'enzyme responsable de la *O*-GlcNAcylation des protéines. Comme nous le verrons dans la suite de l'introduction, la *O*-GlcNAcylation permet aussi de relier le métabolisme du glucose à la régulation des protéines clés du cycle cellulaire, dont AKT et c-Myc, et il est connu depuis peu qu'une dérégulation de la *O*-GlcNAcylation dans les cellules cancéreuses participerait au développement du cancer.

2.3.4 Le point de restriction

Au cours de la phase G1, le point de restriction est un point de contrôle permettant de distinguer deux sous-populations de cellules. Avant le passage du point de restriction, la progression des cellules en phase G1 peut encore être interrompue dans des conditions limitantes de croissance. Les cellules ne peuvent franchir ce point de restriction que lorsqu'elles ont synthétisé une quantité suffisante et nécessaire de protéines indispensables à la progression des cellules en phase G1. Une fois passé, il constitue un point de non-retour à partir duquel les cellules sont engagées irréversiblement dans le cycle cellulaire, indépendamment de la présence de facteurs mitogènes. Le cycle cellulaire ne pourra alors être arrêté uniquement lors de problèmes majeurs tels que des dommages à l'ADN (Cooper S, 2006). Le point R est gouverné par le complexe pRb/E2F et est strictement dépendant du niveau de phosphorylation de pRb (Pardee *et al.*, 2004 ; Zetterberg *et al.*, 1995).

2.3.5 La voie pRb/E2F

La protéine du rétinoblastome pRb, est le produit d'un gène suppresseur de tumeur, mutée dans de nombreux cancers (Classon & Harlow, 2002). pRb appartient à la famille Rb qui comprend 2 autres membres, les protéines p107 et p130. Ces trois protéines possèdent un domaine conservé appelé le domaine 'pocket'. Pour cette raison pRb, p130 et p107 sont souvent appelées des *pockets proteins*. Ce domaine est suffisant pour leur interaction avec les facteurs de transcription de la famille E2F. Cette association inhibe l'activité transcriptionnelle d'E2F. Parmi les 3 membres de la famille Rb, p130 a le niveau d'expression le plus élevé dans les cellules quiescentes dans lesquelles elle se complexe avec la majorité des membres de la famille E2F, E2F1-5, réprimant ainsi l'expression de leurs gènes cibles.

Le facteur E2F est séquestré par la protéine pRb et son activité transcriptionnelle est directement contrôlée par le niveau de phosphorylation de pRb. La protéine pRb va tout d'abord être phosphorylée sur les sérines 807 et 811 par le complexe Cycline C/CDK3. Ces phosphorylations sont essentielles à la sortie de quiescence des cellules (Ren & Rollins, 2004). Suite à la stimulation des voies de signalisation mitogènes, le complexe cycline D/CDK4-6 va se former et être activé. Une fois activé, ce complexe va phosphoryler ses substrats dont les membres de la famille Rb.

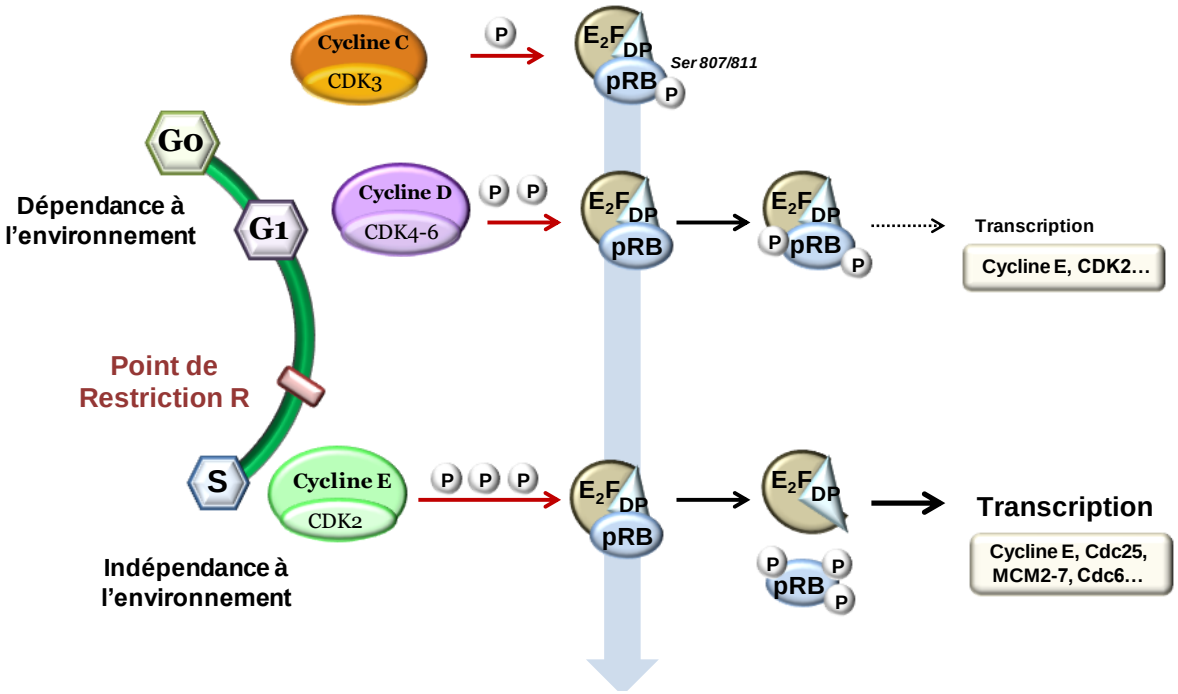


Figure 16. La sortie de quiescence et le franchissement du point de restriction dépendent du complexe pRB/E2F

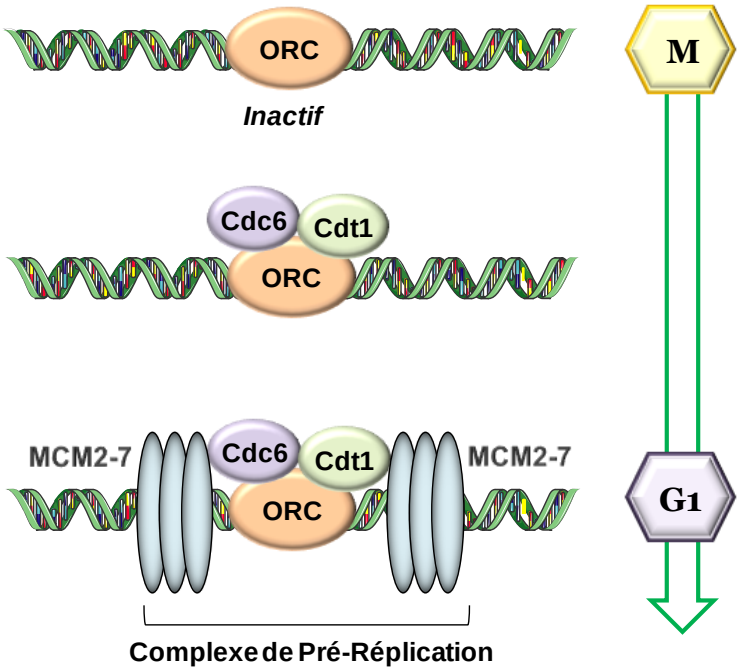


Figure 17. Mise en place du complexe de pré-réplication

(D'après Aladjem MI, 2007)

En fin de G1, la protéine pRb sera phosphorylée sur de nombreux résidus par ce complexe, permettant la libération partielle d'E2F (Schafer *et al.*, 1998). E2F va pouvoir commencer à jouer son rôle de facteur de transcription en régulant l'expression de ses protéines cibles telles que la Cycline E, impliquée dans la progression de la G1 tardive lors de la transition G1/S. Le complexe Cycline E/CDK2 va alors pouvoir se former et être activé. Il va à son tour phosphoryler le complexe pRb/E2F, entraînant ainsi l'hyperphosphorylation de pRb et la libération complète d'E2F et son cofacteur DP. Il est en effet impératif que les facteurs de transcription E2F soient hétérodimérisés avec un des trois cofacteurs DP, capables de se lier à l'ADN (Henley & Dick, 2012 ; Cobrinik D, 2005). Ainsi libéré, E2F va pouvoir induire l'expression de nombreux gènes cibles impliqués aussi bien dans la régulation du cycle cellulaire (Cycline E et cdc25) que dans la réplication de l'ADN (MCM2-7 et cdc6) (Braken *et al.*, 2004 ; Muller & Helin, 2000) **(Figure 16)**.

Une fois que les cellules ont franchi le point de restriction gouverné par le complexe pRB/E2F, elles progressent dans le cycle cellulaire indépendamment de la présence de stimuli mitogènes dans l'environnement extracellulaire.

2.4 La transition G1/S

2.4.1 L'initiation de la réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN est un processus complexe qui nécessite, dans un premier temps, l'assemblage ordonné et précis de plusieurs protéines aux origines de réplication. L'assemblage des protéines ORC (*origin recognition complex*), cdc6 (*cell division cycle homolog 6*), Cdt1 (*cdc10-dependent transcrit*) et MCMs forme le complexe de pré-réplication, initié à la transition M/G1 (Bell & Dutta, 2002) **(Figure 17)**. Ce processus assure l'initiation de la réplication de l'ADN qui ne doit avoir lieu que lors de la phase S et une seule fois par cycle cellulaire. La réplication de l'ADN dans les cellules eucaryotes débute à plusieurs origines de réplications (10^3-10^5) réparties dans tout le génome (Blow & Dutta, 2005). Cette partie détaille plus particulièrement les données concernant les protéines MCMs et seront remises en rapport avec les résultats obtenus lors de mes travaux de thèse dans la discussion générale.

2.4.2 Mise en place du complexe de pré-réplication

Les origines de réplications sont reconnues par un complexe multiprotéique, l'ORC qui est constitué de 6 sous-unités, Orc1-6. ORC joue un rôle pivot dans l'initiation de la réplication de l'ADN car il va servir de plateforme au recrutement des différents membres du complexe de pré-réplication (Bell SP, 2002). En G1, ORC recrute la protéine Cdc6 qui interagit plus particulièrement avec la sous-unité Orc1. Le recrutement de Cdc6 augmente la spécificité d'interaction entre ORC et l'origine de réplication (Speck & Stillman, 2007). Cdc6 comme les sous-unités Orc1, 2 et 5 appartient à la famille des ATPases AAA+. Son activité ATPase va servir au recrutement suivant, celui du facteur de transcription Cdt1 (Semple *et al.*, 2006). Cdt1 est nécessaire à la formation du complexe de pré-réplication (Maiorano *et al.*, 2000) et va coopérer avec ORC et Cdc6 pour faciliter le chargement du complexe MCM hélicase (*MiniChromosome Maintenance*) aux origines de réplication. L'hydrolyse de l'ATP par ORC et Cdc6 va être nécessaire au recrutement de ce complexe formé de 6 protéines, MCM2 à 7 (Randell *et al.*, 2006).

Les protéines MCMs possèdent aussi une activité ATPase indispensable à leur activité hélicase pour l'initiation et l'élongation de la réplication de l'ADN (Mendez & Stillman, 2003). L'activité hélicase du complexe MCM serait portée par l'hétérotrimère MCM 4, 6 et 7 (Ishimi *et al.*, 1997), alors que le sous-complexe MCM 2, 3, 5 formerait la sous-unité régulatrice (Forsburg SL, 2004). Néanmoins, la présence des 6 sous-unités aux origines de réplication est essentielle à l'initiation de la réplication (Schwacha & Bell, 2001). Deux complexes MCM2-7 sont recrutés au niveau d'une même origine de réplication mais dans une orientation antiparallèle, expliquant en partie la progression bidirectionnelle des fourches de réplication (Evrin *et al.*, 2009).

L'association du complexe MCM2-7 a lieu en début de G1 où l'activité des CDK est encore faible car elle inhibe la formation du complexe de pré-réplication (Noton & Diffley, 2000). La liaison du complexe MCM2-7 à la chromatine marque l'étape finale de la formation du complexe de pré-réplication **(Figure 17)**.

2.4.3 Le rôle de la phosphorylation sur les protéines MCMs

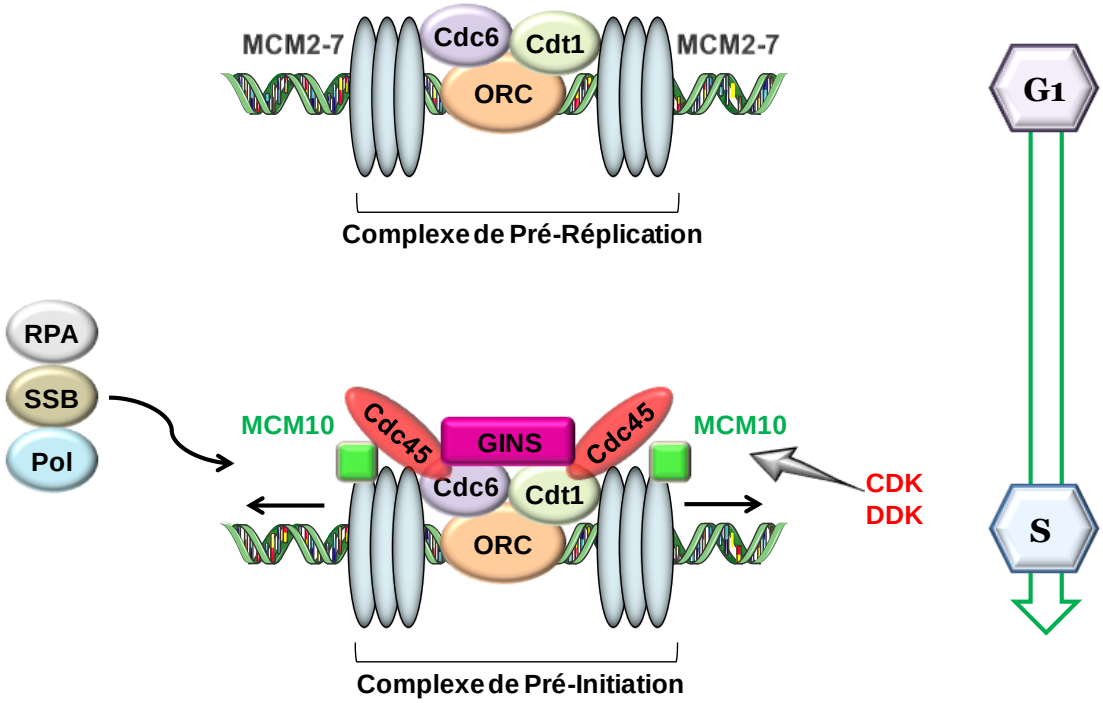
La phosphorylation joue un rôle important dans l'interaction entre les différentes protéines MCMs, dans leur liaison à l'ADN ou encore sur l'activité du complexe MCM lui-même.

Par exemple, plusieurs sites de phosphorylation ont été localisés dans la partie N-terminale de la MCM2, ciblés par différentes kinases telles que cdc7, CDK1 et CDK2 (Montagnoli *et al.*, 2005). La sérine 5 (et très certainement sur les sérine 4 et 7) de la MCM2 est phosphorylée par le complexe cdc7/Dbf4, favorisant sa liaison à la chromatine (Chuang *et al.*, 2009). La MCM3 est, quant à elle, phosphorylée sur la thréonine 722 par le complexe Cycline E/CDK2, ce qui provoque une diminution de son affinité pour l'ADN (Li *et al.*, 2011), alors que la phosphorylation de la sérine 112 par le complexe Cycline B/CDK1 est essentielle pour son association avec les autres MCMs (Lin *et al.*, 2008).

La protéine MCM4 est aussi la cible des complexes Cycline E/CDK2 et Cycline B/CDK1. Dans l'ovocyte de Xénope, la phosphorylation de MCM4 en phase M par la CDK1 inhibe l'association du complexe MCM à la chromatine (Sato *et al.*, 2000). Cela a été également montré lorsque MCM4 est phosphorylée par CDK2 (Findeisen *et al.*, 1999). *In vitro*, la phosphorylation de MCM4 par le complexe Cycline E/CDK2 inhibe aussi l'activité hélicase du complexe MCM 4/6/7 (Ishimi *et al.*, 2000). Six sites de phosphorylation sur des résidus sérine et thréonine ont été identifiés dans la partie N-terminale de MCM4. La mutation de ces différents sites de phosphorylation lève la perte d'activité hélicase du complexe, suggérant que la phosphorylation de tous ces sites est impliquée dans l'inactivation du complexe MCM 4/6/7 (Ishimi & Komamura-Kohno, 2001).

Contrairement à la phosphorylation des MCM 2, 3 et 4 dont on connaît de mieux en mieux le rôle fonctionnel sur l'activité du complexe MCM2-7, très peu de données sont disponibles pour les MCM 5, 6 et 7, en particulier pour la MCM5. Des études globales du phosphoprotéome ont identifiés de nombreux sites de phosphorylation sur la protéine MCM6 (Ser 13, 271, 413 ; Tyr 276 ; Ser 413, 568, 689, 699, 700, 704, 758, 762 ; Thr 791) mais leur rôle fonctionnel n'est pas encore connu (Beausoleil *et al.*, 2006 ; Dephoure *et al.*, 2007 ; Villen *et al.*, 2007 ; Choudhary *et al.*, 2009 ; Huttlin *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 2011 ; Hsu *et al.*, 2011). De même, 4 sites de phosphorylation ont été mis en évidence sur MCM7 (Ser 314, 321, 500 et 674) (Choudhary *et al.*, 2009).

Ces différentes données montrent donc que les phosphorylations des MCMs sont impliquées au niveau de plusieurs propriétés fonctionnelles de ces protéines et que leur étude permet une meilleure compréhension de la régulation individuelle des protéines MCMs, mais aussi de l'ensemble du complexe.



<u>Figure 18.</u> Mise en place du complexe de pré-initiation

(Adapté de Aladjem MI, 2007 et d'Heller et al., 2011)

2.4.4 Formation du complexe d'initiation

Lorsque le complexe de pré-réplication est formé, les MCMs sont encore sous forme inactive. Leur activation en phase S est associée au recrutement de plusieurs protéines telles que MCM10, cdc45 et GINS (*Go-Ichi-Ni-San signifie 5-1-2-3*) et elle nécessite l'activité des DDK (*Dbf4-dependent kinase*) et des CDKs (Ilves *et al.*, 2010) **(Figure 18)**.

Cdc45 est une protéine essentielle pour l'établissement et la progression de la fourche de réplication. Ce cofacteur d'hélicase permet le recrutement de protéines indispensables dans la réplication de l'ADN telles que la protéine RPA, les protéines SSB et les ADN polymérases (Aparicio *et al.*, 1999).Dès que le complexe pré-RC est formé, Cdc45 est recrutée à la chromatine par Cdt1, nécessitant l'activité du complexe Cycline E/CDK2 et du complexe Cdc7/Dbf4 (Ballabeni *et al.*, 2009 ; Takiwasa *et al.*, 2000 ; Zou & Stillman, 2000 ; Bell & Dutta, 2002). La MCM10, non homologue aux MCM2-7, est aussi nécessaire pour le chargement de cdc45 et la stabilisation du réplisome, complexe enzymatique nécessaire à la réplication de l'ADN (Izumi *et al.*, 2000). En plus de cdc45, le complexe GINS composé de 4 sous-unités, psf1, 2, 3 et sld5, participe à l'activation des MCMs et au chargement du réplisome. GINS est également important pour le recrutement des polymérases et va bouger avec la fourche de réplication (Gambus *et al.*, 2006,).

Les MCMs associées à Cdc45 et au tétramère GINS forment le complexe CMG (Moyer *et al.*, 2006). Les nombreux facteurs s'associant aux MCMs ainsi que l'activité des CDKs et DDKs permettent de convertir le complexe de pré-réplication en complexe de pré-initiation **(Figure 17)**. Les polymérases et leurs protéines accessoires sont alors recrutées et le démarrage de la réplication de l'ADN peut avoir lieu. L'ADN de la cellule est répliqué lors de la phase S et à la moindre anomalie, le checkpoint de la phase S se mettra en place.

A la fin de la phase S, la cellule qui était au départ diploïde (2n) sera tétraploïde (4n) et le restera jusqu'à la mitose afin de donner naissance à 2 cellules filles diploïdes identiques.

Comme nous venons de le voir, les évènements moléculaires contrôlant la progression du cycle cellulaire sont directement dépendants des modifications post-traductionnelles (MPTs), les plus courantes étant la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation, la sumoylation, l'ubiquitinylation ainsi que la glycosylation. La glycosylation, définie par la liaison covalente d'un glycane sur une protéine, est l'une des MPT les plus abondantes. En effet, 1 à 3% du génome des mammifères code pour des protéines intervenant dans le processus de glycosylation (Hanover *et al.*, 2012). Au cours de ce chapitre je détaillerai la *O*-GlcNAcylation des protéines, forme majeure de glycosylation intracellulaire, qui a fait l'objet de mes travaux de thèse.

III. La *O*-GlcNAcylation

3.1 Description générale

Décrite pour la 1ère fois par G.W Hart et Torres en 1984 (Torres & Hart, 1984), *la β-linked O-N-acetylglucosaminylation* ou *O*-GlcNAcylation consiste en l'attachement d'un unique monosaccharide, la N-acétylglucosamine (GlcNAc), au niveau du groupement hydroxyle de résidus sérines et thréonines des protéines cibles (pour revue Zachara & Hart, 2006). C'est une modification post-traductionnelle réversible et dynamique, qui affecte les protéines cytosoliques, nucléaires et mitochondriales.

La *O*-GlcNAcylation est une MPT très conservée, elle a été retrouvée chez les virus ainsi que chez tous les eucaryotes étudiés jusqu'à ce jour : chez le protozoaire filamenteux, *Gardia lamblia* (Banerjee *et al.*, 2009), les bactéries (*L.monocytogenes*) (Schirm *et al.*, 2004), l'apicomplexe *Toxoplasma gondii* (Perez-cervera Y *et al.*, 2011), les champignons filamenteux (Woosley *et al.*, 2006), le nématode *C.elegans* (Lubas *et al.*, 1997), les insectes comme la *Drosophila melangaster* (Kelly & Hart, 1989), les plantes supérieures, exemple *Arabidopsis thaliana* (Olszewski *et al.*, 2010) et *Nicotiana tabacum* (Schouppe *et al.*, 2011) et chez l'Homme.

Les protéines *O*-GlcNAcylées sont très abondantes dans le noyau plus particulièrement au niveau de la chromatine et des pores nucléaires, les nucléoporines étant les premières protéines identifiées comme cibles de la *O*-GlcNAcylation (Holt *et al.*, 1987 ; Hanover *et al.*, 1987). Depuis, plus de 800 protéines *O*-GlcNAcylées, intervenant dans divers processus cellulaires, ont été décrites tels que des récepteurs (ERβ), des phosphatases/kinases

(Akt, GSK3), des facteurs de transcription (SP1, c-Myc, c-fos, c-jun), des composants du cytosquelette (CK8/18, vimentine, vinculine, Tau), des protéines des pores nucléaires (NUP180, 153), des protéines impliquées dans la traduction (ARN polymérase II) ou encore dans le métabolisme cellulaire (GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) (Wang *et al.*, 2011) (Pour revue Love & Hanover, 2005).

Aucune séquence consensus stricte n'a été identifiée pour la *O*-GlcNAcylation. Néanmoins, elle a lieu préférentiellement dans des séquences peptidiques riches en sérine et thréonine avec une proline en position -2 et -3 (Trinidad *et al.*, 2012), et sur des motifs de type P/V-P/V-V-gS/T-S/T (Wang *et al.*, 2010) ou encore P-X-gT-X-A et P-V-gS (Alfaro *et al.*, 2012). Une database (*dbOGAP*) répertoriant les protéines *O*-GlcNAcylées ainsi que les sites pouvant être la cible de la *O*-GlcNAcylation est disponible depuis 2002 (Wang J *et al.*, 2011). Environ 800 protéines et 400 sites y sont référencés.

Cependant, ce nombre augmente de façon exponentielle grâce à l'amélioration des techniques de détection de la *O*-GlcNAcylation. La *O*-GlcNAcylation des protéines est classiquement détectée par l'utilisation d'anticorps spécifiques (RL2 et CTD110.6) ou encore par la lectine WGA (*Wheat Germ agglutinin*). D'autres techniques d'enrichissement et de détection des protéines O-GlcNAc ont été développées, notamment des méthodes basées sur la réaction de *click-chemistry* qui permet de former un cycle triazole stable par cyclo-addition entre les groupes azido et alkyne (pour revue Boyce & Bertozzi, 2011). Elle consiste en un marquage métabolique ou enzymatique des protéines *O*-GlcNAcylées par un analogue azido du GlcNAc (incorporation métabolique) ou du Galactose (marquage enzymatique par une Galactosyltransférase mutée) pouvant interagir avec différentes sondes alkynes utilisables ensuite pour enrichir et détecter les protéines *O*-GlcNAc ainsi taggées lors de différentes approches expérimentales (Gurcel *et al.*, 2008 ; Dehennaut et al., 2008).

L'identification des sites *O*-GlcNAc sur les protéines détectées n'est pas facile car la liaison de la GlcNAc sur la protéine est très labile et est perdue avec les méthodes traditionnelles de fragmentation des peptides en spectrométrie de masse. Actuellement, l'utilisation de méthodes plus douces de fragmentation telles que l'ETD (*electron transfert dissociation)* et l'ECD (*electron capture dissociation*) permet de préserver le résidu *O*-GlcNAc sur les peptides et de localiser ainsi les sites *O*-GlcNAcylés. Il est alors possible d'étudier plus précisément le rôle biologique de la *O*-GlcNAcylation sur la protéine.

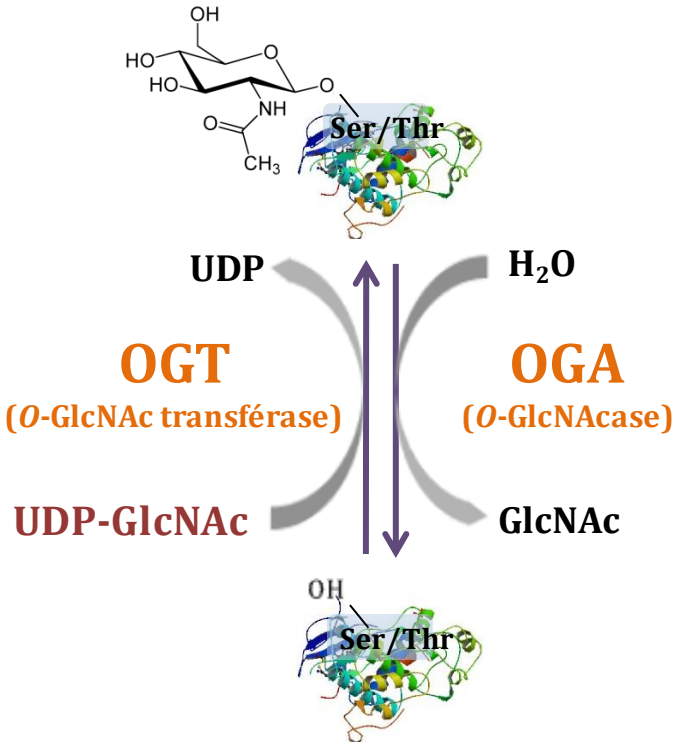


Figure 19. Régulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation par le couple OGT/OGA

3.2 Les enzymes de la *O*-GlcNAcylation

La *O*-GlcNAcylation est régulée par un couple unique d'enzymes, l'OGT (*O*-linked N-acetylglucosaminyltransferase) qui transfert le résidu de GlcNAc à partir de son substrat donneur, l'UDP-GlcNAc, sur les protéines cibles ; et son enzyme antagoniste, l'OGA (*O*-GlcNAc hydrolase) qui est capable d'hydrolyser ce résidu (Zachara & Hart, 2006) **(Figure 19)**.

3.2.1 L'UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase ou OGT

L'OGT est une enzyme très conservée au cours de l'évolution. Elle a été caractérisée chez le rat (Haltiwanger *et al.*, 1992), chez *A. thaliana* (Jacobsen *et al.*, 1996), chez la souris et l'Homme (Kreppel *et al.*, 1997), chez *C. elegans (*Lubas *et al.*, 1997) et plus récemment chez les protozoaires, *Giardia lamblia* et *Cryptosprodidium parvum* (Banerjee *et al.*, 2009). L'OGT est codée par un seul gène chez *C.elegans*, les insectes et les mammifères. Chez l'Homme, elle se localise sur le chromosome X dans la région Xq13.1 (Shafi *et al.*, 2000 ; Nölte & Muller, 2000).

L'OGT est essentielle au développement des mammifères. En effet, le *knockout* de l'OGT est létal pour les embryons de souris dès le 4ème jour du développement embryonnaire (O'Donnell *et al.,* 2004). Elle est également indispensable pour la viabilité des cellules souches embryonnaires et des fibroblastes (Shafi *et al.*, 2000). Par contre chez *C.elegans*, le *knockout* de l'OGT n'entraîne pas la mort de l'animal mais de sévères défauts dans la formation de la larve *dauer* et des altérations du métabolisme des lipides et des carbohydrates (Hanover *et al.*, 2005 ; Lee *et al.*, 2010).

Chez les mammifères, il existe 3 isoformes d'OGT qui résultent d'un épissage alternatif (Hanover *et al.*, 2003). Comme le montre la figure 20, ces 3 isoformes possèdent un domaine C-terminal identique mais différent dans leur partie N-terminale et dans leur localisation subcellulaire (Clarke *et al.*, 2008).

La première isoforme de 110kDa est l'isoforme la plus longue et la plus abondante. Cette enzyme présente de façon ubiquitaire a un niveau d'expression variable selon le type cellulaire. Elle est fortement exprimée dans les cellules pancréatiques et au niveau du cerveau (Lubas *et al.*, 1997 ; Hanover *et al.*, 1999).

Au niveau cellulaire, elle est à la fois présente dans le noyau et le cytoplasme d'où son nom la ncOGT (*nuclear and cytoplasmic OGT)*. La ncOGT est classiquement nommée OGT car c'est l'isoforme la plus étudiée. La deuxième isoforme, la sOGT (*short OGT)* est l'isoforme la plus courte (78kDa). Comme la ncOGT, elle est localisée dans le noyau et le cytoplasme des cellules. La dernière isoforme, de taille intermédiaire (103 kDa) appelée mOGT (*mitochondrial OGT*) est localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale car elle possède une séquence MTS (*mitochondria-targeting sequence)*, séquence de ciblage mitochondriale, située à l'extrémité N-terminale (Love *et al.*, 2003). Dans les cardiomyocytes, plusieurs protéines mitochondriales ont été décrites pour être *O*-GlcNAcylées, notamment des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale telle que la sous-unité I du complexe IV (COXI) (Hu *et al.,* 2009). Une étude récente révèle que la mOGT aurait des propriétés pro-apoptotiques. En effet, sa surexpression induit l'apoptose dans différentes lignées cellulaires et ceci de manière dépendante de son activité catalytique (Shin *et al.*, 2011).

Les différences de taille et de localisation entre ces isoformes leur procureraient des spécificités d'action et de substrats. Il a été montré à partir de 5 substrats différents (la caséine kinase II (CKII), la protéine tau, la kinase yes, l'α-synucléine et la β-synucléine) que ces 3 isoformes agissent différemment. La ncOGT est capable de glycosyler la CKII et la protéine Tau, la mOGT, la CKII et la protéine kinase yes alors qu'aucune de ces protéines n'est un substrat de la sOGT (Lazarus *et al.*, 2006). Il est cependant difficile de généraliser ces données car cette étude n'a été faite que sur 5 substrats, ce qui est très loin d'être représentatif des centaines de protéines *O*-GlcNAcylées identifiées.

3.2.1.1 Structure de l'OGT

L'OGT peut être structurellement divisée en 3 domaines **(Figure 20)** :

- La partie N-terminale de l'OGT comporte plusieurs motifs TPR (*tetratricopeptide repeat)* dont le nombre varie suivant l'isoforme : 11.5 motifs TPR pour la ncOGT, 9.5 motifs TPR pour la mOGT et seulement 2.5 motifs TPR pour la sOGT. Les motifs TPR (séquence de 34 acides aminés) sont des régions très conservées, retrouvées sur de nombreuses protéines car ils sont essentiels pour les interactions protéine-protéine. Des études sur la résolution de la structure de l'OGT humaine (Lazarus *et al.,* 2011) et la modélisation de l'interaction de l'OGT avec ses substrats (Trinidad *et al.,* 2012) ont révélé que le domaine TPR restreint l'accès du site actif de l'OGT aux peptides substrats et qu' un changement de conformation du

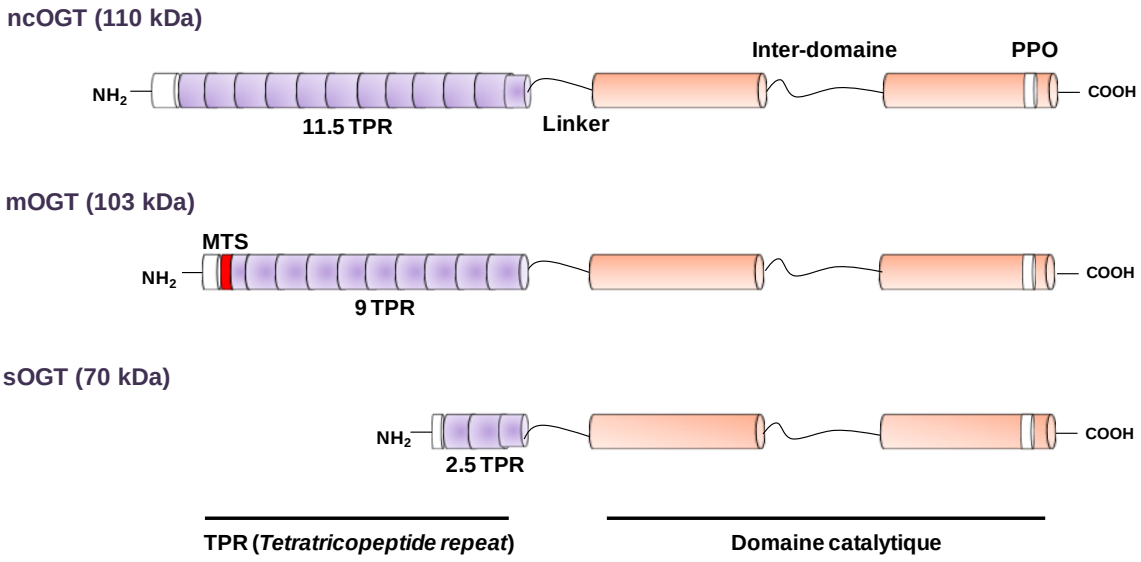


Figure 20. Structure des 3 isoformes de l'OGT

(D'après Hanover et al., 2012 et Lazarus et al., 2009)

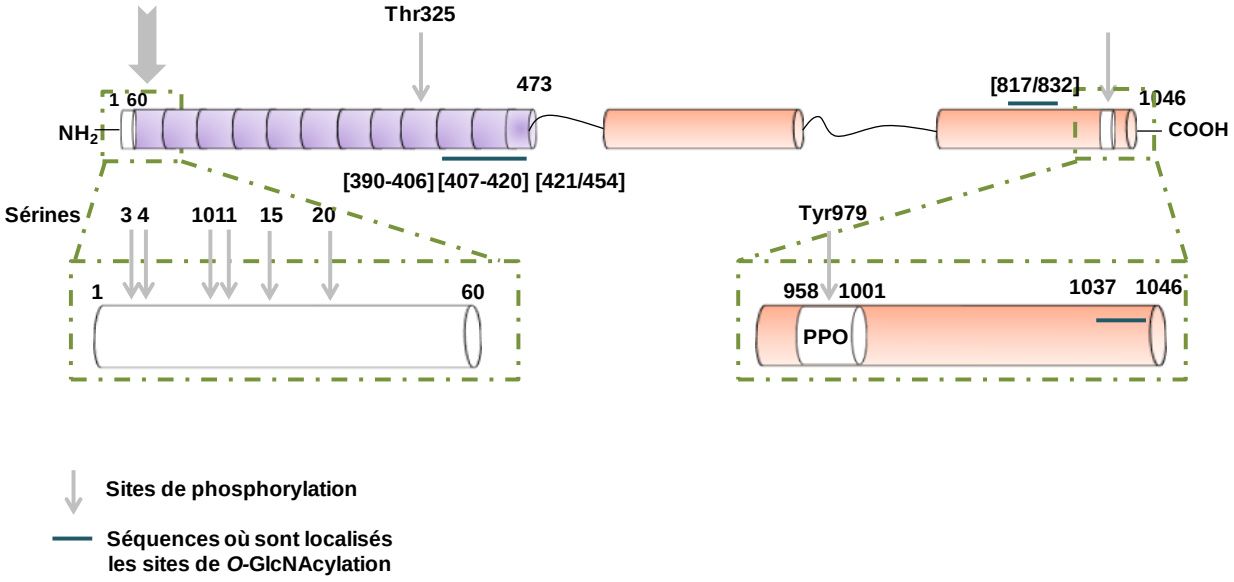
domaine TPR permet la formation du complexe OGT-substrat (Clarke *et al.*, 2008). L'absence des domaines TPR n'affecte pas l'activité de l'enzyme mais leur présence serait nécessaire pour une reconnaissance spécifique des substrats. Par exemple, dans les cellules neuronales, l'association de l'OGT avec la kinase p38MAPK *via* les domaines TPR oriente son activité sur les neurofilaments H (Cheung *et al.*, 2008). Des études plus approfondies restent cependant nécessaires pour éclaircir ce point.

- Les parties N- et C-terminales de l'OGT sont séparées par un *linker*. Cette séquence est la moins conservée dans la structure de l'OGT. Elle est retrouvée chez les insectes et l'Homme mais pas chez les bactéries ni les plantes.
- La partie C-terminale est identique pour toutes les isoformes d'OGT. Ce domaine catalytique est constitué de 2 régions homologues qui sont séparées par un inter-domaine. Les acides aminés essentiels pour l'activité de l'enzyme comme l'histidine 498 sont proches du site de liaison de l'UDP-GlcNAc et leur mutation modifie la cinétique de l'enzyme pour son substrat (Lubas *et al.*, 1997 ; Lazarus *et al.*, 2005). La région C-terminale de l'OGT est aussi dotée d'un domaine PPO (*PIP-binding domain activity of OGT*) situé entre les résidus 958 et 1001 grâce auquel elle peut interagir avec le PIP3 (phosphatidylinositol 3, 4, 5, triphosphate) et s'associer à la membrane plasmique (Yang *et al.*, 2008).

3.2.1.2 Les inhibiteurs de l'OGT

Historiquement, le premier inhibiteur de l'OGT est un analogue de l'uracile, l'alloxane. L'alloxane est capable d'inhiber l'activité de l'OGT mesurée par incorporation de radioactivité (UDP-[3H]-GlcNAc), et entraîne une diminution des protéines *O*-GlcNAcylées détectées par Western-blot (Konrad *et al.*, 2002). Cependant cette molécule a montré de nombreux effets toxiques car elle mène à la production d'espèces réactives de l'oxygène, et peut donc avoir des effets cellulaires indépendants de l'OGT (Marin *et al.*, 2011 ; Lenzen *et al.*, 2008).

En 2005, des inhibiteurs de l'OGT ont été identifiés par criblage à haut débit (méthode HTS pour *high-throughput screening*) (Gross *et al.*, 2005). Deux d'entres eux ont été utilisés dans les ovocytes de Xénope et une lignée cellulaire humaine (Dehennaut *et al.*, 2007 ; Caldwell *et al.*, 2010).



<u>Figure 21.</u> Localisation des sites de phosphorylation et de *O*-GlcNAcylation de la ncOGT

3.2.1.3 Modifications post-traductionnelles de l'OGT

L'OGT est la cible de deux modifications post-traductionnelles : la phosphorylation et la *O*-GlcNAcylation. A ce jour, l'influence de ces MPTs sur ses propriétés fonctionnelles est loin d'être élucidée.

Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés dans le domaine TPR de l'OGT en N-terminale : les sérines 3, 4, 10, 11, 15, 20 et la thréonine 325 (Dephoure *et al.*, 2008 ; Olsen *et al.*, 2010) et un site en C-terminale, la tyrosine 989 (Kreppel *et al.*, 1997). La sérine 20 est localisée dans un motif consensus des kinases CAMKII et PKA, alors que la thréonine 325 peut être potentiellement la cible des kinases FHA1, Rad23p et NEK6 (Olsen *et al.*, 2010). Il a été reporté que l'OGT peut être phosphorylée par la CAMK IV mais les résidus cibles ne sont pas connus (Song *et al.*, 2008). De plus, il a également été montré que suite à la stimulation des adipocytes 3T3-L1 par l'insuline, l'OGT est tyrosine phosphorylée par le récepteur à l'insuline, ce qui entraîne une augmentation de son activité de glycosyltransférase (Yang *et al.*, 2008 ; Whelan *et al.*, 2008) **(Figure 21)**.

L'OGT est capable de s'autoglycosyler dans le 9ème domaine TPR entre les résidus 390 et 406 et dans le 2ème domaine catalytique, entre les résidus 1037 et 1046 (Tai *et al.*, 2004). Trois peptides *O*-GlcNAc supplémentaires ont été identifiés dans le cerveau de rat, correspondant sur l'OGT humaine aux séquences [407-420], [421-454] et [817-832] (Khidekel *et al.*, 2007). Il a été observé que la *O*-GlcNAcylation globale de l'OGT diminue dans les cellules HeLa synchronisées en mitose par rapport aux cellules en G1 (Sakabe & Hart, 2010). L'analyse stœchiométrique de la forme glycosylée de l'OGT dans les neurones a montré qu'elle était très majoritairement non glycosylée (3% de l'OGT) (Rexach *et al.*, 2010). Aucun rôle sur la glycosylation de l'OGT n'est connu à ce jour.

Notons que plus récemment, il a été montré que l'OGT existait sous la forme S-nitrosylée dans des macrophages de souris (Ryu & Do, 2011). La S-nitrosylation se définie par la liaison covalente d'un oxyde nitrique sur le groupement thiol d'un résidu cystéine d'une protéine (Hess *et al.*, 2005). Cette modification post-traductionnelle est capable d'influencer diverses propriétés fonctionnelles des protéines telle leur stabilité, leur localisation subcellulaire, l'interaction avec leur partenaire ou encore leur activité (Anand & Stamler, 2012).

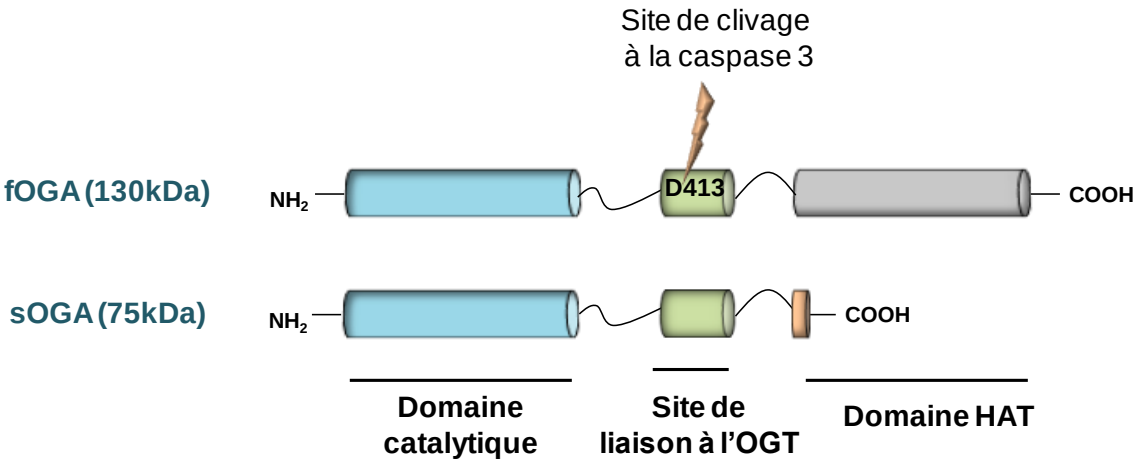
L'OGT est dénitrosylée suite à la stimulation des macrophages par le LPS *(lipopolysaccharide)*. Sous sa forme dénitrosylée, l'OGT est 4 à 6 fois plus active que la

forme nitrosylée. La S-nitrosylation de l'OGT semble donc réguler négativement son activité (Ryu & Do, 2011).

3.2.2 La N-acétyl-βD glucosaminidase ou OGA

Identifiée initialement comme l'hexosaminidase C dans des extraits cytosoliques à cause de sa structure similaire aux hexosaminidases lysosomales, l'OGA diffère de ces dernières par sa localisation et son pH optimal d'activité. Elle est en effet localisée principalement dans le cytoplasme et son activité est maximale entre les pH 5.5 et 7 contrairement aux hexosaminidases A et B qui agissent à pH plus acide (Braidman *et al.*, 1974 ; Dong *et al.*, 1994 ; Gao *et al.*, 2001). L'OGA est une enzyme soluble et très conservée au cours de l'évolution : elle est présente dans tous les métazoaires où la modification *O*-GlcNAc a été reportée (Gao *et al.*, 2001 ; Forsythe *et al*., 2006). Son expression est ubiquitaire avec une distribution tissulaire semblable à l'OGT, c'est à dire qu'elle est plus fortement exprimée dans le pancréas et le cerveau (Comtesse *et al.*, 2001 ; Gao *et al.*, 2001).
Le *Knockout* de l'OGA entraîne des défauts similaires à celui de l'OGT chez *C.elegans,* à savoir un animal viable mais avec des dérégulations dans le stockage des lipides et du glycogène (Forsythe *et al*., 2006). Il a aussi été reporté récemment que l'OGA est essentielle au développement embryonnaire car l'extinction de son gène provoque une mort néonatale des embryons de souris (Yang *et al.*, 2012).

Chez l'Homme, le gène codant pour l'OGA est nommé MGEA5 (*meningioma expressed antigen 5*) et réside sur le chromosome 10 au niveau du locus q24.1-q24.3. Deux isoformes de l'OGA résultant d'un épissage alternatif de l'ARNm et qui différent dans leur domaine C-terminal, ont été décrites (Comtesse *et al.*, 2001) : Une forme nucléocytoplasmique de 130 kDa, principalement localisée dans le cytoplasme et très majoritairement exprimée, appelée OGA ou fOGA (*full lenght OGA*) (Zachara & Hart, 2006 ; Macauley & Vocadlo, 2009) ; elle est aussi la plus étudiée comparée à la forme courte de 75 kDa, nommée sOGA (*short OGA*). Il a été reporté que l'isoforme courte de l'OGA est associée aux gouttelettes lipidiques. Les gouttelettes sont des organites intracellulaires de stockage des lipides neutres tels que les triglycérides et les esters de cholestérol (Greenberg *et al.*, 2011 ; Keembiyehetty *et al.*, 2011).
La sOGA jouerait un rôle dans l'assemblage et la stabilité de ces gouttelettes et participerait à la dégradation protéasomale des protéines situées à leur surface.



<u>Figure 22.</u> Structure des 2 isoformes de l'OGA, la fOGA et la sOGA

(*D'après Hanover et al., 2012)*

3.2.2.1 Structure de l'OGA

L'OGA (fOGA) est une protéine de 916 acides aminés contenant deux domaines distincts : Un domaine d'activité hexosaminidase en N-terminal et un domaine C-terminal homologue à celui des histones acétyltransférases, HAT (*histone acetyltransferase domain*) entre les acides aminés 583 et 916 (Schultz & Pils, 2002 ; Toleman *et al.*, 2004). La présence de ces 2 domaines lui a valu un 2ème nom, la NCOAT (*Nuclear Cytoplasmic O-GlcNAcase and Acetyltransferase*). Cependant, ce nom est très peu utilisé dans la littérature car, jusqu'à aujourd'hui, l'activité de son domaine HAT n'a été reportée qu'*in vitro* et reste controversée (Toleman *et al.*, 2004). Les résidus 404 à 548 situés entre ces 2 domaines sont nécessaires à l'interaction de l'OGA avec l'OGT *via* les 6 premiers domaines TPR (Whisenhunt *et al.*, 2006), les deux enzymes étant fréquemment retrouvées en complexe (§3.4.3).

A l'intérieur de ce domaine d'interaction, l'asparagine 413 est un site de clivage de la caspase 3, qui est active sur l'OGA *in vitro* (Wells *et al.*, 2002) et *in vivo* lors de l'apoptose (Butkinaree *et al.*, 2008). Individuellement, les 2 formes tronquées de l'OGA (1-413 et 414-916) générées suite à la coupure par la caspase-3 n'ont pas d'activité catalytique significative lorsqu'elles sont transfectées séparément dans les cellules HeLa. En revanche, lorsque le clivage de l'OGA est induit dans les cellules, l'efficacité de l'activité hydrolase est comparable à celle de l'OGA non clivée. Il a été proposé qu'après la coupure protéolytique, les 2 parties N- et C-terminales resteraient associées ou se réassocieraient (Wells *et al.*, 2002 ; Butkinaree *et al.*, 2008) **(Figure 22).** Le rôle physiologique de cette coupure sur l'OGA reste cependant à déterminer**.**

La forme courte de l'OGA, la sOGA (*short OGA*), ne contient pas le domaine HAT mais possède 15 acides aminés qui lui sont propres à l'extrémité N-terminale (Hanover *et al.*, 2010). Cette structure tronquée est suffisante pour conserver une activité d'hydrolase de l'OGA (Comtesse *et al.*, 2001), mais qui est réduite par rapport à la forme longue de l'OGA (Km ≈ $1.57.10^2$ et $3.26.10^2$ mM *versus* Km fOGA≈ 0.27 mM) (Li *et al.*, 2010) **(Figure 22)**.

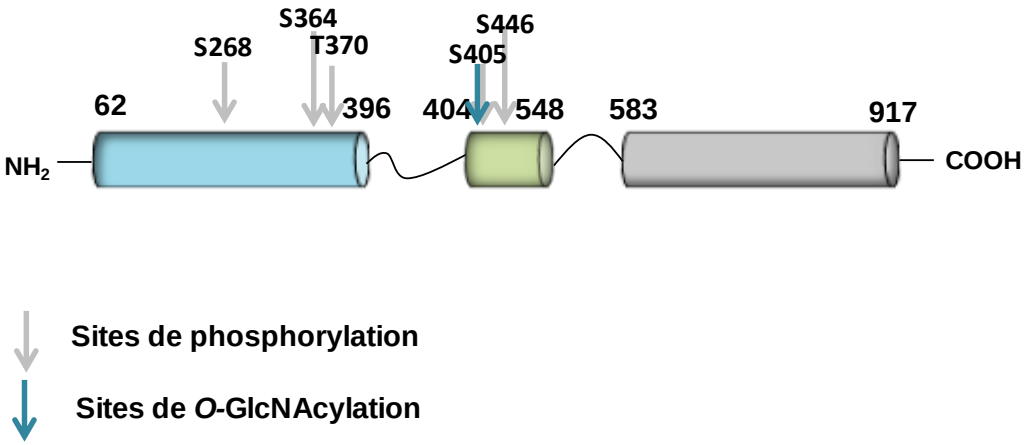


Figure 23. Localisation des sites de phosphorylation et de *O*-GlcNAcylation de l'OGA

.

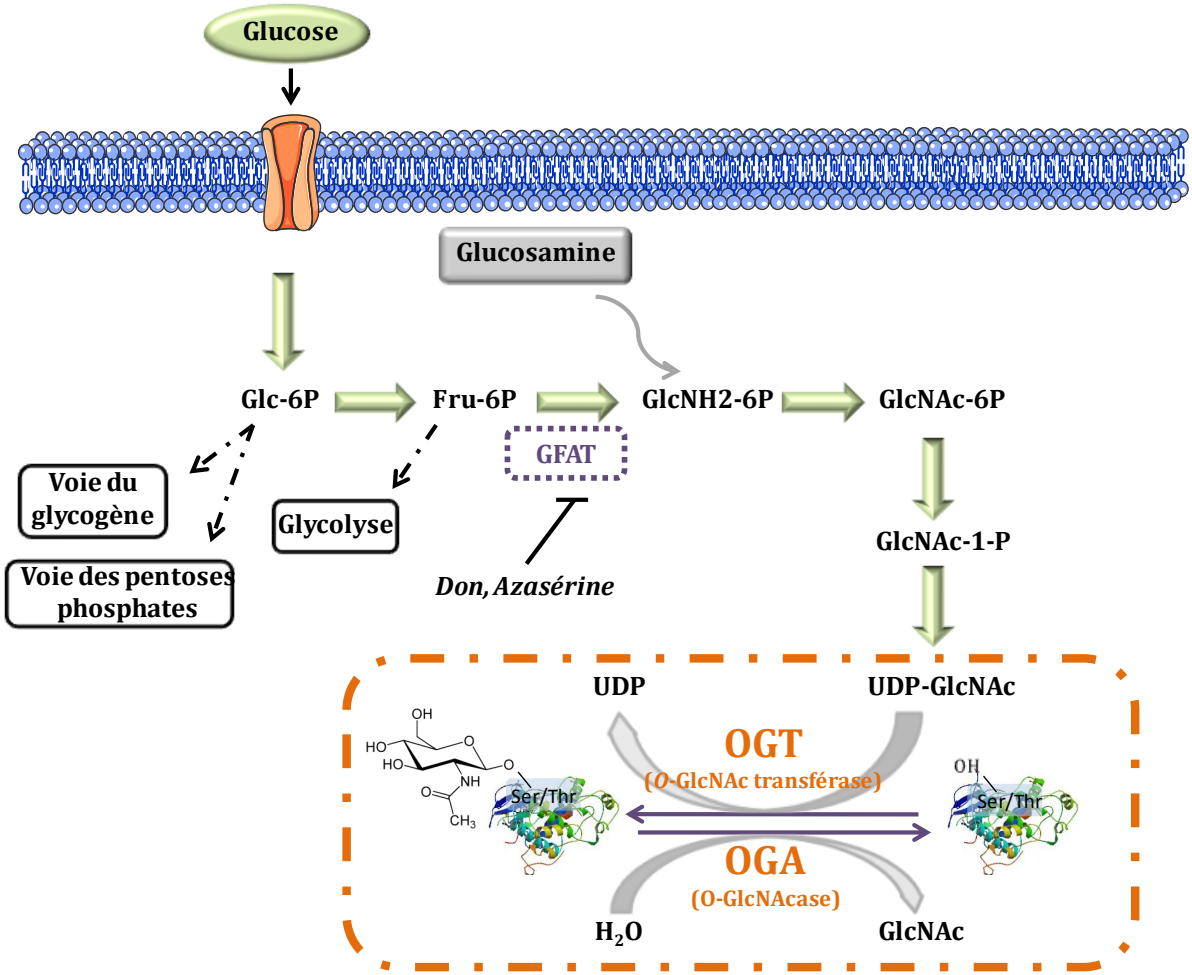
3.2.2.2 Les inhibiteurs de l'OGA

L'OGA peut être chimiquement inhibée par des analogues de GlcNAc comme la PUGNAC (Dong & Hart, 1994) et la Streptozotocine (STZ) (Toleman *et al.*, 2006). Ils se fixent dans le site catalytique de l'OGA inhibant l'hydrolyse de la GlcNAc fixée aux substrats (Hurtado-guerrero *et al.*, 2008). Cependant, la PUGNAc n'est pas un inhibiteur sélectif de l'OGA car il inhibe aussi les hexosaminidases lysosomales (Gao *et al.*, 2001 ; Mehdy *et al.*, 2012) et la streptozotocine est particulièrement toxique pour les cellules eucaryotes (Roos *et al;*, 1998 ; Pathak *et al.*, 2008). Des dérivés du PUGNAc ont ensuite été synthétisés afin d'être plus spécifiques que ce dernier comme la GlcNAcstatine (Dorfmueller *et al.*, 2006) et la GlcNAc-thiazoline (Knapp *et al.*, 2007). Actuellement, le NbutGT et le Thiamet G sont les inhibiteurs les plus spécifiques et efficaces de l'OGA, le Thiamet G étant le plus stable des deux (Macaulay *et al.*, 2005 ; Yuzwa *et al.*, 2008).

3.2.2.3 Modifications post-traductionnelles de l'OGA

Comme l'OGT, l'OGA est aussi la cible de la phosphorylation et de la *O*-GlcNAcylation. Plusieurs sites de phosphorylation ont en effet été identifiés chez l'OGA **(Figure 23)** : 1 site trouvé à partir de cerveau de rat : la sérine 405 (Khidekel *et al.*, 2007) ; 2 autres à partir de synapses de souris : la sérine 364 et la thréonine 370 (Trinidad *et al.*, 2012) ; 4 à partir de cellules humaines : la sérine 364, 859, 867 et 873 (Olsen *et al.*, 2010) et 2 sites dans des cellules souches embryonnaires humaines, les sérines 364 et 268 (Rigbolt *et al.*, 2011). La sérine 364 est localisée dans un motif consensus de la caséine kinase II (Rigbolt *et al.*, 2011). Les sites de phosphorylation identifiés chez le rat et la souris sont conservés chez l'homme. Cependant, le rôle de la phosphorylation sur les propriétés fonctionnelles de l'OGA reste à déterminer.

L'OGA est également *O*-GlcNAcylée sur la sérine 405 (Khidekel *et al.*, 2007) **(Figure 23)**. Comme pour l'OGT, l'analyse stœchiométrique de la forme glycosylée de l'OGA dans les neurones a montré que sa forme non glycosylée était majoritaire (10% de l'OGA monoglycosylées) (Rexach *et al.*, 2010). Le rôle de sa glycosylation doit être entièrement élucidé.



<u>Figure 24.</u> Voie de biosynthèse de l'UDP-GlcNAc dépendante des flux entrants de glucose et glucosamine dans la cellule

3.3 La voie de biosynthèse des hexosamines

Le niveau de *O*-GlcNAcylation des protéines est directement dépendant du métabolisme du glucose *via* la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP : *Hexosamine biosynthesis pathway*) qui mène à la formation de l'UDP-GlcNAc, le substrat-donneur de l'OGT (Dorfmueller *et al.*, 2011) **(Figure 24)**. Les variations d'UDP-GlcNAc reflètent le flux de nutriments entrant dans la cellule (glucose et glucosamine) (Obici & Rosetti, 2003).

Lorsque le glucose entre dans la cellule, il est phosphorylé en glucose-6-phosphate par l'hexokinase puis isomérisé en fructose-6-phosphate par la phosphoglucose isomérase. La majorité du fructose-6-phosphate sera orienté vers la glycolyse pour fournir des molécules énergétiques à la cellule. Le reste, soit 2-5% du glucose intracellulaire, sera métabolisé par la voie HBP afin de synthétiser l'UDP-GlcNAc, donneur de GlcNAc pour toutes les glycosyltransférases, dont l'OGT. La voie HBP commence par la formation de la glucosamine-6-phosphate ($GlcNH_2$-6-P) à partir du fructose-6-phosphate par l'action irréversible de la GFAT (Glutamine :fructose-6-phosphate amidotransferase). La $GlcNH_2$-6-P est acétylée par la Glucosamine-6-Phosphate acétyltransférase pour donner la GlcNAc-6-P, convertie ensuite en N-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P) par la N-acétylglucosamine phosphomutase. La dernière étape de la voie HBP catalyse la formation de l'UDP-GlcNAc grâce à l'action de l'UDP-GlcNAc pyrophosphorylase **(Figure 24).** L'OGT est très affine pour l'UDP-GlcNAc, avec un Km faible égal à 545 nM (Haltiwanger *et al.*, 1992). Son activité est donc sensible à la quantité d'UDP-GlcNAc disponible dans les cellules (Kreppel & Hart, 1999), influençant directement le niveau intracellulaire de *O*-GlcNAcylation.

La GFAT est l'enzyme limitante de la voie HBP, elle est inhibée par le produit final, l'UDP-GlcNAc (Broschat *et al.*, 2002). Il existe des inhibiteurs bien connus de la GFAT, le DON (6-diazo-5-oxo-norleucine) et l'azasérine, qui ont pour effet indirect de diminuer le niveau de *O*-GlcNAcylation. A l'inverse, la glucosamine ($GlcNH_2$) favorise l'activité de l'OGT car elle intègre la voie HBP en contournant la GFAT et en donnant directement la $GlcNH_2$-6-P (Copeland *et al.*, 2008) **(Figure 24)**.

Le niveau de *O*-GlcNAcylation des protéines peut donc être modulé en fonction des flux de glucose et glucosamine entrant dans la cellule. L'ajout de glucosamine ou de glucose dans le milieu de culture est connu pour augmenter le niveau de la *O*-GlcNAcylation des protéines dans divers modèles cellulaires, tels que des cellules beta du pancréas de rat (Kwak *et al.,* 2010), les adipocytes 3T3-L1 (Vosseler *et al.,* 2002) et les hépatocytes HepG2 (Guinez *et al.,* 2005). Par contre, la privation complète du glucose entraîne une augmentation du niveau global de *O*-GlcNAcylation, indépendamment de la voie HBP, en réponse à la surexpression de l'OGT, comme cela a été décrit dans les cellules HepG2 (Taylor *et al.,* 2008), les cellules de neuroblastome (Cheung & Hart, 2008), ou des myocytes de rat (Zou *et al.,* 2012). L'absence de glucose dans le milieu de culture entraîne un stress oxydatif cellulaire responsable du niveau élevé de *O*-GlcNAcylation retrouvé dans ces différentes lignées cellulaires (Simons *et al.,* 2009).

La balance *O*-GlcNAc est également sensible à des stimuli mitogènes. Il a en effet été observé que l'activation de lymphocytes T ou de cellules épithéliales par des mitogènes entraîne un changement rapide de *O*-GlcNAcylation sur de nombreuses protéines (Kearse & Hart, 1991 ; Slawson *et al.*, 2005). Cela a également été observé sur les protéines nucléaires de cellules HeLa quiescentes stimulées par le sérum, à l'aide de biosenseurs *O*-GlcNAc (peptide substrat de l'OGT provenant de la caséine kinase II couplé à un groupement fluorescent) (Carillo *et al.*, 2011).

La dynamique de *O*-GlcNAcylation est donc dépendante de l'environnement extracellulaire et de ce fait, l'OGT est considérée comme un véritable senseur de l'état physiologique de la cellule. Comme nous le verrons dans les prochains paragraphes, grâce à son rôle de senseur, la balance *O*-GlcNAc module les propriétés fonctionnelles des protéines intervenant dans divers processus biologiques tels que la signalisation intracellulaire, la traduction ou encore la transcription. La *O*-GlcNAcylation ajoute aussi un niveau supplémentaire de régulation post-traductionnelle des protéines cibles puisqu'elle peut interférer avec leur phosphorylation.

3.4 *O*-GlcNAcylation et phosphorylation : un dialogue complexe

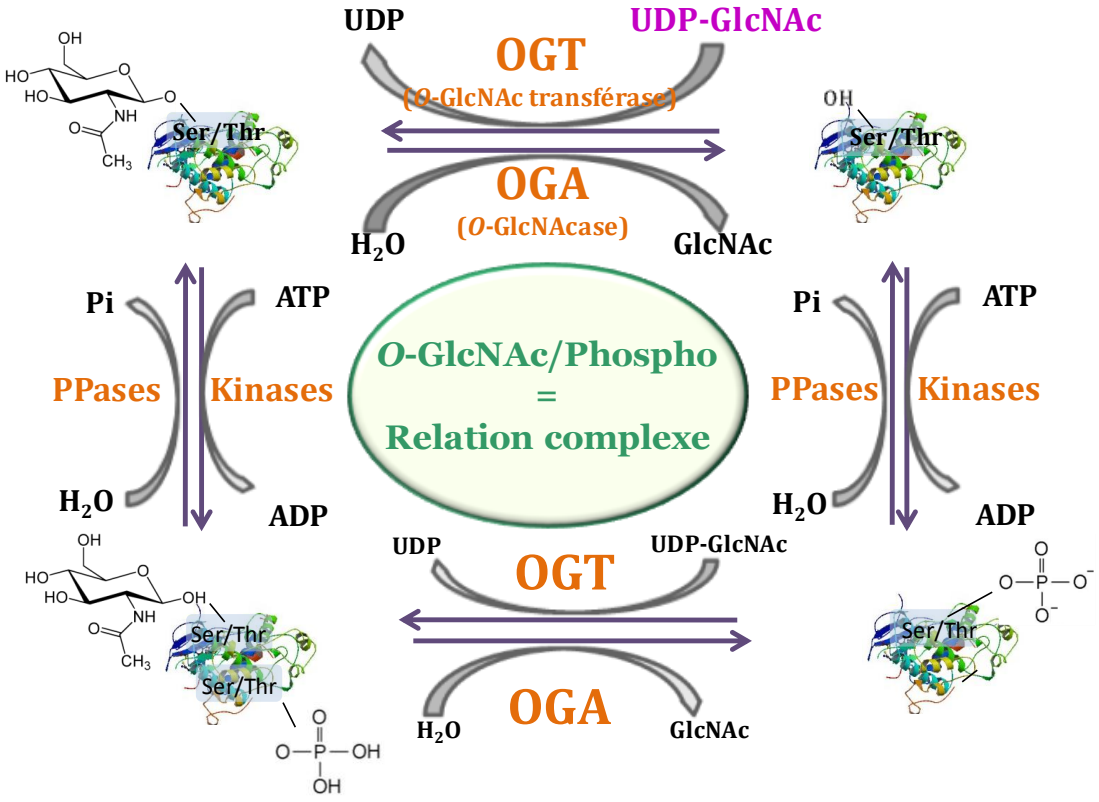
3.4.1 Vision globale du dialogue *O*-GlcNAcylation/phosphorylation

Plusieurs études décrivent des variations du niveau global *O*-GlcNAc lorsque des kinases sont surexprimées ou inhibées. Inversement, la phosphorylation est altérée lorsque la balance *O*-GlcNAc est perturbée.

Ainsi, le traitement de cellules neuronales avec l'acide okadaïque, un inhibiteur de phosphatases à large spectre, entraîne une diminution des protéines *O*-GlcNAcylées, principalement dans le noyau (Lefebvre *et al.*, 1999). De même, l'activation des kinases PKA et PKC, respectivement, par le dbcAMP (*dibutyryl-cyclic adenosine monophosphate*) et et le PMA (*phorbol* myristate acetate) diminue de plus de 60% le niveau global de *O*-GlcNAcylation dans les neurones, plus particulièrement sur les protéines structurales et associées au cytosquelette (Griffith & Schmitt, 1999). Réciproquement, l'inhibition des Ser/Thr kinases par la staurosporine augmente le niveau de *O*-GlcNAcylation sur ces mêmes protéines (Griffith & Schmitt, 1999). En revanche, une autre étude montre que l'extinction de la kinase GSK3ß par siRNA entraîne à la fois une augmentation de la *O*-GlcNAcylation de certaines protéines, dont des protéines de choc thermique comme l'HSP90 et l'HSC71, et une diminution de la *O*-GlcNAcylation sur d'autres protéines telles que le facteur de transcription HCF1 et des protéines associées aux ARN telles que HnRNP K (Wang *et al.*, 2007). Ces différents résultats montrent qu'une perturbation des cascades de phosphorylation peut se répercuter différemment sur la *O*-GlcNAcylation de certaines protéines.

Réciproquement, l'inhibition ou la surexpression de l'OGT ou l'OGA altère également la phosphorylation de protéines et de sites spécifiques. Dans les cellules NIH 3T3, l'inhibition de l'OGA par le PUGNAc ou le NAG-thiazoline induit une diminution globale de la phosphorylation des thréonines détectée par Western-Blot (Wang *et al.*, 2008). L'augmentation de la *O*-GlcNAcylation par inhibition de l'OGA peut également diminuer la phosphorylation ou à l'inactivation de certaines kinases, respectivement sur la sérine 9 de la GSK3β et la thréonine 308 d'Akt (Vosseler *et al.*, 2002).

Par ailleurs, l'effet de la surexpression de l'OGT a été évalué sur 350 sites de phosphorylation identifiés sur des protéines du fuseau mitotique de cellules HeLa.



<u>Figure 25.</u> Dialogue complexe entre la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation

De manière intéressante, la surexpression de l'OGT conduit à une forte diminution de la phosphorylation (≥ 50%) de seulement 17% des sites analysés et entraîne une augmentation conséquente de la phosphorylation (≥ 200%) de 7% des sites. L'impact de l'augmentation de la O-GlcNAcylation des protéines par surexpression de l'OGT est donc moindre pour les ¾ restants des sites de phosphorylation analysés (Wang *et al.*, 2010). La surexpression de l'OGT entraîne aussi indirectement une baisse de l'expression de la kinase Aurora B et une diminution de l'activité de CDK1 suite à une augmentation de sa phosphorylation inhibitrice (Wang *et al.*, 2010 ; Sakabe & Hart, 2010). Elle peut encore affecter la phosphorylation mitotique de la méthyltransférase CARM1 (Sakabe & Hart, 2010).

Ces études globales montrent une régulation croisée de l'activité du couple OGT/OGA et des multiples kinases et phosphatases, mais elles soulignent également la complexité de cette interconnexion qui ne s'arrête pas à une simple réciprocité comme initialement proposé.

3.4.2 Exemples du dialogue *O*-GlcNAcylation/phosphorylation

Jusqu'à aujourd'hui, toutes les protéines *O*-GlcNAcylées identifiées sont aussi des phosphoprotéines. De nombreuses protéines sont d'ailleurs réciproquement modifiées sur le même site par la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation comme, par exemple, la sérine 16 des récepteurs aux œstrogènes β (Cheng & Hart, 2001), la thréonine 58 de c-Myc (Chou *et al.*, 1995), ou la sérine 10 de la delta-lactoferrine (Hardivillé *et al.*, 2010). La réciprocité de ces deux MPTs sur un site donné est nommée 'Yin-Yang' mais la relation entre la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation ne se limite pas à cela. Elle est en réalité plus complexe car ces deux MPTs peuvent s'influencer sur des sites adjacents (p53, CKII) ou mêmes parfois éloignés (CAMK IV), en agissant de façon synergique ou antagoniste sur ces sites (Yang *et al.*, 2006 ; Wang *et al.*, 2007 ; Dias *et al.*, 2009). Une protéine peut donc être non modifiée, *O*-GlcNAcylée et/ou phosphorylée sur un ou plusieurs sites **(Figure 25)**.

La sérine/thréonine kinase CKII (*Casein kinase II*) est impliquée dans divers processus biologiques comme la croissance cellulaire, l'apoptose ou la sénescence (Montenarh M, 2010), au travers de la phosphorylation de nombreux substrats comme la β-caténine ou le suppresseur de tumeur p53 (Meggio & Pinna, 2003). Il a été reporté que la CKII est *O*-GlcNAcylée sur la sérine 347 entraînant une diminution de la phosphorylation de la thréonine 344. La phosphorylation de ce site la protège de la dégradation protéasomale. La stabilité de CKII est donc réduite lorsqu'elle est sous sa forme *O*-GlcNAc (Tarrant *et al.*, 2012).

La protéine p53, gardienne du génome, est faiblement exprimée en condition normale et est activée en réponse à divers stress cellulaires comme des dommages à l'ADN (**Figure 7**, §1.3.1). Contrairement à la CKII, la *O*-GlcNAcylation de la protéine p53 va la stabiliser. En effet, p53 peut être *O*-GlcNAcylée sur la sérine 149, bloquant la phosphorylation de la thréonine 155, indispensable à sa dégradation protéasomale (Yang *et al.*, 2006).

Un autre exemple est celui de la protéine CAMK IV qui est fortement exprimée dans le cerveau et les lymphocytes T. C'est une kinase Ca2+/calmoduline-dépendante régulant de nombreux facteurs de transcription comme CREB1 et JUN impliqués dans la réponse immunitaire (Illario *et al.*, 2008) et dans la consolidation de la mémoire (Fukushima *et al.*, 2008). L'activité de la CAMK IV est augmentée suite à la phosphorylation de la thréonine 200. Plusieurs sites de *O*-GlcNAcylation ont été identifiés: la thréonine 57 et les sérines 58, 137, 189, 344, 345 et 356 (Dias *et al.*, 2009), la mutation de certains de ces sites notamment de la thréonine 57 et de la sérine 58 altère la phosphorylation de la thréonine 200.

Ces données indiquent que la balance *O*-GlcNAcylation/phosphorylation de la CAMK IV permet de contrôler son activité (Dias *et al.*, 2009). Ces exemples appuient le fait que l'interconnexion entre la *O*-GlcNAcylation et la phosphorylation est difficilement généralisable et qu'il est à étudier au cas par cas, voire même site par site au sein d'une même protéine. Il est donc nécessaire d'identifier les sites de *O*-GlcNAcylation afin de définir précisément la relation entre ces deux MPTs sur les protéines et sites cibles. Ceci permettra de comprendre le degré de régulation supplémentaire qu'apporte cette dynamique *O*-GlcNAcylation/phosphorylation aux propriétés fonctionnelles des protéines et son impact sur les processus biologiques que ces protéines régulent.

3.4.3. Les complexes OGT/OGA/phosphatases/kinases

Différentes études ont montré que les enzymes responsables de la phosphorylation et de la *O*-GlcNAcylation peuvent coordonner rapidement leurs actions en se complexant.
Il a été montré que l'OGT forme un complexe stable et actif avec PP1 β et γ dans le cerveau de rat (Wells *et al.*, 2004). De plus, l'OGT est co-immunoprécipitée avec la kinase Aurora B dans des extraits mitotiques de cellules HeLa synchronisées au nocodazole. L'OGT et Aurora B endogènes sont également co-purifiées avec 2 autres enzymes, l'OGA et la phosphatase PP1c. Ces 4 enzymes OGT/OGA/Aurora kinase B/PP1c forment un complexe transitoire lors de la formation du fuseau mitotique et de la cytokinèse, et régule les MPTs de protéines cibles

comme la vimentine, une protéine des filaments intermédiaires. En effet, la surexpression de l'OGT et de l'OGA par adénovirus diminue la phosphorylation de la sérine 82 de la vimentine et augmente celle de la sérine 71 (Slawson *et al.*, 2008). Inversement, l'inhibition pharmacologique d'Aurora B entraîne une diminution de sa *O*-GlcNAcylation. Ces résultats suggèrent donc que le dialogue *O*-GlcNAcylation/phosphorylation intervient dans le remaniement du cytosquelette lors de la mitose. Il aussi été reporté très récemment par une analyse protéomique globale des interactions protéiques dans les cellules HeLa et HEK293 que l'OGT était potentiellement capable d'interagir avec les phosphatases PP1A et PP1B et la kinase CDK4 (Havugimana *et al.*, 2012). Cependant, les protéines substrats de ces complexes ainsi que le dialogue *O*-GlcNAcylation/phosphorylation sur ces cibles restent à définir.

L'ensemble de ces données montre que les complexes multienzymatiques phosphatase/kinase/OGT/OGA existent dans la cellule, et qu'ils permettent de réguler finement les MPTs de leurs protéines cibles.

3.5 Régulation des protéines par la *O*-GlcNAcylation

Comme nous l'avons vu au cours des précédents paragraphes, la *O*-GlcNAcylation est capable de répondre aux signaux extracellulaires et d'interagir avec la phosphorylation. Comme pour cette dernière, la *O*-GlcNAcylation peut moduler les propriétés fonctionnelles des protéines, à savoir leur stabilité, leur activité, l'interaction avec leurs partenaires, ou leur localisation subcellulaire. Je développerai dans cette partie quelques exemples illustrant l'influence de la *O*-GlcNAcylation sur leurs propriétés fonctionnelles.

3.5.1 Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la localisation subcellulaire des protéines

La *O*-GlcNAcylation est capable de moduler la localisation subcellulaire, ceci a été décrit sur diverses protéines dont c-Myc, v-jun, Sp1, NeuroD1, et HSP27 (Kamemura *et al.*, 2002 ; Schlummer S *et al.*, 2006 , Majumdar *et al.*, 2006 ; Andrali *et al.*, 2007 ; Guo *et al.*, 2012).

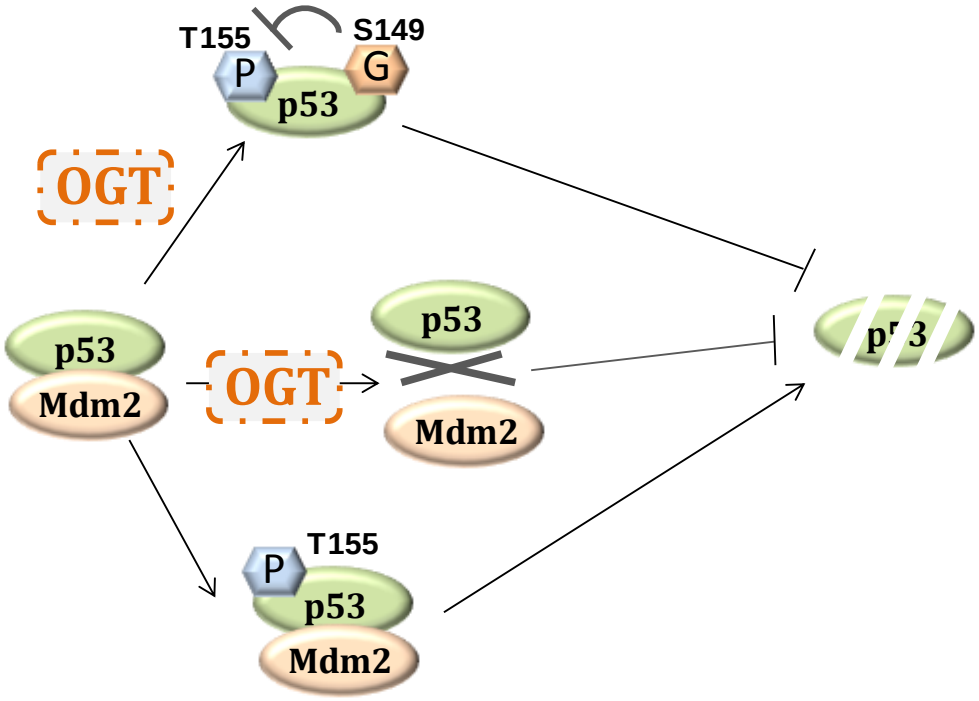


Figure 26. Régulation de la protéine p53 par la *O*-GlcNAcylation

Sp1 est un facteur de transcription à doigt de zinc qui lie les séquences d'ADN riches en motif CG. Sp1 est la cible de plusieurs MPTs, la phosphorylation, l'acétylation et la *O*-GlcNAcylation, qui régulent finement son activité transcriptionnelle qui peut être activatrice ou répressive selon les gènes (Solomon *et al.,* 2008). La *O*-GlcNAcylation favorise aussi sa localisation nucléaire. En effet, il a été reporté que Sp1 est rapidement *O*-GlcNAcylé suite à une stimulation par l'insuline. La *O*-GlcNAcylation de Sp1 diminue ensuite parallèlement à l'augmentation de sa phosphorylation. La *O*-GlcNAcylation de Sp1 augmente sa localisation nucléaire et ainsi la transcription de ses gènes cibles comme la calmoduline (Majumdar *et al.,* 2003, 2006).

3.5.2 Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur la stabilité des protéines

La *O*-GlcNAcylation peut moduler la stabilité des protéines telles que les récepteurs aux œstrogènes α (Jiang & Hart, 1997 ; Cheng & Hart, 2000) et β (Cheng *et al.*, 2000), des protéines de structure comme les cytokératines 8/18 (Chou *et al.*, 1992; Srikanth *et al.*, 2010) ; des suppresseurs de tumeur/oncogènes comme p53 (Yang *et al.*, 2006)et c-Myc (Chou *et al.*, 1995), et des facteurs de transcription dont Sp1 (Han & Kudlow, 1997).
Comme nous l'avons vu précédemment au §3.4.2, la thréonine 58 de c-Myc est capable d'être alternativement *O*-GlcNAcylée et phosphorylée (Chou *et al.*, 1995). Le turnover de c-Myc est rapide, elle a une demi-vie courte de 30 minutes. La phosphorylation de c-Myc sur la Thr58 est un signal de dégradation protéasomale alors que celle de la Ser62 participe à la stabilisation de la protéine. Lorsque c-Myc est *O*-GlcNAcylée sur Thr58, cela empêche sa phosphorylation et favorise la phosphorylation de la Ser62, augmentant ainsi la stabilité de c-Myc (Kamemura & Hart, 2002). Ce résidu Thr58 est particulièrement intéressant puisqu'il est fréquemment muté dans les cancers dont les lymphomes de Burkitt, entraînant ainsi la stabilisation de c-Myc.

Dans le cas du suppresseur de tumeur p53, c'est la *O*-GlcNAcylation d'un site proximal, la Thréonine 158, qui va diminuer la phosphorylation de la thréonine 155, signal de dégradation. La *O*-GlcNAcylation de p53 augmente ainsi sa stabilité en la protégeant de la dégradation ubiquitine-dépendante (Yang *et al.*, 2006) **(Figure 26)**.

En plus de moduler la dégradation des protéines, la *O*-GlcNAcylation est en étroite relation avec le protéasome. L'inhibition de l'OGA par la streptozotocine dans le cerveau, menant à une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation, est associée à une inhibition du protéasome

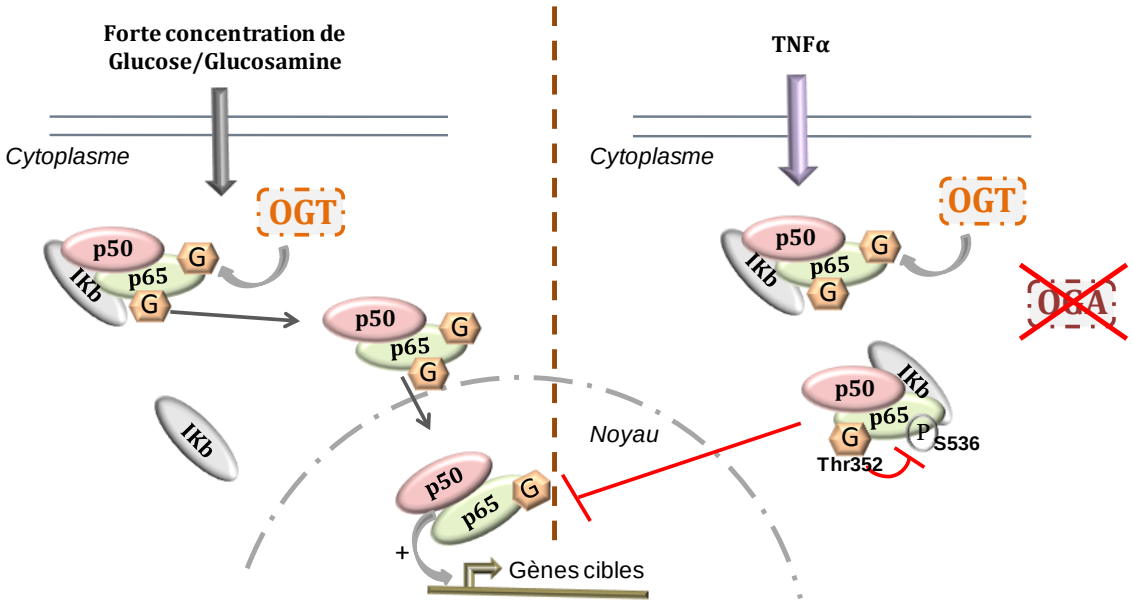
(Liu *et al.*, 2004). Cette inhibition serait due à la *O*-GlcNAcylation de composants impliqués dans le système ubiquitine-protéasome. Le protéasome 26S est un complexe multiprotéique formé d'un core catalytique, le protéasome 20S et de deux sous-unités régulatrices, la 11S et la 19S. Avant que les protéines soient envoyées au protéasome, elles sont ubiquitinylées par l'action successive de 3 enzymes (E1, E2, E3) afin d'être reconnues et dégradées par ce complexe. L'enzyme d'activation de l'ubiquitine, E1 (Guinez *et al.*, 2008), les sous-unités 19S (Zhang *et al.*, 2003) et 20S (Overath *et al.*, 2012), un des complexes régulateurs du protéasome, PA700/S10B (Xu et *al.*, 2012), ainsi que la protéine Rpt2 de la sous-unité 19S sont des cibles directes de l'OGT.

L'ensemble de ces données nous permettent de conclure que la *O*-GlcNAcylation protège les protéines de la dégradation protéasomale soit directement, soit en glycosylant et en inhibant des composants du système ubiquitine-protéasome.

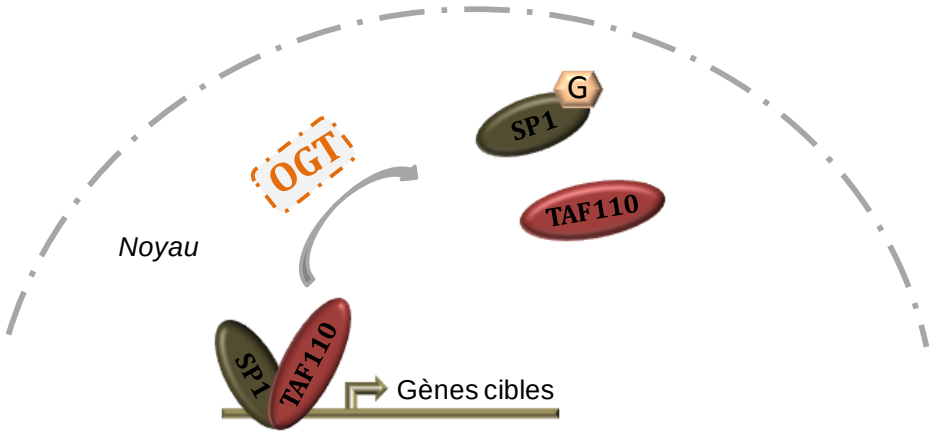
3.5.3 Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'interaction protéine-protéine

En condition normale, la protéine p53 est recrutée par la protéine Mdm2 qui agit comme une ubiquitine ligase et va envoyer p53 au protéasome. La phosphorylation de p53 sur de nombreux sites de phosphorylation empêche son interaction avec Mdm2, sauf sur la thréonine 155 qui est un signal de dégradation protéasomale de la protéine p53. Comme précédemment évoqué, la *O*-GlcNAcylation de la sérine 149 de p53 permet de la stabiliser car elle va inhiber la phosphorylation de la thréonine 155. La *O*-GlcNAcylation sur la sérine 149 de p53 ne se limite pas à cela, elle inhibe aussi l'interaction de p53 avec son partenaire Mdm2, contribuant une fois de plus à augmenter sa stabilité (Yang *et al.*, 2006) **(Figure 26).**

Le facteur de transcription NF-kB (*Nuclear Factor-KappaB*) régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose (Gaur & Aggarwal, 2003) ou encore la réponse pro-inflammatoire et immune (Karin & Delhase, 2000). Dans des cellules non stimulées, NF-kB est séquestré dans le cytoplasme par son inhibiteur Ikb (*inhibitor of nuclear factor kappa-b*). Suite à une stimulation, Ikb est phosphorylé puis ubiquitinylé et dégradé par le protéasome. Le facteur NF-kB ainsi libéré peut alors être transloqué au noyau où il pourra exercer son activité transcriptionnelle (Viatour *et al.*, 2005). En présence d'une forte concentration de glucose ou de glucosamine, le facteur NF-kB est



<u>Figure 27.</u> Influence de la *O*-GlcNAcylation sur la localisation et l'activité de NF-kB



<u>Figure 28.</u> Régulation de l'interaction Sp1/TAF110 par la *O*-GlcNAcylation

(D'après Oczan et al., 2010)

retrouvé *O*-GlcNAcylé dans des cellules mésangliales de rat, des fibroblastes embryonnaires de souris et des cellules musculaires vasculaires lisses (James *et al.*, 2002 ; Yang *et al.*, 2008). La *O*-GlcNAcylation du facteur de transcription NF-kB va agir directement sur sa localisation subcellulaire par la dissociation de son inhibiteur IKb (James *et al.*, 2002). Le facteur NF-kB est *O*-GlcNAcylé sur les thréonines 322 et 352 de sa sous-unité p65 (Yang *et al.*, 2008). La *O*-GlcNAcylation de Thr352 entraîne une inhibition de son interaction avec son inhibiteur IKb, ce qui permet sa translocation nucléaire et l'activation de ses gènes cibles (Yang *et al.*, 2008 ; Golks *et al.*, 2007) **(Figure 27).**

En revanche, une autre étude montre que l'inhibition de l'OGA dans des cellules quiescentes musculaires lisses artérielles inhibe l'activation du NF-kB par le TNF alpha, en empêchant la libération de NF-kB de son inhibiteur IkB. Cela résulte d'une augmentation de la *O*-GlcNAcylation de la sous-unité p65 qui entraîne une diminution de la phosphorylation de la sérine 536, indispensable à sa dissociation avec IKb (Xing *et al.*, 2011). Les auteurs expliquent qu'ils obtiennent des résultats contradictoires par rapport aux premières études car les précédents résultats sont obtenus suite à une augmentation de glucose qui entrainerait un stress oxydatif, la *O*-GlcNAcylation étant connue pour augmenter en réponse à divers stress (Zachara *et al.*, 2004). Il est également possible que la *O*-GlcNAcylation de d'autres sites sur NF-kB puisse contribue à sa séquestation par IkB, ce qu'il faudrait vérifier en localisant les sites *O*-GlcNAc occupés dans ces conditions expérimentales.

Ces résultats suggèrent que sous des stimulations différentes, une même protéine peut être *O*-GlcNAcylée sur des sites différents, et que sa *O*-GlcNAcylation influencerait les propriétés fonctionnelles de la protéine selon la stimulation perçue, comme peut le faire la phosphorylation.

Dans le cas du facteur de transcription Sp1, sa *O*-GlcNAcylation inhibe son association avec plusieurs partenaires dont le coactivateur TAF110 (TATA-binding-protein associated factor) (Roos *et al.*, 1997) **(Figure 28)**, NF-Y (Lim & Chang, 2009b), Elf-1 (Lim & Chang, 2009a) et SREBP2 (*sterol regulatory element binding protein*) (Lim & Chang, 2010). L'inhibition des interactions de Sp1 au travers de sa *O*-GlcNAcylation inhibe son activité transcriptionnelle.

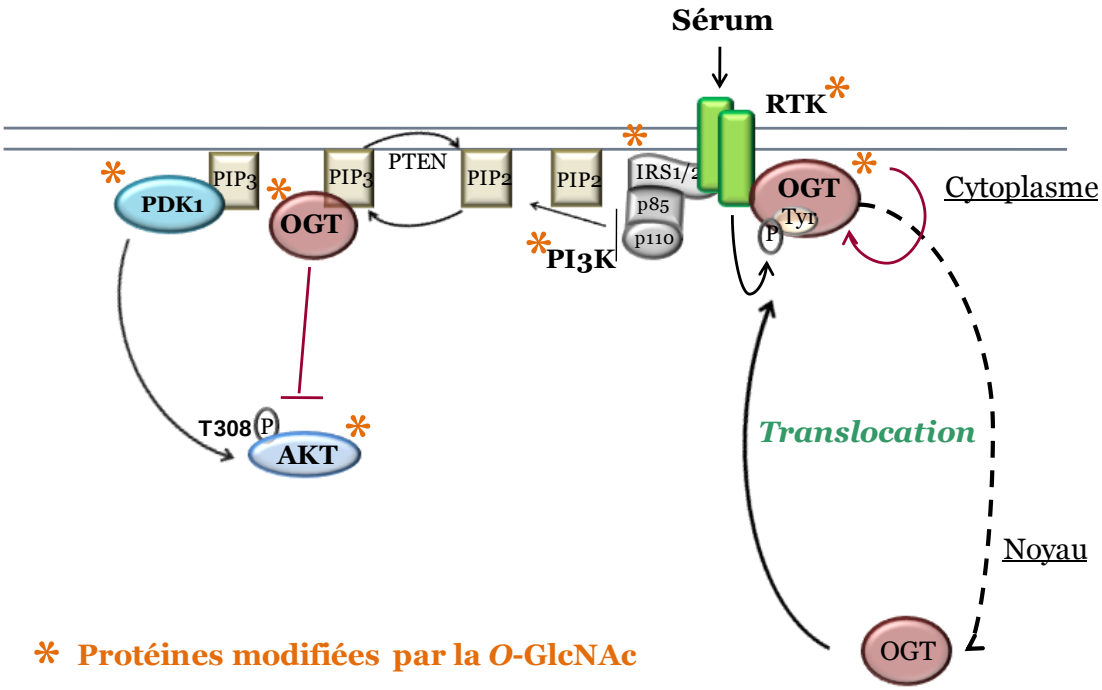


Figure 29. Action de l'OGT sur la voie PI3K/AKT suite à une stimulation par le sérum

3.5.4 Rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'activité des protéines

De nombreuses kinases sont glycosylées par l'OGT. Pourtant, peu de données existent sur le rôle fonctionnel de la *O*-GlcNAcylation sur leur activité kinasique.

Une étude protéomique à grande échelle rapporte que les kinases seraient plus fréquemment *O*-GlcNAcylées que les autres classes de protéines identifiées (16% *versus* 10%), ce qui n'est pas le cas des phosphatases (Trinidad *et al.,* 2012). De plus, contrairement aux sites de phosphorylation, très peu de sites *O*-GlcNAcylés se trouvent dans le domaine catalytique des kinases (1,5% des sites *O*-GlcNAcylés *versus* 30% des phosphosites) (Trinidad *et al.,* 2012). Ceci suggère que la *O*-GlcNAcylation servirait de niveau supplémentaire pour réguler la kinase (changement de conformation, interaction avec des partenaires), dont l'activité catalytique propre est conduite par les variations de phosphorylation, comme ce qui est décrit dans le cas de la kinase AKT.

Il a en effet été montré que AKT *O*-GlcNAcylée est associée à une diminution de la phosphorylation de la thréonine 308 indispensable à son activation (Park *et al.,* 2005). Suite à une stimulation des cellules par l'insuline ou par des mitogènes, une partie de l'OGT est rapidement relocalisée du noyau à la membrane plasmique où elle va *O*-GlcNAcyler différents membres de la voie de signalisation PI3K/AKT dont AKT **(Figure 29)**. La *O*-GlcNAcylation d'AKT entraîne une diminution de son activité kinasique (Vosseller *et al.,* 2002), aboutissant à une atténuation du signal d'activation de la voie PI3K/AKT (Yang *et al.,* 2008). Dans le même sens, il a été montré dans plusieurs lignées cellulaires que lorsque l'OGA est surexprimée, induisant une baisse du niveau de *O*-GlcNAcylation, l'activité kinasique d'AKT est augmentée (Vosseller *et al.,* 2002 ; Luo *et al.,* 2008 ; Soesanto *et al.,* 2008). Enfin, très récemment, un mécanisme par lequel la *O*-GlcNAcylation d'AKT entraîne une diminution de son activité kinasique a été proposé. Quatre sites *O*-GlcNAc ont été identifiés sur AKT, les sérines 126 et 129 et les thréonines 305 et 312. Plus particulièrement, la *O*-GlcNAcylation des thréonines 305 et 312 va empêcher son interaction avec PDK1, kinase en amont d'AKT dans la voie PI3K/AKT **(Figure 29)**, inhibant la phosphorylation de la thréonine 308 et aboutissant à une diminution son activité kinasique, comme précédemment décrit (Wang *et al.,* 2012).

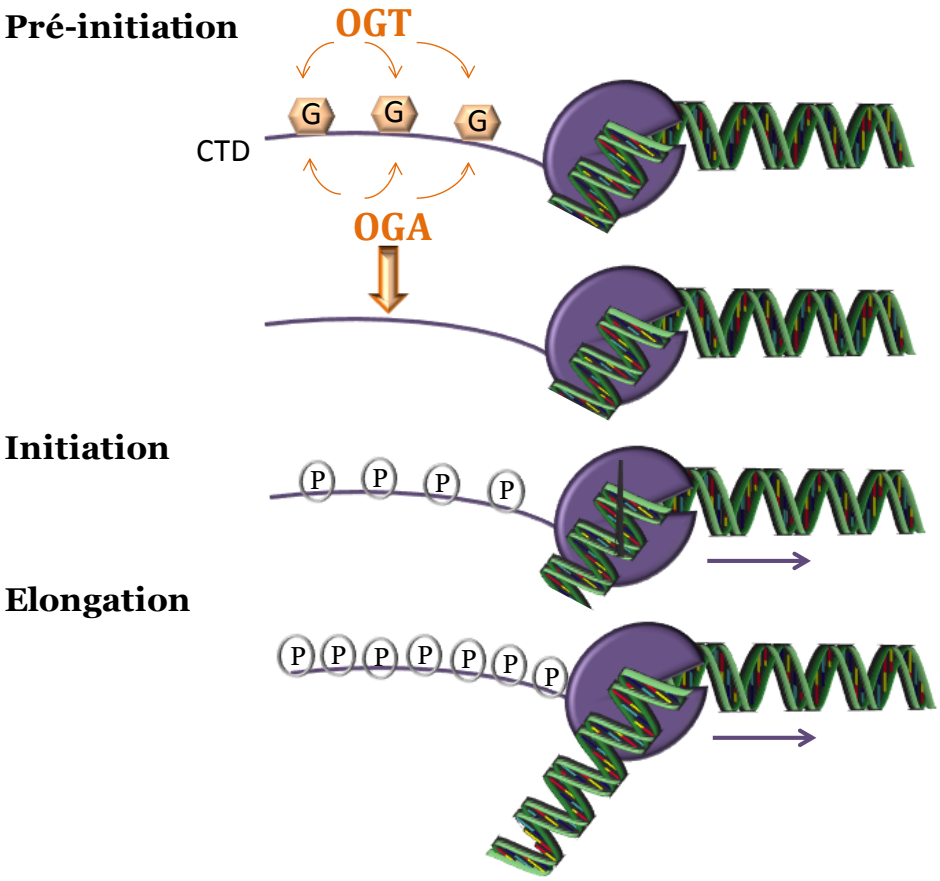
3.6 Processus biologiques régulés par la *O*-GlcNAcylation

3.6.1 La *O*-GlcNAcylation et la transcription

De nombreux facteurs de transcription sont des cibles de l'OGT, comme HCF-1, NF-kB, SP1, STAT5a, CREB, YY1, NeuroD1, c-Myc, FoxO (pour revue Ozcan *et al.*, 2010).

De plus l'OGT est capable de se complexer avec des activateurs et des répresseurs de la transcription. Par exemple, en s'associant avec le corépresseur transcriptionnel mSin3A, elle participe à la répression transcriptionnelle lors de son recrutement sur les régions promotrices (Yang *et al.*, 2002). L'OGT peut aussi interagir avec les HDAC (Yang *et al.*, 2002), connues pour modifier la compaction de la chromatine. Notons également que l'OGA possède un domaine HAT actif *in vitro*, bien que cela n'ait pas encore été prouvé *in vivo* (§3.2.2.1).

L'OGT a aussi pour cible des protéines constituantes de la chromatine, les histones, qui jouent un rôle essentiel dans la transcription en remodelant la chromatine. Chez l'Homme, les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont *O*-GlcNAcylées avec un site d'identifié pour chacune d'elles : la thréonine 101 pour l'histone H2A, la sérine 36 pour H2B, la sérine 10 de l'histone H3 et la sérine 47 pour l'histone H4 (Kaleem *et al.*, 2008 ; Sakabe & Hart, 2010). De manière intéressante, l'H2B *O*-GlcNAcylée a également reporté chez la plante de tabac (*Nicotiana tabacum*) (Schouppe *et al.*, 2011). La *O*-GlcNAcylation des histones tendrait plutôt vers une répression de la transcription car, suite à un choc thermique, le niveau de *O*-GlcNAcylation augmente de façon concomitante à une condensation de la chromatine (Sakabe *et al.*, 2010). Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour affiner les connaissances du rôle de la *O*-GlcNAc sur les histones. De façon intéressante, il a été reporté chez *C. elegans* que l'inhibition de l'activité de l'OGA ou de l'OGT altère la *O*-GlcNAcylation des protéines associées à la chromatine de 100 gènes et est associée à une augmentation d'expression pour 50% de ces gènes et à une diminution pour les 50% autres (Love *et al.*, 2010). L'inactivation de l'OGT entraîne une dérégulation des gènes impliqués dans la réponse au stress, le vieillissement, la fonction mitochondriale, le métabolisme des acides aminés ou encore dans la reproduction. La perte d'activité de l'OGA mène quant à elle à une altération de gènes jouant un rôle dans le remodelage de la chromatine, le transport membranaire, le métabolisme des carbohydrates et aussi dans la réponse au stress et au vieillissement (Love *et al.*, 2010).



<u>Figure 30.</u> Régulation de la transcription par la *O*-GlcNAcylation

Il est également bien décrit que la *O*-GlcNAcylation peut influencer la transcription en entrant en compétition avec la phosphorylation sur l'ARN polymérase II. L'ARN polymérase II est *O*-GlcNAcylée dans sa partie C-terminale, entraînant un changement de sa conformation et bloquant ainsi les sites de la phosphorylation. La *O*-GlcNAcylation de l'ARN polymérase II se produit lors de l'initiation et elle est essentielle à l'assemblage du complexe d'initiation. L'ARN polymérase II doit ensuite être impérativement déglycosylée par l'OGA afin d'être phosphorylée en C-terminale, indispensable pour le processus d'élongation (Kelly *et al.*, 1993; Comer & Hart, 2001) **(Figure 30)**. De plus, de nombreuses protéines intervenant dans le complexe de l'ARN polymérase sont modifiées par la *O*-GlcNAcylation notamment les HnRNPs : HNRNP K, U, G, L et I (Nandi *et al.*, 2006 ; Park *et al.*, 2007 ; Gurcel *et al.*, 2008 ; Wang *et al.*, 2009 ; Clark *et al.*, 2008 ; Teo *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2011).

3.6.2 La *O*-GlcNAcylation et la traduction

Plusieurs évidences montrent que la *O*-GlcNAcylation joue un rôle dans la traduction. Différentes études protéomiques nous informent que la *O*-GlcNAcylation est très présente au niveau des composants des sous-unités ribosomales 60 et 40S responsables de la traduction des protéines. A partir de cellules humaines et d'ovocytes de Xénope, de nombreuses protéines ribosomales *O*-GlcNAcylées ont été identifiées dont des composants de la sous-unité 60S : RPL4, RPL9, RPL10, RPL13, RPL17, RPL24, RPL26, RPL28 et RPL37 (Teo *et al.*, 2010) ; RPL8, RPL17, RPL21 (Gurcel *et al.*, 2008) ; RPL6, RPL7, RPL15 (Zeidan *et al.*, 2010) ; RPL4A, RPL5A et RPL18A (Dehennaut *et al.*, 2008b) et de la sous-unité 40 S du ribosome : RPS4 (Wang *et al.*, 2007) RPS6, RPS16, RPS18 et RPS19 (Teo *et al.*, 2010) ; RPS2 et RPS8 (Gurcel *et al.*, 2008) ; RPS3 et RPP0 (Wang *et al.*, 2007 ; Zeidan *et al.*, 2010) ; RPS31 et RPS32 (Dehennaut *et al.*, 2008b). Cependant, le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur ces différentes protéines reste à définir.

D'autres composants de la machinerie de traduction sont *O*-GlcNAcylées comme p67 **(***eIF2-associated 67-kDa glycoprotein*). Lorsque p67 est *O*-GlcNAcylée, elle interagit avec le facteur d'initiation eIF2α, inhibant son interaction avec eIF2β, favorisant la traduction car la séquestration du facteur eIF2β par eIF2α inhibe la synthèse protéique (Datta *et al.*, 2003).

Une autre étude appuie l'idée que la *O*-GlcNAcylation prend part à la régulation de la traduction. Cette étude confirme l'identification de composants ribosomaux précédemment répertoriés comme des cibles du couple OGT/OGA, ainsi que de nouvelles cibles telles que RPL15, 26 et 27 (Ohn *et al.*, 2008). Lors de l'induction d'un stress cellulaire par l'arsénite, la

O-GlcNAcylation participe à l'assemblage des granules de stress mais pas à celle des p-bodies (*cytoplasmic processing bodies ou corps GW*) nécessaires tous deux à la dégradation et au stockage des ARNm (Ohn *et al.*, 2008). Même si le rôle précis de la *O*-GlcNAcylation dans la traduction reste à éclaircir, il est évident que la dynamique *O*-GlcNAc participe activement à ce processus. En conclusion, ces données soulignent l'importance de la *O*-GlcNAcylation dans la régulation de divers processus cellulaires. Compte tenu de la diversité des protéines *O*-GlcNAcylées et des voies physiologiques dans lesquelles elles sont impliquées, il n'est pas étonnant que de la même manière que la phosphorylation, la dérégulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation soit associée à l'étiologie de certaines pathologies telles que les maladies neurodégénératives (Alzheimer), les maladies cardiovasculaires, le diabète de type II et le cancer (Lefebvre *et al.*, 2010 ; Dias *et al.*, 2007 ; Zachara *et al.*, 2012).

Dans cette dernière partie consacrée à la *O*-GlcNAcylation, je vais détailler les connaissances actuelles sur son rôle dans le cycle cellulaire. Je terminerai cette introduction par l'implication de la *O*-GlcNAcylation dans les cancers car, comme nous le savons, une des caractéristiques majeures des cellules cancéreuses sont des dysfonctionnements du cycle cellulaire.

IV. La *O*-GlcNAc : Du cycle cellulaire au cancer

4.1 Impact de la balance *O*-GlcNAc sur le cycle cellulaire

La régulation du niveau de *O*-GlcNAcylation est importante pour la progression normale des cellules dans le cycle cellulaire et plus particulièrement lors de la mitose. Slawson et collaborateurs sont les premiers à avoir mis en évidence que le niveau de *O*-GlcNAcylation varie au cours du cycle cellulaire. Ils ont observé que les cellules mitotiques présentent un niveau de protéines *O*-GlcNAcylées plus important que les cellules asynchrones (Slawson *et al.*, 2005, 2008). En corrélation avec ces travaux, il a été reporté que l'augmentation du niveau global de *O*-GlcNAcylation dans les cellules mitotiques est associée à un taux d'expression et de transcrits de l'OGT plus élevé dans les cellules en mitose que dans les cellules asynchrones (Whitfield *et al.*, 2002 ; Sakabe *et al.*, 2010).
Des précédents travaux de notre équipe ont également montré que la maturation des ovocytes, analogue à une transition G2/M de cellules non germinales, est associée à une augmentation du niveau global de *O*-GlcNAcylation. En effet, lorsque l'OGT est inhibée, l'entrée des

ovocytes en phase M est ralentie. A l'inverse, sa surexpression entraîne une accélération du passage des cellules en M (Dehennaut *et al.*, 2007 ; Dehennaut *et al.*, 2008a). Ces résultats peuvent sembler contradictoires mais ils proviennent de 2 modèles différents, des cellules épithéliales humaines et des ovocytes de Xénope. De plus, les résultats obtenus dans les cellules humaines proviennent d'une comparaison entre cellules mitotiques et cellules asynchrones alors que l'étude réalisée sur les ovocytes de Xénope compare des ovocytes immatures (Phase G2) à des ovocytes matures (Phase M).

La régulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation est essentielle pour une progression correcte des cellules dans le cycle cellulaire. En effet, une dérégulation de la balance *O*-GlcNAc par l'inhibition pharmacologique ou génétique de l'OGT ou de l'OGA, entraîne un ralentissement de la prolifération cellulaire et affecte la progression mitotique des cellules (Slawson *et al.*, 2005). Plus précisément, la surexpression de l'OGT ou de l'OGA altère l'expression des cyclines : l'expression des cyclines D et E est inhibée lors des phases précoces du cycle cellulaire, à l'inverse l'expression des cyclines mitotiques, A et B, reste soutenue même après la phase M. Ces dérégulations d'expression des cyclines sont associées à des défauts de cytokinèse, conduisant à l'apparition de cellules aneuploïdes (15 à 20% des cellules) dans les cellules surexprimant l'OGT ou l'OGA (Slawson *et al.*, 2005). De plus, la surexpression de l'OGT aboutit à une augmentation des phosphorylations inhibitrices sur les résidus Thr14 et Tyr15 de la CDK1 empêchant l'activation du complexe Cycline B/CDK1, indispensable à la transition G2/M du cycle cellulaire (Wang Z *et al.*, 2010a).

La localisation de l'OGT en phase M peut expliquer en partie les perturbations causées lors des évènements mitotiques dans des cellules surexprimant l'OGT. En métaphase, l'OGT est principalement localisée au niveau du fuseau mitotique, puis lors de la cytokinèse, elle va s'accumuler au niveau du midbody et va pouvoir ainsi réguler facilement les évènements mitotiques au travers de la glycosylation de ses cibles (Slawson *et al.*, 2005 ; Slawson *et al.*, 2008). De plus, au niveau de ces structures cellulaires, l'OGT forme un complexe transitoire avec l'OGA, la phosphatase PP1 et la kinase Aurora B. Ce complexe permet la régulation fine des MPTs de leurs protéines cibles intervenant, par exemple, dans le réarrangement du cytosquelette (Slawson *et al.*, 2008) (§3.4.3).

4.2 La *O*-GlcNAcylation des protéines dans le cycle cellulaire

La dynamique de *O*-GlcNAcylation est donc régulée de manière dépendante du cycle cellulaire. Cependant, le lien fonctionnel entre la *O*-GlcNAcylation et le cycle cellulaire est

surtout suggéré par le fait que de nombreuses protéines intervenant dans le contrôle de la prolifération sont *O*-GlcNAcylées, telles que c-Myc (Kamemura *et al.,* 2002), p53 (Yang *et al.*, 2006), v-jun et fos (Tai *et al.,* 2004), ERK2 (Dehennaut *et al.,* 2008) ou encore la protéine SFR (*Serum response factor*) (Reason *et al.,* 1992). Cependant, très peu d'études replacent leur *O*-GlcNAcylation dans le contexte de la régulation du cycle cellulaire. Par ailleurs, malgré le nombre croissant de sites *O*-GlcNAc localisés grâce aux approches protéomiques à grande échelle, les cyclines et les CDKs n'ont toujours pas été reportées comme *O*-GlcNAcylées. Une seule étude récente a révélé que l'OGT peut se complexer à CDK4 dans des cellules humaines asynchrones (Havugimana *et al.*, 2012). Cependant, le rôle fonctionnel de cette interaction reste à élucider.

Bien que cela n'ait pas été démontré formellement, la *O*-GlcNAcylation pourrait participer à la régulation du point de restriction de la phase G1 dont le régulateur clé est le complexe pRb/E2F (Wells *et al.*, 2011). Comme nous l'avons vu dans l'introduction (§2.3.5, **Figure 16**), les phosphorylations successives de pRb par les complexes Cycline/CDK permettent de libérer le facteur de transcription E2F. Il a été reportée que la protéine pRb est *O*-GlcNAcylée plus fortement dans les cellules HeLa synchronisées en G1 suite à un traitement à la lovastatine qui perturbe la synthèse du cholestérol, ce qui suggère que la *O*-GlcNAcylation de pRb serait modifiée au cours de la progression dans le cycle cellulaire. La forme *O*-GlcNAcylée de pRb est capable d'interagir avec E2F. En G1, pRb est hypophosphorylée et *O*-GlcNAcylée (Wells *et al.*, 2011). Cependant, le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur les propriétés fonctionnelles de pRb ainsi que sur son interaction avec E2F reste à déterminer plus précisément.

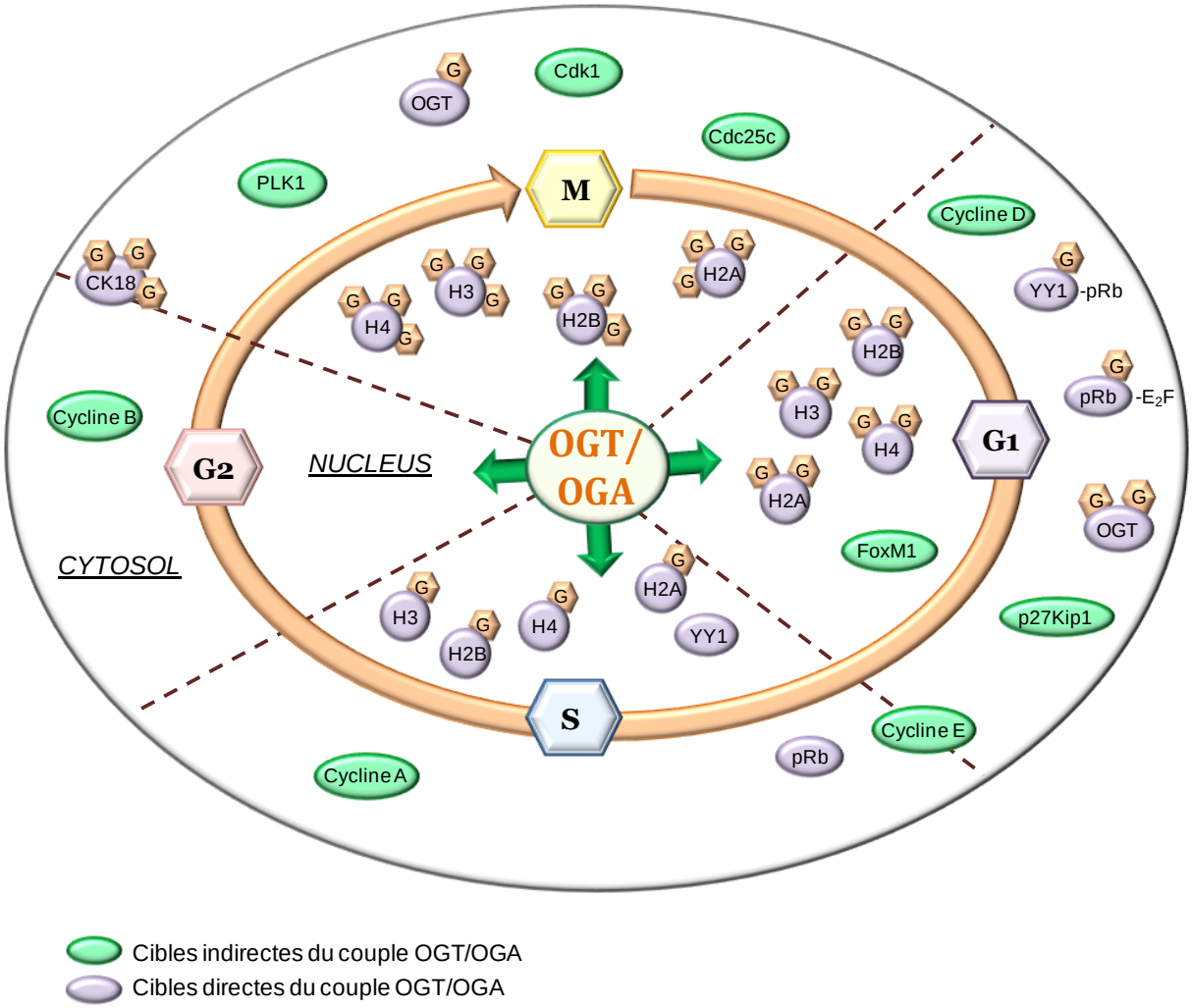
Le facteur de transcription YY1 est incapable de se lier à l'ADN lorsqu'il est en complexe avec la protéine pRb en phase G1. Lorsque YY1 est *O*-GlcNAcylé, cela va induire sa libération de la protéine pRb et il va pouvoir alors activer la transcription suite à sa fixation possible sur les promoteurs qu'il régule (Hiromura *et al.*, 2003).

Le cofacteur de transcription HCF1 (*Host Cell Factor C1*) intervient dans les transitions G1/S et G2/M. HCF-1 est synthétisé sous forme d'un précurseur inactif appelé HCF1PRO. Il va devoir être clivé en 2 sous-unités, une sous-unité N-terminale HCF-1_N et une sous-unité C-terminale HCF-1_C qui vont respectivement réguler les transitions G1/S et G2/M. HCF-1 est capable de s'associer avec de nombreux partenaires telles que des histones

désacétylases et méthyltransférases afin de moduler la structure de la chromatine en vue de la transcription de gènes participant à la progression du cycle cellulaire (Wysocka *et al.,* 2003 ; Julien & Herr, 2004). Il a été montré que HCF1 est *O*-GlcNAcylé sur sa sous-unité HCF-1_N avant d'être clivé et que l'inhibition de l'OGT par siRNA empêche le clivage de la forme précurseur HCF1PRO. Les auteurs suggèrent que l'OGT entrainerait un changement de conformation de la protéine rendant plus accessible le site de clivage, et que ce clivage serait stimulée par la *O*-GlcNAcylation de HCF1PRO (Capotosti *et al.,* 2011). Ces résultats montrent pour la première fois que l'activité de l'OGT peut contribuer à la maturation protéolytique d'une protéine.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction (§1.3.1), la kinase ATM est recrutée et activée aux transitions G1/S et G2/M en réponse à des cassures doubles brins de l'ADN. Très récemment, les travaux de Miura et collaborateurs ont montré que la *O*-GlcNAcylation régule positivement l'activation d'ATM en réponse aux dommages à l'ADN suite à des radiations ionisantes. La diminution de la *O*-GlcNAcylation par le DON entraîne une diminution de l'activité d'ATM. A l'inverse, l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation par la PUGNAc augmente son activité (Miura *et al.,* 2012). Cette augmentation d'activité est corrélée à la dissociation d'ATM glycosylée avec la phosphatase PP2A dont le rôle est de maintenir ATM sous forme inactive. Un stress oxydatif permet aussi l'activation d'ATM suite à la phosphorylation de sa sérine 1981. Dans ces conditions, ATM est aussi *O*-GlcNAcylée, prouvant qu'ATM activée est à la fois phosphorylée et *O*-GlcNAcylée. Cependant, les trois sites *O*-GlcNAc identifiés sur la protéine ATM, les sérines 367, 1893 et 1981, sont connus pour être des phosphosites nécessaires à l'activation d'ATM (Bakkenist & Kastan, 2003 ; Kozlov *et al.,* 2006). Afin de mieux comprendre la régulation d'ATM par les MPTs, il est donc nécessaire de comprendre le dialogue *O*-GlcNAcylation/phosphorylation qui a lieu sur cette protéine. Ces résultats montrent que la *O*-GlcNAcylation est un élément important dans la réponse précoce aux dommages à l'ADN (Miura *et al.,* 2012).

Comme nous l'avons déjà évoqué, les histones H2A, H2B, H3 et H4 sont des cibles directes de l'OGT (§3.6.1). Les sites *O*-GlcNAc identifiés sont aussi des sites de phosphorylation impliqués dans la dimérisation de H2A avec H2B et dans l'association en tétramères pour les histones H3 et H4 (Sakabe *et al.,* 2010). Il est connu depuis longtemps que la phosphorylation, la méthylation et l'acétylation des histones (*le code des histones*) sont



<u>Figure 31.</u> Actions directes et indirectes du couple OGT/OGA au cours du cycle cellulaire

régulées en fonction du cycle cellulaire ; récemment il a été montré que c'est également le cas pour la *O*-GlcNAcylation des histones (Bonenfant *et al.*, 2007 ; Sakabe & Hart, 2010). En effet, la *O*-GlcNAcylation des histones est moins élevée dans la phase S comparativement aux autres phases (Zhang et *al.*, 2011). La phosphorylation et la *O*-GlcNAcylation sont en compétition sur la sérine 10 de l'histone H3, alors que la *O*-GlcNAcylation de la sérine 112 de l'histone H2B favorise l'ubiquitinylation de sa lysine 120 (Kaleem *et al.*, 2008 ; Fujiki *et al.*, 2011). La surexpression de l'OGT affecte aussi l'acétylation de la lysine 9 et la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (Sakabe & Hart, 2010). Inversement à sa phosphorylation, l'histone H3 est plus faiblement *O*-GlcNAcylée dans les cellules mitotiques comparées aux cellules asynchrones. L'histone H3 est *O*-GlcNAcylée sur la thréonine 32 qui est phosphorylée lors de l'entrée en phase M. D'ailleurs, la *O*-GlcNAcylation de Thr 32 altère non seulement sa phosphorylation, mais aussi celle de 2 autres sites proches, les sérines 10 et 28 (Fong *et al.*, 2012). L'ensemble de ces données publiées ces deux dernières années indique un rôle direct de la *O*-GlcNAcylation dans le remodelage de la chromatine au cours du cycle cellulaire, cette glycosylation venant ajouter un niveau de complexité et de régulation supplémentaire dans le code des histones (Sakabe & Hart, 2010 ; Zhang *et al.*, 2011).

4.3 Impact biologique de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation sur la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses.

La première étude mettant en évidence une dérégulation de la dynamique de *O*-GlcNAcylation dans le cancer a été réalisée sur une petite cohorte de tumeurs primaires de sein. Cette étude a révélé une augmentation de l'activité de la *O*-GlcNAcase dans les tumeurs primaires mammaires par rapport au tissu sain adjacent, sans corrélation avec le grade tumoral (Slawson *et al.*, 2001). Ce résultat a été retrouvé quelques années plus tard dans les cancers de la thyroïde en comparaison avec des tumeurs bénignes, des adénomes et des lésions non-néoplasiques de la thyroïde (Krzeslak *et al.*, 2010). Néanmoins, ces deux travaux n'ont pas étudié l'expression de l'OGT et de l'OGA dans les différents échantillons.

Par des approches d'immunohistologie et de Western-blot, la majorité des études récentes montre au contraire que le niveau de *O*-GlcNAcylation dans les tissus tumoraux est nettement supérieur à celui dans les tissus sains adjacents, et ceci dans le cancer du sein, des

poumons, du colon et de la prostate (Caldwell *et al.,* 2010 ; Mi *et al.*, 2011 ; Lynch *et al.*, 2012). L'augmentation de la *O*-GlcNAcylation semble être une caractéristique générale lors du processus de cancérisation des cellules épithéliales.

Il semblerait que ce niveau élevé de *O*-GlcNAcylation dans les tumeurs soit principalement dû à une forte augmentation de l'activité de l'OGT. En effet, l'invalidation de l'OGT par shRNA bloque le phénotype cancéreux de lignées cellulaires tumorales mammaires en inhibant la prolifération cellulaire, la migration, et l'invasion *in vitro,* mais aussi la croissance tumorale *in vivo* (Caldwell *et al.*, 2010). Il est intéressant de remarquer que l'inhibition de l'OGT n'a pas d'effet sur les cellules non cancéreuses MCF10A, suggérant que la dérégulation de l'expression de l'OGT n'est pas un évènement précoce dans la cancérisation mais contribue à accélérer le processus (Caldwell *et al.,* 2010). Une seconde étude confirme l'effet de l'inhibition de l'OGT sur l'invasion et la migration des cellules cancéreuses mammaires et révèle une diminution de l'adhésion cellulaire, mais sans qu'il y ait toutefois d'impact sur la croissance des tumeurs primaires (Gu *et al.,* 2010). Ces mêmes résultats sont retrouvés lorsque les auteurs surexpriment l'OGA. D'autres études ont confirmé l'implication de l'OGT dans les processus de cancérisation puisque son invalidation inhibe l'angiogenèse et l'invasion tumorales en bloquant la formation de métastases osseuses à partir des tumeurs primaires prostatiques (Lynch *et al.*, 2012). De même, dans des lignées cellulaires de cancer de poumon ou de colon, le potentiel invasif des cellules cancéreuses est perdu lorsque l'expression de l'OGT est inhibée, sans toutefois observer un effet significatif sur la prolifération cellulaire (Mi *et al.*, 2011).

Deux études très récentes ont analysé l'expression des transcrits de l'OGT et de l'OGA dans les tumeurs mammaires et de la vessie (Krzeslak *et al.*, 2012 ; Rosanski *et al.*, 2012). Krzeslak et collaborateurs montrent que les niveaux des transcrits de l'OGT et de l'OGA dépendent du grade tumoral des tumeurs mammaires et endométriales (Krzeslak *et al.*, 2012) : Les tumeurs mammaires de grade II et III présentent un niveau très élevé de transcrits de l'OGT comparativement aux tumeurs mammaires de grade I, ceci est en corrélation avec l'augmentation d'expression protéique de l'OGT retrouvée dans les tumeurs affectant divers tissus (sein, poumon, colon, prostate). A l'inverse de l'OGT, le taux de transcrits de l'OGA diminue significativement dans les tumeurs de grade avancé (stade II/III *versus* stade I) (Krzeslak *et al.*, 2012).

Ces différences d'expression suggèrent une utilisation diagnostique potentielle du dosage des transcrits de l'OGT et de l'OGA entre des stades précoces et tardifs de cancer.
C'est ce que proposent Rozanski et collaborateurs en retrouvant des niveaux d'expression différents des transcrits de l'OGT et de l'OGA dans l'urine de personnes atteintes d'un cancer de la vessie *versus* des personnes saines (Rozanski *et al.*, 2012). Les auteurs montrent que les transcrits de l'OGT, contrairement à ceux de l'OGA, ne sont pas retrouvés chez les personnes saines, et que le taux de transcrits de l'OGT augmente en fonction de l'avancée du grade tumoral (Rozanski *et al.*, 2012).

Nous avons vu précédemment que la *O*-GlcNAcylation des protéines est directement dépendante du taux de glucose intracellulaire. L'augmentation de la *O*-GlcNAcylation retrouvée dans les cancers corrèle avec une caractéristique des cellules cancéreuses appelée l'effet Warburg. En effet, les cellules cancéreuses consomment environ 10 fois plus de glucose que les cellules normales afin de satisfaire l'augmentation de leurs besoins énergétiques et métaboliques (Kawauchi *et al.*, 2009 ; Shi *et al.*, 2012). L'augmentation du flux entrant de glucose pourrait contribuer à la hausse du niveau intracellulaire d'UDP-GlcNAc, et par conséquent, à l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation retrouvée dans divers cancers. L'augmentation de *O*-GlcNAcylation se poursuivrait même à des stades avancés de cancérisation puisque des clones métastasés de cancer de colon et du sein présentent un niveau encore plus élevé de *O*-GlcNAcylation en comparaison aux cellules de la tumeur primaire (Yehezkel *et al.*, 2012 ; Gu *et al.*, 2010).

Au contraire, dans les leucémies, une étude rapporte que l'augmentation de *O*-GlcNAcylation est associée à un meilleur pronostique car les cellules cancéreuses plus agressives présentent un niveau de *O*-GlcNAcylation plus faible et une activité augmentée de l'OGA. La diminution de l'activation des voies de signalisation AKT et JNK pourrait être une conséquence de l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation, contribuant à un pronostic plus favorable de ces tumeurs (Shi *et al.*, 2010). Ces voies sont en effet indispensables à la stimulation des cellules lymphoïdes et leur inhibition entraîne un ralentissement de leur prolifération (Shi *et al.*, 2010). Par ailleurs, dans les leucémies lymphoïdes chroniques, les protéines p53 et c-Myc ainsi que l'OGT sont fortement *O*-GlcNAcylées (Shi *et al.*, 2010). Le meilleur pronostic est cohérent avec une augmentation de la *O*-GlcNAcylation de p53.

En effet, p53 *O*-GlcNAcylée est stabilisée et peut alors jouer son rôle du suppresseur de tumeur en inhibant la prolifération cellulaire. Cependant, il est reporté que la *O*-GlcNAcylation de c-Myc a également un effet protecteur. Or c-Myc est connu pour être un oncogène capable de stimuler le processus de cancérisation. Aucun site *O*-GlcNAc n'ayant été identifiée dans cette étude, nous pouvons supposer que la *O*-GlcNAcylation d'une même protéine peut avoir un effet biologique différent selon le contexte cellulaire normal ou cancéreux, comme ce qui a été décrit pour NF-kB sur lequel la *O*-GlcNAcylation n'a pas le même effet selon la stimulation cellulaire (§3.5.3).

L'ensemble de ces travaux récents indique que l'augmentation global du niveau de *O*-GlcNAcylation, corrélée à une augmentation de l'expression de l'OGT dans les cellules cancéreuses épithéliales est une caractéristique générale de ce type de cancers. La corrélation avec le grade tumoral doit être approfondie. Au contraire, dans les leucémies, l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation est associée à un meilleur pronostic (mais une seule étude). Ces données suggèrent que l'impact de la dérégulation de la balance *O*-GlcNAc sur le processus de cancérisation diffère selon le type de cancer. Par ailleurs, ces études indiquent également que la *O*-GlcNAcylation n'a probablement pas un effet primaire moteur dans la cancérisation, mais qu'elle s'ajoute aux anomalies génétiques et métaboliques pour amplifier les avantages prolifératifs et invasifs des cellules cancéreuses.

4.4 Impact de la dérégulation de la balance de *O*-GlcNAcylation sur des protéines particulières

Les variations d'expression ou d'activité de l'OGT et l'OGA ont un effet direct ou indirect sur des protéines intervenant dans les processus tumoraux.

L'extinction de l'expression de l'OGT par shRNA dans une lignée cellulaire cancéreuse de sein dans laquelle l'OGT est naturellement surexprimée, entraîne une diminution de la prolifération cellulaire, corrélée à une augmentation de l'expression de p27kip1 (Caldwell *et al.*, 2010). L'inhibition de l'OGT entraîne une diminution de l'expression et de l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription FOXM1 (*fork head box protein M1*) qui contrôle l'expression notamment de Skp2. La diminution subséquente de Skp2 ralentit la dégradation de p27kip1, qui peut alors davantage inhiber les complexes Cycline/CDK indispensables à la progression vers la phase S (Caldwell *et al.*, 2010).

Par ailleurs, la perte d'expression de FOXM1 est aussi associée à une diminution d'expression de d'autres de ses cibles dont les métalloprotéases (MMP) qui sont des enzymes très importantes dans le remodelage de la matrice extracellulaire et qui facilitent l'invasion tumorale. Il a été montré en effet que l'invalidation de l'OGT diminue le caractère invasif des cellules cancéreuses *via* la diminution de l'expression de MMP dans les tumeurs mammaires et prostatiques (Caldwell *et al.*, 2011 ; Lynch *et al.*, 2012). Enfin, l'effet positif de l'OGT sur l'invasion tumorale peut également s'expliquer par une diminution de l'adhérence cellulaire des cellules cancéreuses. En effet, lorsque l'OGT est invalidée, les complexes E-Cadhérine/ß-caténine retrouvés au niveau de la membrane plasmique sont stabilisés, ce qui entraîne une meilleure adhérence des cellules entres elles, et par conséquent une inhibition de l'invasion tumorale (Gu *et al.*, 2010).

Ces études montrent que dans les cellules cancéreuses, la perturbation de la dynamique *O*-GlcNAc peut participer à la dérégulation de nombreux processus cellulaires impliqués dans le développement tumoral, tels que la prolifération, la migration et l'invasion. Etant donné la diversité des voies de signalisation mises en jeu, il est maintenant important de mieux décrypter les mécanismes moléculaires (dé)régulés par la *O*-GlcNAcylation qui sous-tendent la tumorigenèse.

Matériels & Méthodes

Matériel et Méthodes

I. Culture cellulaire

1.1. Entretien des cellules

Les cellules épithéliales de cancer du sein MCF7 et les fibroblastes embryonnaires humain de poumon Wi38 sont cultivés, respectivement, dans du milieu complet DMEM (Dulbecco Minimum Essential Medium, Lonza) et EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium, Lonza) contenant 4,5 g/L de glucose, additionnés de 200 mM de L-glutamine et 1% de mélange d'antibiotiques (10 U/mL de pénicilline et 10 µg/mL de streptomycine, Invitrogen, Gibco), enrichis avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Lonza). Les cellules épithéliales humaines MCF10A sont cultivées dans du milieu MEGM (Mammary Epithelial cell Growth Medium) composé du milieu MEBM (Mammary Epithelial Basal Medium) supplémenté avec 13 mg/ml d'extraits bovin pituitaire (*BPE*), 10 µg/ml de facteur de croissance épidermique humain *(hEGF)*, 0.5 mg/ml d'Hydrocortisone et 5 mg/ml d'insuline (Lonza). Les cellules sont incubées à 37°C, sous atmosphère humide à 95% d'air et 5% de CO_2.

1.2. Synchronisation et traitement des cellules

Les cellules sont synchronisées par privation en sérum ou par traitement à l'Hydroxyurée (HU).

Pour la synchronisation par carence en sérum, les cellules MCF7, et Wi38 sont ensemencées à 250.10^3 et les MCF10A à 275.10^3 dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre (Corning). Deux jours après (60-70% de confluence), le tapis cellulaire est rincé deux fois dans du PBS puis placé dans le milieu de sevrage (milieux DMEM et EMEM non enrichis en SVF pour respectivement les cellules MCF7 et Wi37 et dans le milieu MEBM non enrichi en facteurs mitogènes pour les cellules MCF10A). Après 48 heures de sevrage, les cellules MCF7 et Wi38 sont stimulées par l'ajout de 10% de SVF dans le milieu (vol/vol). Les cellules MCF10A sont sevrées pendant 24 heures puis placées dans du milieu MEGM. Les cellules sont ensuite arrêtées aux différents temps indiqués.

Pour la synchronisation à l'Hydroxyurée, les cellules MCF7 sont incubées dans du milieu complet DMEM contenant 2.5 mM d'hydroxyurée (HU, Sigma-Aldrich) pendant 16 heures, replacées dans du DMEM complet frais pendant 13 heures, réincubées avec du DMEM complet contenant 2.5 mM d'HU pendant 16 heures. Les cellules sont alors synchronisées à la transition G1/S (temps 0). Afin d'être relâchées dans le cycle cellulaire, elles sont replacées 4 heures dans du milieu complet DMEM frais.

Différents inhibiteurs ont été utilisés et ajoutés dans le milieu de culture, soit simultanément à la stimulation par le sérum (MCF7 et Wi38) ou par des facteurs mitogènes

(MCF10A), soit 12 heures après la stimulation des cellules, c'est à dire quand les cellules sont en phase G1 : la wortmaninne (10 nM, Sigma-Aldrich), un inhibiteur de la kinase PI3K ; le MG132 (6 µM, Sigma-Aldrich), un inhibiteur de la dégradation protéasomale ; la chloroquine (50 µM, Sigma-Aldrich) et la monensine (10 µM, Sigma-Aldrich), deux inhibiteurs de la dégradation lysosomale ; le Thiamet G (100 nM), un inhibiteur spécifique de l'OGA (synthétisé par le Pr. J. Lemoine, UMR 5180, Université Lyon) ; le cycloheximide (10 µg/mL, Sigma-Aldrich), un inhibiteur de la synthèse protéique ; la leptomycine B (50nM, Sigma-Aldrich), un inhibiteur de l'export nucléaire.

II. Analyse du cycle cellulaire en cytométrie en flux

La synchronisation en G0/G1 et la progression des cellules MCF7, MCF10A et Wi38 dans les différentes phases du cycle cellulaire sont analysées en cytométrie en flux. Au temps de stimulation souhaité, le tapis cellulaire est rincé deux fois au PBS froid avant d'être trypsinisé (500 µL de trypsine-EDTA/ boîte) puis les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est lavé deux fois dans du PBS, et resuspendu dans 100 µL de PBS. Les cellules sont ensuite fixées dans 5 mL d'éthanol 70% glacé et placées pendant au minimum 1 h à -20°C. Après 2 lavages du culot cellulaire au PBS (400 g, 7 minutes), les cellules sont marquées par 500 µL d'une solution d'iodure de propidium (50 µg/mL d'iodure de propidium, 50 µg/mL de RNase A (DNAse free) et 5 mM $MgCl_2$ (Sigma-Aldrich), à 37°C pendant 30 minutes et à l'obscurité. Les échantillons sont conservés à 4°C jusqu'à leur analyse ultérieure en cytomètrie en flux.

L'analyse du cycle cellulaire se fait sur le cytomètre en flux FacScalibur (Beckman Dickinson) en utilisant le logiciel Cell Quest Pro. Après avoir réglé les paramètres de voltage et d'ampérage pour détecter au mieux les cellules en fonction de leur taille et de leur granulométrie (dot blot FSC en fonction de SSC), l'émission de fluorescence de l'iodure de propidium (λ excitation 488 nm ; λ émission 637 nm) est lue sur le canal FL2. L'acquisition des données se fait sur un total de 10.000 événements. L'iodure de propidium s'intercalant dans l'ADN de manière stœchiométrique, la proportion des cellules en G0/G1, S, et G2/M est obtenue après analyse des données sur le logiciel ModFit LT (BD) en utilisant le module 'synchronization wizard'.

III. Lyse cellulaire et Western blot

3.1. Lyse cellulaire

Pour récupérer les lysats totaux, les cellules sont rincées deux fois rapidement au PBS froid puis lysées dans le tampon de lyse (50 mM Tris-HCL pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% SDS et 1% Triton X-100) contenant des inhibiteurs de protéases (Cocktail inhibitors tablet, Sigma-Aldrich), de phosphatases (100 µM orthovanadate, 5 mM sodium fluoride, Sigma-Aldrich) et 100 µM de GlcNAc. Après 10 minutes sur glace, les lysats cellulaires sont récupérés et centrifugés 10 minutes à 17.400 g pour éliminer les débris cellulaires.

3.2. Dosage protéique

Pour chaque échantillon, un dosage protéique est réalisé à l'aide du kit MICRO-BCA (Pierce), en utilisant une gamme étalon de BSA (Albumine bovine sérique, Sigma). Les échantillons sont aliquotés et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation ultérieure.

3.3 Immunoprécipitation

Les cellules sont lysées dans le tampon IP (50mM Tris-HCL pH 8, 150mM NaCl, 0,5% (v/v) NP-40 contenant les différents inhibiteurs précédemment décrits. Après 10 minutes sur glace, le lysat cellulaire est récupéré et centrifugé 10 minutes à 17.400 g pour éliminer les débris cellulaires. La concentration protéique est déterminée à l'aide du kit MICRO-BCA (Pierce). Les extraits cellulaires sont incubés pendant 1 h avec 20 µl de billes de protéine G-sépharose (preclearing ; GE Healthcare). Après centrifugation, le surnageant est incubé pendant 2 heures sur roue à 4°C avec les anticorps primaires (2-5µg) (CK8 (Ozyme) ; HnRNP K (Abcam) ; Caprine-1 (Euromedex) ; MCM2, -6, -7 (Santa Cruz) ; MCM3 (Cell signaling)). Cinquante µL de billes de protéine G couplées à la sépharose (GE Healthcare) sont resuspendues dans le tampon de lyse (1:1) et ajoutés au mix surnageant/anticorps pour une incubation d'1 heure sur roue à 4°C. Après l'incubation, les billes sont lavées trois fois avec le tampon de lyse, reprises dans 50 µl de tampon dénaturant (tampon de Laemmli) et chauffées à 95°C pendant 5 minutes.

IV. Immunorévélation des protéines

Avant l'électrophorèse en gel SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*), les protéines sont dénaturées dans du tampon de Laemmli 5X pendant 10 minutes à 95°C et 20 µg de chaque échantillon (lysat total) sont déposés par puits. Les protéines sont séparées classiquement par SDS-PAGE (gel à 8% de réticulation), à raison de 25 mA/gel, puis transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond C, GE Healthcare) à raison de 100 mA/gel pendant 2 h (tampon de transfert : 25mM Tris, 192 mM Glycine et 20% méthanol).

Après coloration de la membrane au rouge ponceau, la membrane est décolorée puis saturée pendant 45 minutes dans du TBS-Tween (15 mM Tris pH 8.0 ; 140 mM NaCl et 0,05% Tween) contenant 5% de lait écrémé en poudre (p/vol) ou 3% de BSA (p/vol) selon l'anticorps primaire utilisé. Après saturation, les membranes sont incubées en présence de l'anticorps primaire dilué dans la solution de saturation pendant toute une nuit à 4°C (Tableau I). Après 3 lavages de 10 minutes avec du TBS-Tween, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à la peroxydase dilué au 1/10.000^{ème} pendant 1 h à température ambiante (ECL anti-rabbit/mouse IgG, Horseradish peroxydase linked species-specific whole antibody, GE Healthcare). Après 3 lavages de 10 minutes, les membranes sont incubées avec le réactif de chimioluminescence (ECL+, GE Healthcare) afin de procéder à la

révélation, en utilisant des films autoradiographiques (Amersham Hyperfilm MP, GE Healthcare).

Anticorps I	Saturation	Dilution	Fournisseur
RL2 (1)	Lait 5%	1/1.000	Abcam (ab2739)
OGT (Ti14) (2) **OGT** (AL28) (2)	Lait 5%	1/2.000	Sigma (O 6014) Donnée par le Pr. G. HART
OGA (345) (3)	Lait 5%	1/4.000	donné par le Pr. G. HART
P-Erk (Thr202/Tyr204) (2)	Lait 5%	1/1.000	Cell signaling (#9101)
P44/42 MAPK (Erk1/2) (2)	Lait 5%	1/5.000	Cell signaling (#9102)
Phospho-Akt (Ser473) (D9E) (2)	BSA 3%	1/2.000	Cell signaling (#4060)
Akt (pan) (40D4) (1)	BSA 3%	1/1.000	Cell signaling (#2920)
Cycline D1 (2)	BSA 3%	1/1.000	Millipore (#06-137)
Cycline B (D-11) (1)	BSA 3%	1/1.000	Santa Cruz (sc-7393)
Cycline A (H-432) (2)	BSA 3%	1/1.000	Santa Cruz (sc-751)
Cycline E (HE12) (1)	Lait 5%	1/1.000	Millipore (#05-363)
Cytokératine 8 (C51) (1)	Lait 5%	1/1.000	Ozyme
HnRNP K (3C2) (1)	Lait 5%	1/1.000	Abcam (39975)
Caprine 1 (2)	Lait 5%	1/1.000	Euromedex (15112-1-AP)
MCM2 (H-126) (2)	Lait 5%	1/1.000	Santa Cruz (sc-10771)
MCM3 (2)	Lait 5%	1/1.000	Cell signaling (#4012)
MCM6 (H-300) (2)	Lait 5%	1/1.000	Santa Cruz (sc-22781)
MCM7 (141.2) (1)	Lait 5%	1/1.000	Santa Cruz (sc-9966)
Histone 2B (2)	Lait 5%	1/5.000	Millipore (#07-371)
β-Actine (I-19) (2)	Lait 5%	1/2.000	Santa Cruz (sc-1616)
GAPDH (2)	Lait 5%	1/5.000	Abcam (ab9484)

Tableau 1. Récapitulatif des différents anticorps utilisés pour les immunorévélations.

(1) anticorps monoclonaux de souris, (2) anticorps polyclonaux de lapin, (3) anticorps polyclonaux de poulet.

V. Mesure de l'activité de l'OGA

Ce test d'activité in vitro est basé sur l'hydrolyse du pNP-GlcNAc (4-nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide, Sigma-Aldrich) par l'OGA, à pH neutre (pour limiter l'action des hexosaminidases lysosomales qui agissent à pH acide), puis la lecture de la densité optique à 400 nm, proportionnelle à la quantité de pNP libéré dans l'échantillon (Kang *et al.*, 2009). Les cellules MCF7 sont lysées dans 50 mM Tris-HCL pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, contenant les inhibiteurs précédemment décrits sauf la GlcNAc. La concentration en protéines est mesurée à l'aide du kit MICRO-BCA (Pierce). L'activité de l'OGA est effectuée dans un volume final de 100 µL contenant 40 µL de lysat protéique total (préparé fraîchement), 50

mM de tampon sodium cacodylate à pH 6.5, 2 mM pNP-GlcNAc, and 50 mM GalNAc, en présence ou non de 100 nM de Thiamet G. Le mélange de la réaction est incubé pendant 1 heure à 37°C. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout de 900 µL de 500 mM de sodium carbonate et l'absorbance du mélange final est lue à 400 nm au spectrophotomètre (Epoch Spectrophotometer System, BioTek Instruments, Colmar, France). Pour chaque échantillon, l'absorbance mesurée en présence de Thiamet G est soustraite à celle mesurée sans Thiamet G, donnant l'absorbance correspondante à l'activité de l'OGA. Les valeurs reportées de l'activité de l'OGA ont été rapportées par mg de protéines. 100% d'activité d'OGA correspond à l'activité mesurée d'OGA dans les cellules quiescentes.

VI. Immunofluorescence

Les cellules MCF7 sont ensemencées sur des lamelles de verres disposées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre à une densité de 250.10^3 cellules par boîtes. De la même manière que décrite précédemment, les cellules sevrées sont stimulées par le sérum pendant différents temps (0, 12, 15 et 18 heures). Douze heures après stimulation, les cellules sont traitées ou non avec 50 nM leptomycine B, un inhibiteur de l'export nucléaire (Connor *et al.*, 2003). Les cellules sont lavées au PBS, puis sont fixées pendant 30 minutes à température ambiante soit par addition d'une solution contenant 4% paraformaldéhyde (p/vol) et 4% de sucrose (p/vol) pour la détection de l'OGT et des protéines *O*-GlcNAcylées ou par une solution de méthanol (100%) pour la détection de l'OGA. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont ensuite perméabilisées dans une solution de PBS contenant 0,5% de Triton X-100 pendant 20 minutes, puis rincées. Les lames sont placées dans une chambre humide et les cellules sont incubées pendant 1 heure à température ambiante soit dans une solution de blocage contenant 2% sérum de veau, 2% BSA, 0,2% de gélatine dans du PBS pour la détection de l'OGT et des protéines *O*-GlcNAcylées ou soit dans 3% BSA dilué dans du PBS pour la détection de l'OGA. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire dilué au $1/100^{ème}$ dans le tampon de blocage ou dans 3% BSA dilué dans le PBS pendant une nuit à 4°C (RL2, AL28 (anti-OGT) ou 345 purifié (anti-OGA)). Après 3 lavages rapides au PBS, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à un fluorophore, pendant 1 h à température ambiante et à l'obscurité (Alexa fluor 568 monoclonal (RL2), Alexa fluor 488 polyclonal (AL28), au $1/600^{ème}$ (Molecular Probes) et Hilyte Fluor™ 488 au $1/1.000^{ème}$ (anti-OGA 345)). Après 3 lavages rapides au PBS, 5 µL de liquide de montage (Mowiol) sont utilisés pour monter les lamelles sur lame. Les lames sont ensuite laissées 1 heure à température ambiante et à l'obscurité. L'observation a été réalisée sur un microscope confocal inversé spectral Leica SP5 (en collaboration avec le Dr François Foulquier, UMR CNRS 8576 sur la plateforme d'imagerie BiCéFaL, IRI CNRS USR 3078, Villeneuve d'AScq).

VII. Fractionnement cellulaire & Electrophorèse bidimensionnelle (2D)

Les fractions cytosolique et nucléaire sont obtenues comme décrit dans Gurcel *et al.*, 2008. Les cellules MCF7 sont arrêtées aux différents temps indiqués, lavées 2 fois dans du PBS froid et incubées dans le tampon de lyse I (20 mM Tris-HCL pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Triton-X100, 5 mM MgCl2), contenant les inhibiteurs décrits précédemment, pendant 30 minutes sur glace. Les lysats cellulaires sont centrifugés à 1.000g pendant 10 minutes. Le surnageant est de nouveau centrifugé à 20.000g pendant 20 minutes, le surnageant final obtenu étant considéré comme la fraction cytoplasmique. Le premier culot est lavé une nouvelle fois dans le tampon de lyse I et centrifugé à 1.000g pendant 10 minutes. Le surnageant est jeté et le culot est solubilisé dans le tampon de lyse II (20mM Tris-HCL pH 7.6, 400 mM NaCl, 1% Triton-X100, 50 mM KCl and 20% glycérol) contenant les inhibiteurs décrits ci-dessus, pendant 30 minutes sur glace. Finalement, le surnageant obtenu après la dernière centrifugation à 1.300g pendant 10 minutes est considéré comme la fraction nucléaire. Pour les 2 fractions, la concentration protéique est déterminée à l'aide du kit MICRO-BCA (Pierce).

Pour les électrophorèses bidimensionnelles, les extraits totaux (200 µg) obtenus comme décrit ci-dessus, les fractions subcellulaires (200 µg pour les strips 7-cm et 400 µg pour les strips 18-cm) sont dessalées et concentrées par précipitation à l'acétone pour les extraits totaux et la fraction cytoplasmique (80% (v/v) d'acétone, minimum 2 heures à -20°C) ou à l'aide du kit 2D-Clean Up (GE Healthcare) pour la fraction nucléaire. Les culots protéiques sont ensuite séchés quelques minutes sous Speed Vac (Eppendorf) et solubilisés dans le tampon de réhydratation (8 M Urée, 2 M Thiourée, 2% (w/v) CHAPS, 10 mM dithiothreitol (DTT), 1.2% (v/v) d'ampholytes pH 4-7, bleu de bromophénol). Le volume final de solubilisation est de 150 µL/échantillon pour les strips de 7 cm et de 350 µL/échantillon pour les strips de 18 cm. Les échantillons sont agités rigoureusement sur vortex jusqu'à dissolution complète du culot. Les échantillons sont ensuite chargés sur des IPG strips (7-cm ou 18-cm, pH 4-7, GE Healthcare). Les strips sont alors réhydratés passivement sur la nuit à température ambiante. Pour les strips de 7 cm, l'isoélectrofocalisation (IEF) est effectuée sur un système Protean IEF Cell (Bio-Rad Laboratories) selon le programme suivant : 2 h à 250 V, 2 h à 1000 V, 12 h à 8000 V et 9 h à 500 V, avec une intensité maximale de 50 µA/strip. Pour les strips 18 cm, le système Investigator 2D electrophoresis (Perkin-Elmer, Villebon sur Yvette, France) est utilisé et l'IEF est réalisée pendant 20 heures à 70 000 Volt-heure avec un maximum de 5 000 V et 80µA/strip. Quand l'IEF est finie, les strips sont incubés 2 fois, sous agitation douce, dans le tampon d'équilibration (375 mM Tris-HCL pH 8.8, 6 M urée, 2% (w/v) SDS and 30% (v/v) glycérol) contenant successivement 1% (w/v) DTT et 2% (w/v) iodoacétamide, pendant 20 minutes pour les strips de 18 cm et 12 minutes pour les strips de 7 cm. La deuxième dimension s'effectue classiquement par SDS-PAGE (gel à 8% de réticulation). Après les électrophorèses 2D, les gels sont colorés au nitrate d'argent ou transférés sur membrane de nitrocellulose. Pour l'immunoblot, les protéines sont détectées comme décrits ci-dessus en utilisant l'*ECL Advance™ blocking reagent* (GE Healthcare) pour

saturer et incuber les membranes avec l'anticorps RL2. Les gels colorés au nitrate d'argent et les films obtenus après l'immunoblot sont scannés sur le densitomètre GS800 (GS800 calibrated imaging Densitometer, BioRad) et le logiciel Quantity One® est utilisé pour l'acquisition des images. Après avoir été scannés, les images des Western blot 2D et des gels colorés au nitrate d'argent sont soigneusement superposés à l'aide du logiciel Image J®.

VIII. Identification des protéines par spectrométrie de masse en tandem

Les spots d'intérêts sont découpés à partir des gels, décolorés et digérés à la trypsine (G-Biosciences, Agro-Bio, La Ferté Saint-Aubin, France) une nuit à 37°C comme précédemment décrit (Gurcel *et al.*, 2008). L'identification protéique est réalisée par Nano-LC-ESI-MS/MS (Q-Star, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) (Mairesse *et al.*, 2011). L'identification des protéines a été faites à l'aide du serveur Mascot (Matrix Science) à partir de la banque de données Swiss-Prot (Sprot 0411 version, 525,207 sequences), avec les paramètres suivants: taxonomie, *Homo sapiens ;* 50 ppm de tolérance pour la masse de l'ion parent ; 50 mu pour la masse des ions fragments, possibilité d'un site de coupure manqué, carbamidométhylation des cystéines, l'oxydation possible des méthionines. Seules les protéines candidates avec un score Mascot significatif ont été prises en compte ($p < 0.05$, MudPIT scoring, expectation value < 0.05).

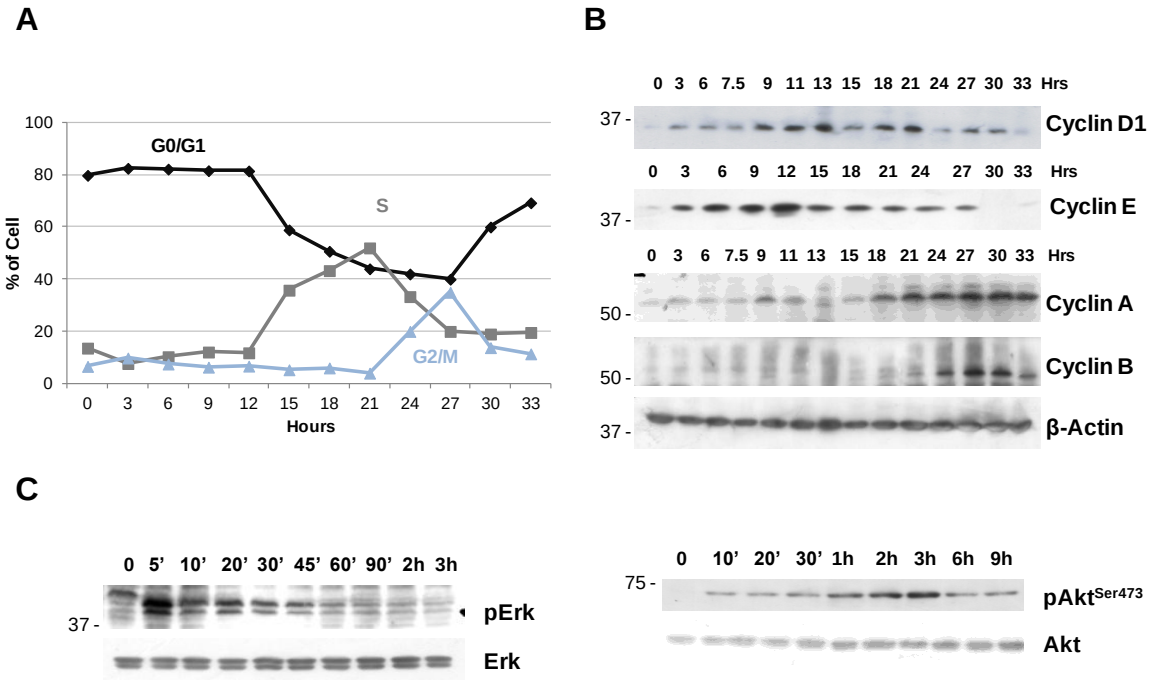
RESULTATS

Contexte scientifique des travaux de thèse

Nous avons vu dans l'introduction générale que les modifications post-traductionnelles régulent finement l'activité de protéines régulatrices pour assurer la progression harmonieuse du cycle cellulaire et le maintien de l'intégrité du génome. Les données de la littérature soulignent également l'importance de la dynamique de *O*-GlcNAcylation des protéines dans la régulation du cycle cellulaire, et en particulier lors de la transition G2/M et de la mitose (§ 4.1) (Slawson *et al.*, 2005 ; Dehennaut *et al.*, 2007 ; Dehennaut *et al.*, 2008 ; Slawson *et al.*, 2008). D'ailleurs, la compréhension du rôle de la *O*-GlcNAcylation dans le contrôle de la progression normale du cycle cellulaire est d'autant plus importante que des altérations de *O*-GlcNAcylation ont été reportées dans différentes lignées et tissus cancéreux (§4.2) (Shi *et al.*, 2010 ; Caldwell *et al*., 2010 ; Mi *et al.*, 2011 ; Lynch *et al.*, 2012). Cependant, l'implication de la *O*-GlcNAcylation dans les étapes précoces du cycle cellulaire reste méconnue.

Dans ce contexte scientifique, mes travaux de thèse ont eu pour objectif de comprendre comment la balance *O*-GlcNAc participe au contrôle de la prolifération cellulaire, en se focalisant sur les phases G1 et S du cycle cellulaire. Dans une première partie de mon travail, j'ai mis en évidence que le niveau global de *O*-GlcNAcylation est dépendant des phases du cycle cellulaire, notamment avec une chute marquée de la *O*-GlcNAcylation lors de l'entrée des cellules en phase S. Grâce à différentes approches expérimentales, j'ai davantage caractérisé la dynamique de *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S en étudiant l'expression de l'OGT et de l'OGA, l'activité endogène de l'OGA ainsi que la localisation de ces 2 enzymes. Dans un second temps, afin d'identifier les cibles protéiques du couple OGT/OGA dans les étapes précoces du cycle cellulaire, j'ai identifié par approche protéomique les protéines cytosoliques et nucléaires différentiellement *O*-GlcNAcylées entre les phases G0, G1 et S.

La majorité de ces résultats a fait l'objet d'une publication jointe à la fin de la partie résultats.



<u>Figure 32.</u> Analyse du cycle cellulaire des cellules MCF7 par cytométrie en flux et de l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire par Western blot

Les cellules MCF7 sont synchronisées en phase G0/G1 par 48 h de sevrage. Elles sont ensuite stimulées par du sérum puis **A,** marquées à l'iodure de propidium afin d'être analysées en cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire est reporté en fonction de la cinétique de stimulation par le sérum. Les extraits totaux des cellules MCF7 sevrées puis stimulées par du sérum sont analysés par Western blot pour déterminer **B,** l'expression des cyclines et **C,** l'activation des kinases ERK1/2 (Voie Raf/MEK/ERK) et AKT (voie PI3K/AKT)**.**

Résultats

I. Analyse du cycle cellulaire des cellules MCF7 stimulées par le sérum

Nous avons choisi de travailler sur la lignée de cellules épithéliales mammaires cancéreuses, les cellules MCF7. C'est une lignée couramment utilisée dont les voies de signalisation mitogènes sont bien connues et qui conserve un déroulement normal du cycle cellulaire malgré son phénotype cancéreux.

Nous avons choisi une méthode classique et sans drogue de synchronisation des cellules dans le cycle cellulaire : la mise en quiescence (G0) par sevrage et l'entrée dans le cycle cellulaire par stimulation avec les facteurs mitogènes du sérum. Afin d'étudier la dynamique de *O*-GlcNAcylation lors de la reprise et de la progression des cellules MCF7 dans le cycle cellulaire, nous avons tout d'abord déterminé les paramètres du cycle cellulaire de ces cellules dans nos conditions expérimentales.

1.1 Analyse du cycle cellulaire des cellules MCF7 par cytométrie en flux

L'analyse en cytométrie en flux des cellules marquées avec l'iodure de propidium (PI : *propidium iodide*) permet de détecter la fluorescence émise par cette molécule qui s'intercale de manière stœchiométrique entre les bases de l'ADN et de déterminer ainsi le pourcentage de cellules en phases G0/G1 (quantité d'ADN égale à 2n), S (quantité d'ADN comprise entre 2n et 4n), et G2/M (quantité d'ADN égale à 4n).

Cette approche nous a permis de vérifier la synchronisation des cellules en phase G0/G1. En effet, après une période de sevrage de 48 heures, plus de 80% des cellules MCF7 sont synchronisées en phase G0/G1 **(Figure 32)**. Nous avons ensuite déterminé le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire et la durée de ces dernières. Pour cela, les cellules sevrées ont été stimulées par le sérum sur une durée totale de 42 heures puis marquées au PI afin d'être analysées en cytométrie en flux (1 temps toutes les 3 heures). Ces résultats représentés dans la figure 32 montrent que le temps requis pour passer à travers le cycle cellulaire à partir d'un état quiescent est d'environ 33 heures.

La phase G1 dure environ 15 heures (0 à 15 h), la phase S 6 heures (15 à 21 h) et les phases G2 et M durent en moyenne 12 heures (21 à 33 h). Afin de déterminer plus précisément la durée de la phase S, le marquage des cellules à l'iodure de propidium a été associé à celui du BrdU (*5-bromo-2-deoxyuridine*). Le BrdU est un analogue de la thymidine qui va s'incorporer dans les cellules lors de la réplication de l'ADN. Le BrdU incorporé est ensuite détecté par un anticorps anti-BrdU couplé au FITC permettant l'analyse en cytométrie en flux.

Avec ce double marquage, nous avons obtenu des résultats similaires à ceux avec le marquage à l'iodure de propidium seul (*Data not shown*). Le protocole incluant l'incorporation puis la détection du BrdU (Pozarowski & Darzynkiewicz, 2004) étant plus contraignant et plus long du fait de l'accumulation des étapes (nombreuses centrifugations), nous avons donc choisi de n'utiliser que le marquage à l'iodure de propidium pour la suite des expériences.

1.2 Analyse de l'activation des voies de signalisation mitogènes et de l'expression des cyclines par Western blot

En parallèle de l'analyse en cytométrie en flux, nous avons déterminé par Western blot le niveau d'expression des cyclines, sous-unités régulatrices des complexes Cycline/CDK spécifiques des phases du cycle cellulaire (**Figure 5**, §1.2.3).
Comme le montre la figure 33B, la cycline D1 est induite dès 3 heures de stimulation, augmente progressivement avec une expression maximale entre 9 et 13 h, quand les cellules sont en phase G1. L'expression de la cycline E est induite plus tardivement après 6 heures de stimulation et devient maximale au temps 12 h, ce qui correspond à la transition G1/S **(Figure 32A)**. La cycline A, présente dans les cellules à un niveau basal, augmente fortement à 18 h avec un pic d'expression à 27 h, conformément à la transition S/G2 détectée par cytométrie en flux **(Figure 32A)**. Enfin, la cycline B est induite transitoirement à la fin du cycle cellulaire, entre 27 et 30 h. Les résultats que nous avons obtenus par Western blot sont donc en parfaite corrélation avec les données de cytométrie en flux et sont en accord avec la littérature (Botos *et al.*, 2003).

Nous avons ensuite étudié l'activation de deux voies de signalisation majeures requises pour l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire suite à une stimulation par des facteurs mitogènes, les voies Raf/MEK/ERK et PI3K/AKT (**Figure 11**, § 2.2). Pour cela, à partir des lysats totaux des cellules MCF7 synchronisées puis stimulées pendant différents

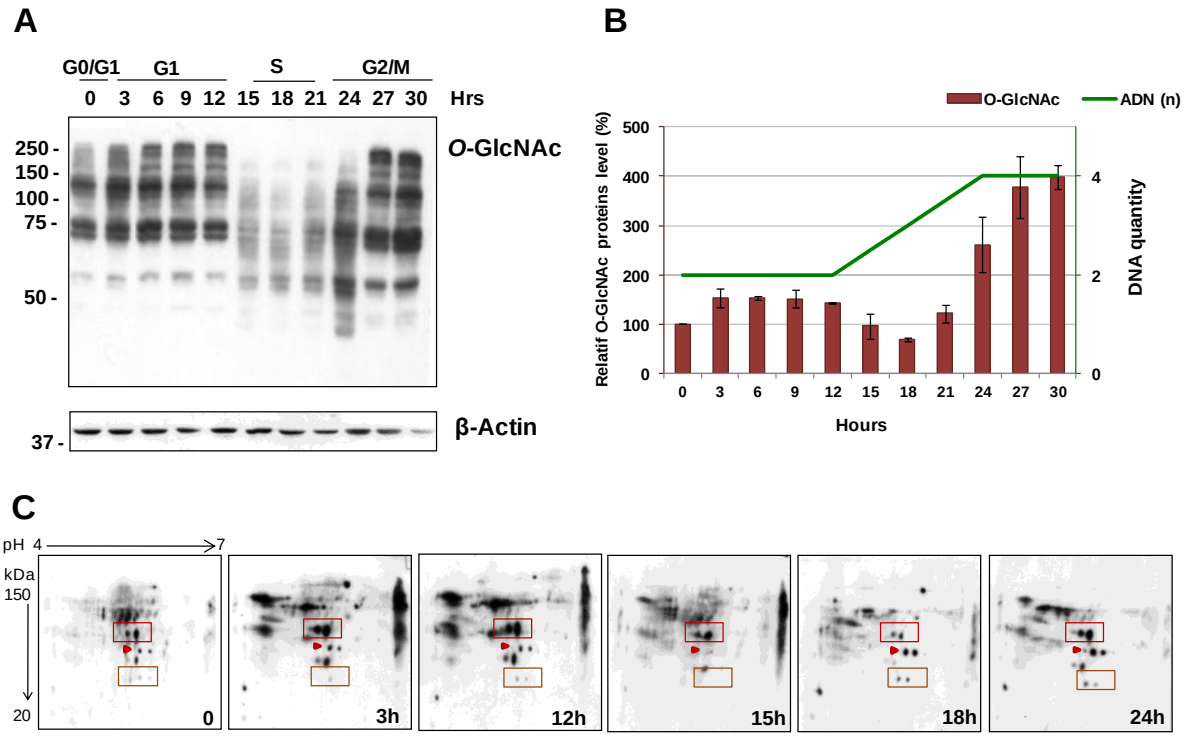


Figure 33. Variations de la *O*-GlcNAcylation au cours de la progression du cycle cellulaire des cellules MCF7

A, A partir de lysats totaux de cellules quiescentes, stimulées par le sérum, les protéines *O*-GlcNAcylées ont été révélées par Western blot avec l'anticorps spécifique RL2. **B,** Histogramme représentant le niveau relatif de *O*-GlcNAcylation (D.O. de la *O*-GlcNAcylation rapportée à la D.O. de l'actine) en fonction du temps (moyennes et écart-types obtenus à partir de 2 immunorévélations), la quantité d'ADN présent dans les cellules a été schématisée sur ce même graphique (ligne verte). **C,** Les protéines (200 µg) ont été séparées par isoélectrofocalisation sur des strips de 7 cm et de gamme pH 4-7, puis par SDS-PAGE 10% avant d'être transférées sur membrane de nitrocellulose. Les Western blots ont été révélés à l'aide de l'anticorps RL2.

temps, nous avons détecté par Western blot les protéines ERK1/2 et AKT sous leur forme totale ou phosphorylée. Les résultats présentés dans la figure 32C montrent que la phosphorylation de ERK1/2 est rapide et maximale dès 5 minutes de stimulation. Elle décroît ensuite progressivement jusqu'à un niveau basal atteint au temps 2 h. L'activation d'AKT, évaluée par la phosphorylation de la Ser473, commence dès 10 minutes et est maximale à 3 h de stimulation avant de diminuer aux temps 6 et 9 h **(Figure 32C)**.

La vérification de la synchronisation en G0/G1 des cellules MCF7 et de leur progression dans le cycle cellulaire suite à l'activation des voies Raf/MEK/ERK et PI3K/AKT, nous permet de valider la méthode de synchronisation choisie. Pour la suite des expériences, les cellules MCF7 seront synchronisées de cette manière et pour chaque expérience réalisée, la synchronisation des cellules sera systématiquement vérifiée en parallèle par cytométrie en flux.

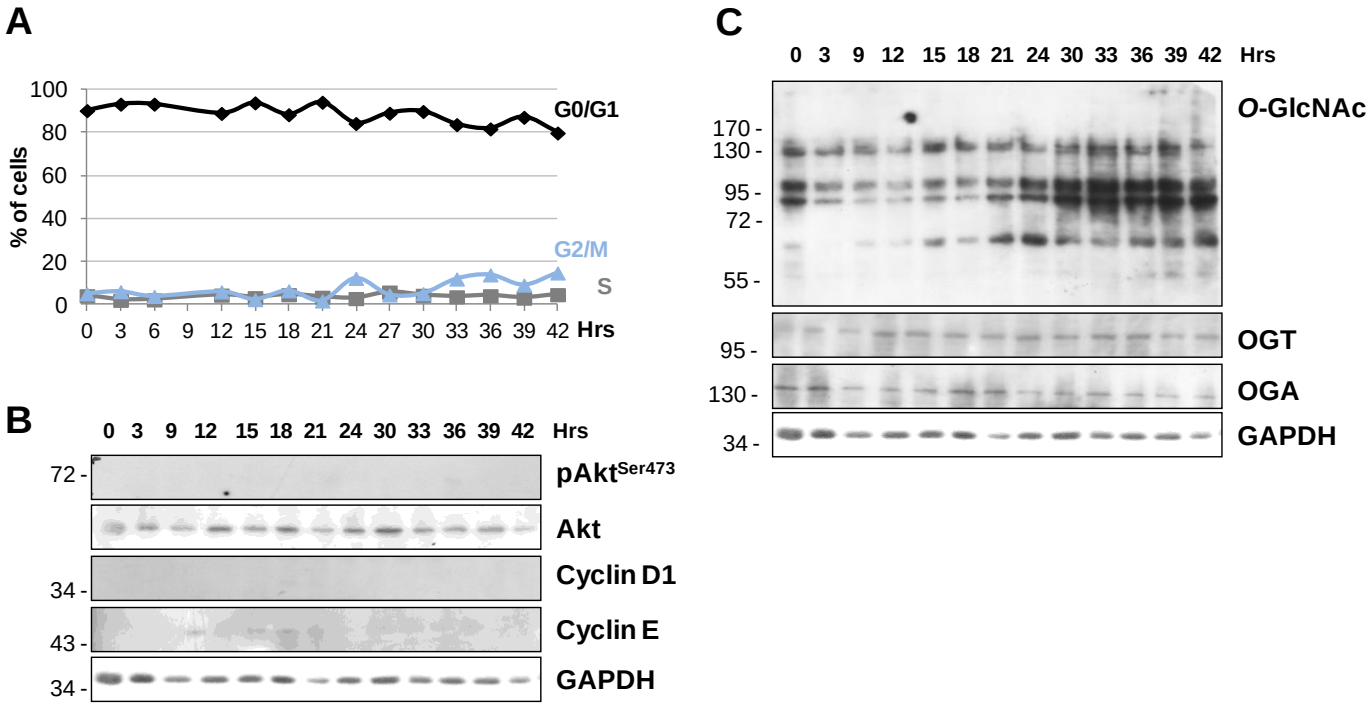
II. Mise en évidence de la dynamique de *O*-GlcNAcylation au cours de la progression du cycle cellulaire induite par les facteurs mitogènes du sérum

2.1. Analyse de la *O*-GlcNAcylation des protéines au cours du cycle cellulaire

Après avoir déterminé les paramètres cinétiques du cycle cellulaire des MCF7 sevrées puis stimulées par le sérum, nous avons examiné le niveau de *O*-GlcNAcylation lors de la progression des cellules dans le cycle.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 33A, la *O*-GlcNAcylation augmente de plus de 50% lors de l'entrée des cellules en phase G1 (0 à 3 h) et reste élevée lorsque les cellules progressent dans cette phase. Le niveau des protéines *O*-GlcNAcylées diminue nettement dans la phase S (de 15 à 21 h), puis augmente d'un facteur 3 à 4 pendant les phases G2 et M (27 à 30 h) **(Figure 33A et B)**.

Les protéines *O*-GlcNAcylées ont également été détectées après séparation par électrophorèse 2D, pour les temps 0 (G0/G1), 3 h (début G1), 12 h (fin G1), 15 h (début S), 18 h (S) et 24 h (S/G2).



<u>Figure 34.</u> Effet de la wortmannine sur le cycle cellulaire et la dynamique de *O*-GlcNAcylation dans les cellules MCF7

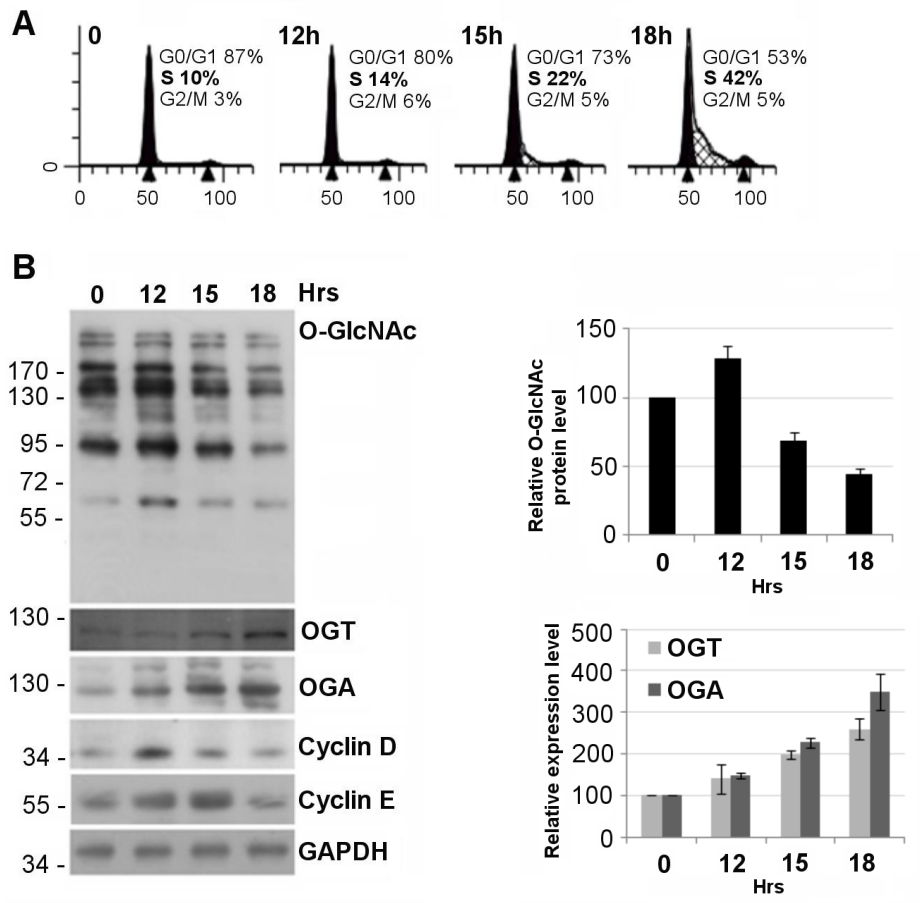
Les cellules MCF7 quiescentes stimulées par le sérum en présence de wortmannine (10 nM) sont analysées par cytométrie en flux ou les lysats cellulaires totaux sont préparés. **A,** Pourcentage des cellules dans chacune des phases du cycle cellulaire après l'analyse en cytométrie en flux des cellules marquées à l'iodure de propidium. **B,** Immunorévélations de la forme phosphorylée et totale de la protéine AKT, des cyclines D1 et E. **C,** Immunorévélations des protéines *O*-GlcNAc, de l'OGT et de l'OGA et de la GAPDH.

La séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique puis de leur masse moléculaire permet de détecter le niveau de *O*-GlcNAcylation spot par spot et d'observer ainsi de fines variations de cette MPT sur des protéines particulières, au cours des différentes phases du cycle cellulaire des cellules MCF-7.
Les mêmes tendances de variations pour certains spots (□) sont observées, c'est-à-dire une hausse en G1 (aux temps 3 et 12 h) suivie d'une baisse en S (aux temps 15 et 18 h), puis de nouveau une augmentation à la transition G2/M (au temps 24 h) **(Figure 33C)**. Cependant, pour d'autres spots (►), le niveau de *O*-GlcNAcylation est stable en G1, diminue transitoirement en début de S pour devenir très intense lors de la transition S/G2 (aux temps 18 et 24 h). D'autres spots (□) présentent un niveau de *O*-GlcNAcylation très faible voire invisible en phase G1 et début de S, qui n'augmente qu'à la transition G2/S (aux temps 18 et 24 heures).

Malgré une tendance globale de la baisse du niveau *O*-GlcNAc que nous observons à la transition G1/S, l'analyse fine des variations de *O*-GlcNAcylation par électrophorèse 2D montre que la balance *O*-GlcNAc de certains spots est régulée différemment entre les phases G0, G1, S et G2/M.

2.2. Effet de l'inhibition de la voie PI3K/AKT sur le cycle cellulaire et sur la balance *O*-GlcNAc

Parmi les voies de signalisation requises pour l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire, la voie PI3K/AKT est essentielle **(Figure 13,** §2.2.3). Comme le montrent clairement les résultats de l'analyse en cytométrie en flux **(Figure 34A)**, les cellules traitées à la wortmannine ne progressent pas dans le cycle cellulaire et restent bloquées en phase G0/G1 même après 42 heures de traitement, contrairement à la condition contrôle (sérum sans wortmannine, **Figure 34A**). L'inhibition de la PI3K par la wortmannine est confirmée par l'inactivation d'Akt, comme le montrent les immunorévélations avec les anticorps anti-phosphoAkt et anti-Akt (forme totale) présentées dans la figure 34A. De plus, le blocage des cellules en G0/G1 est confirmé par l'absence de détection par Western blot de l'induction des cyclines D1 et E qui sont indispensables à la progression des cellules dans les phases G1 et G1/S **(Figure 34A).**



<u>Figure 35.</u> La dynamique de la *O*-GlcNAcylation est régulée à la transition G1/S

Les cellules quiescentes MCF7 stimulées par le sérum sont analysées par cytométrie en flux et les lysats totaux par Western blot. **A,** Pourcentage des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire après analyse en cytométrie en flux des cellules marquées à l'iodure de propidium **B,** Immunorévélations des protéines *O*-GlcNAcylées, de l'OGA, de l'OGT, des cyclines D et E, et de la GAPDH (témoin de charge). Les valeurs moyennes et écart-types sont obtenus à partir de 3 manipulations indépendantes.

Nos résultats sont en accord avec ceux de la littérature qui indiquent que l'inhibition de la voie PI3K/AKT empêche la synthèse et l'accumulation de la cycline D bloquant ainsi la réponse mitogénique (Lobenhofer et *al.,* 2000 ; Muise-Helmericks *et al.,* 1998). Ils confirment donc que la voie PI3K/AKT est essentielle pour l'induction des cyclines précoces et pour la reprise du cycle cellulaire induite par le sérum dans les cellules MCF7 (§2.2.3).
De plus, les variations phases-dépendantes du niveau global de *O*-GlcNAcylation précédemment observées **(Figure 33A)** sont complètement perturbées en présence de wortmannine, puisqu'une augmentation significative de *O*-GlcNAcylation est détectée à partir de 24 heures et reste soutenue jusqu'au dernier temps analysé (42 h) **(Figure 34C)**. Un lien étroit entre la dynamique de *O*-GlcNAcylation et la voie PI3K/AKT sous stimulation par l'insuline a déjà été mise en évidence (Yang *et al.,* 2008). Nos résultats suggèrent qu'une telle connexion existe aussi lors de la reprise du cycle cellulaire suite à une stimulation par le sérum, ceci reste néanmoins à approfondir.

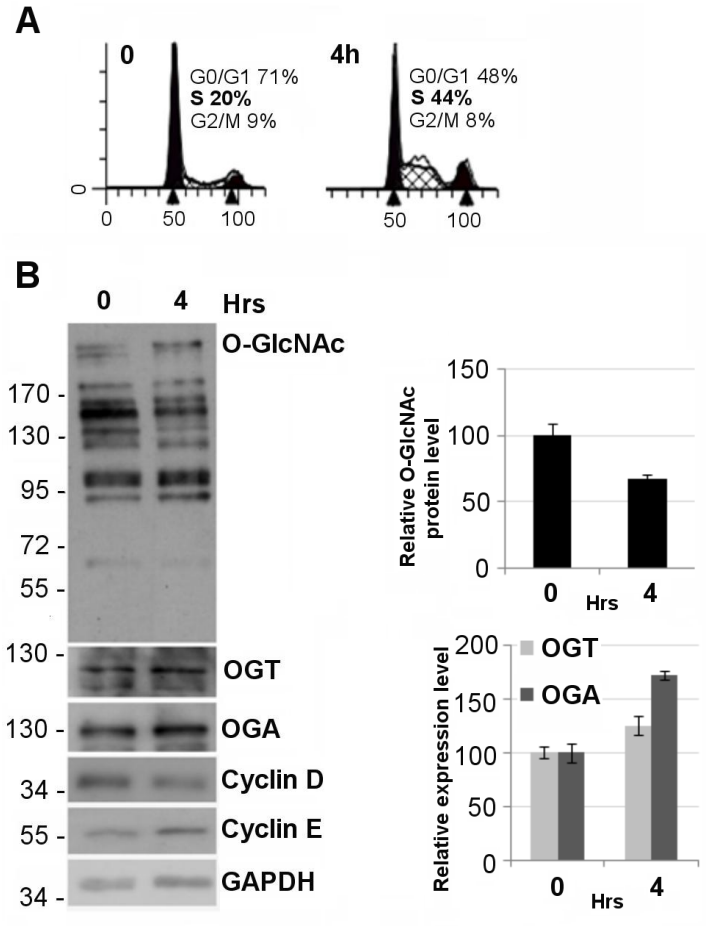
III. Etude de la dynamique de *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S

Ces premiers résultats mettent en évidence que la reprise du cycle cellulaire de cellules MCF7 quiescentes stimulées par les facteurs mitogènes du sérum entraîne des variations du niveau global de *O*-GlcNAcylation qui sont dépendantes des différentes phases du cycle cellulaire. C'est pourquoi nous avons décidé de nous intéresser plus particulièrement à la chute de la *O*-GlcNAcylation lors de l'entrée des cellules en phase S.

3.1 Etude de la balance *O*-GlcNAc entre les phases G1 et S dans les cellules MCF7 synchronisées

Afin de mieux caractériser la dynamique de *O*-GlcNAcylation lors de la transition G1/S nous avons étudié l'expression protéique de l'OGT et de l'OGA, enzymes responsables de la dynamique de *O*-GlcNAcylation.

Comme le montre la figure 35, la diminution du niveau global de *O*-GlcNAcylation (plus de 50%) en phase S est corrélée à une augmentation protéique à la fois de l'OGT et de l'OGA. L'augmentation est plus marquée pour l'OGA, son expression s'élève jusqu'à 350% au



<u>Figure 36.</u> Dynamique de *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S après synchronisation des cellules MCF7 par l'hydroxyurée

Les cellules MCF7 sont synchronisées à la transition G1/S par un double blocage à l'hydroxyurée. Après traitement les cellules sont arrêtées (0) ou relâchées dans le cycle cellulaire pendant 4 heures. **A,** La synchronisation des cellules en G1/S et la reprise du cycle cellulaire ont été vérifiée par cytométrie en flux **B,** Détection par immunoblot à partir des extraits totaux des protéines *O*-GlcNAcylées, de l'OGT, l'OGA, des cyclines D et E et de la GAPDH. Les valeurs moyennes et écart-types sont obtenus à partir de 3 manipulations indépendantes.

lieu de 250% pour l'OGT dans les cellules en phase S comparée aux cellules quiescentes **(Figure 35B)**.

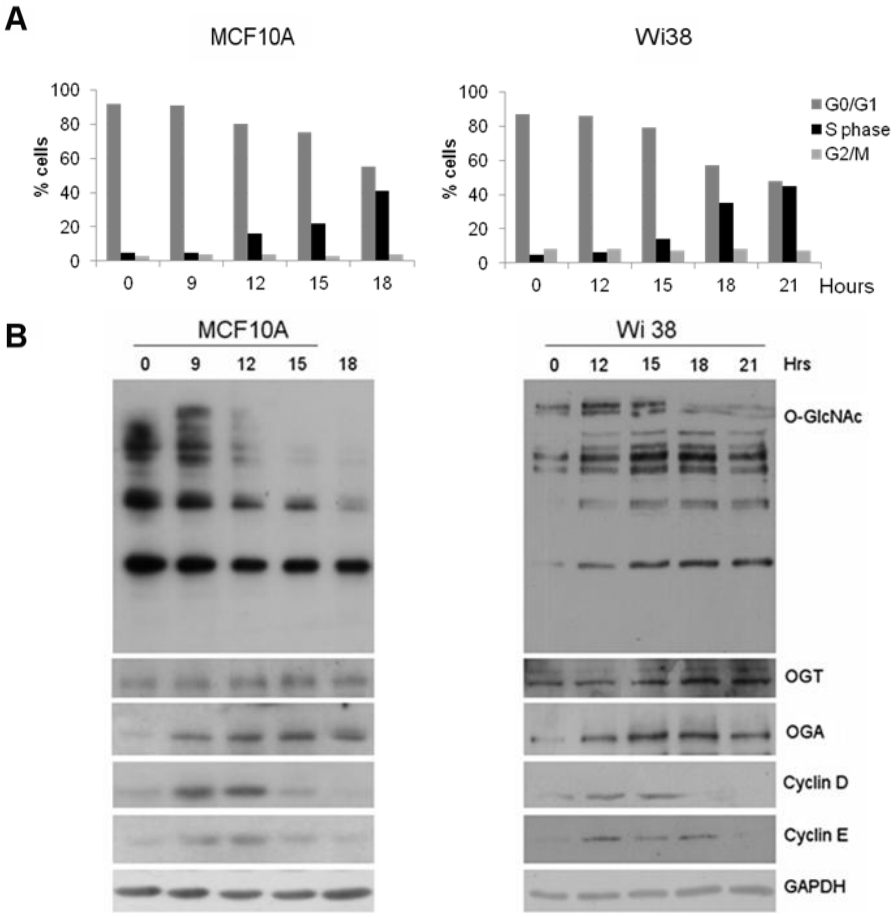
Ces résultats révèlent donc que suite à une activation des voies de signalisation mitogènes, l'entrée et la progression dans les phases G1 et S du cycle cellulaire entraînent des variations importantes de la *O*-GlcNAcylation **(Figure 33A)** associés à des changements d'expression de l'OGA et de l'OGT **(Figure 35B)**.

3.2 Etude de la dynamique de *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S après synchronisation des cellules MCF7 par l'hydroxyurée

Nous avons ensuite utilisé l'hydroxyurée (HU) afin de vérifier si nous observions les mêmes résultats avec une seconde méthode de synchronisation. L'HU est un inhibiteur de la ribonucleotide réductase, enzyme qui catalyse la formation des dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates)*. Le pool de dNTPs n'étant plus assez important en présence d'HU, la progression de la fourche d'élongation va être ralentie entraînant l'apparition d'ADN simple brin. La présence d'ADN simple brin va alors activer le checkpoint de la phase S, aboutissant à un blocage de la synthèse de l'ADN (Koç *et al.*, 2004 ; Alvino *et al.*, 2007) (**Figure 8**, §1.3.1.2).

Les cellules MCF7 sont synchronisées à la transition G1/S suite à un double blocage à l'HU puis relâchées dans le cycle cellulaire par élimination de l'HU dans le milieu de culture (§1.2 'matériels & méthodes'). La reprise du cycle cellulaire est confirmée par l'analyse en cytométrie en flux, comme indiqué par le pourcentage des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire sur l'histogramme en figure 36A.

La progression des cellules en phase S, suite au traitement à l'HU, est associée à une diminution de 30% du niveau global de *O*-GlcNAcylation **(Figure 36B)**. Cette diminution semble être davantage protéines-spécifiques par rapport à la synchronisation par sevrage, et affecte surtout les protéines de haut poids moléculaire. Ceci est probablement lié à la méthode de synchronisation utilisée car l'HU inhibe un processus particulier, la réplication de l'ADN, alors que la privation de sérum affecte différentes voies de signalisation et du métabolisme nécessaires à l'entrée et à la progression des cellules dans le cycle cellulaire.



<u>Figure 37.</u> Dynamique de la *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S dans les cellules MCF10A et Wi38.

Les cellules MCF10A et Wi38 quiescentes sont stimulées à entrer dans le cycle cellulaire par addition de facteurs mitogènes. **A,** Analyse par cytométrie en flux de la distribution des cellules dans les phases G0/G1, S et G2/M après marquage à l'iodure de propidium. **B,** Western blots des extraits totaux réalisés avec des anticorps dirigés contre les protéines *O*-GlcNAcylées, l'OGT, l'OGA, les cyclines D et E, et la GAPDH.

Cependant, le niveau protéique de l'OGT et de l'OGA augmente respectivement de 25 et 72% dans les cellules en phase S comparées aux cellules bloquées en G1/S **(Figure 36B)**. Cette augmentation protéique à la fois pour l'OGT et l'OGA est comparable à celle observée pour les temps 15 et 18 h après stimulation par le sérum **(Figure 35B)**.

L'ensemble de nos résultats indique que la chute du niveau global de *O*-GlcNAcylation observée lors de l'entrée des cellules en phase S est associée à une augmentation de l'expression de l'OGT et de l'OGA, plus marquée pour l'enzyme OGA.

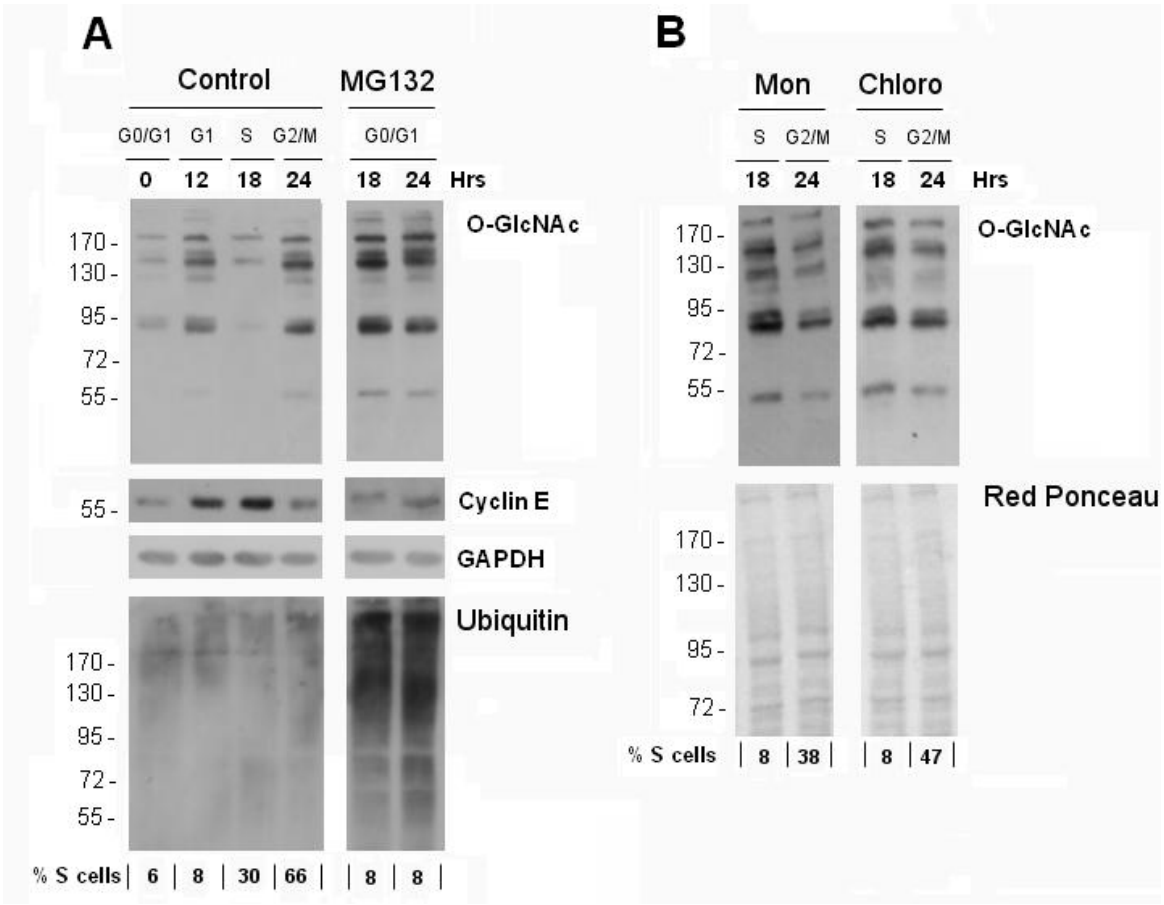
3.3 Etude de la dynamique de la *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S dans les cellules épithéliales mammaires normales MCF10A et les fibroblastes Wi38

Nous avons ensuite réalisé la même expérience sur des cellules épithéliales mammaires non cancéreuses, les cellules MCF10A, et sur des fibroblastes de poumons humains, les cellules Wi38.

Comme pour les cellules MCF7, les cellules MCF10A et Wi38 ont été synchronisées en G0/G1 par privation de sérum pendant respectivement 24 et 48 h, puis stimulées par l'ajout de facteurs mitogènes ou de sérum dans le milieu de culture pendant 12 h, 15 h et 18 h. La proportion des cellules dans chaque phase du cycle cellulaire a été analysée par cytométrie en flux sur les cellules préalablement marquées à l'iodure de propidium (§III 'Matériels & Méthodes') **(Figure 37A)**. L'entrée en phase S se fait entre 9 et 12 heures après stimulation pour les cellules MCF10A et entre 15 et 18 heures pour les cellules Wi38 **(Figure 37A)**.

Pour ces 2 lignées cellulaires, les variations du niveau de *O*-GlcNAcylation au cours de la reprise du cycle cellulaire sont similaires à celles observées précédemment dans les cellules MCF7. En effet, lorsque les cellules MCF10A et Wi38 progressent en G1, le niveau global de *O*-GlcNAcylation est augmenté par rapport aux cellules quiescentes **(Figure 37B)**. Puis, l'entrée et la progression des cellules MCF10A et Wi38 en phase S est associée à une baisse plus ou moins marquée des protéines *O*-GlcNAcylées et à une augmentation de l'OGT et de l'OGA **(Figure 37B)**.

Au vu des résultats obtenus sur les 3 lignées cellulaires MCF7, MCF10A et Wi38, il semble que la chute du niveau de *O*-GlcNAcylation lors de l'entrée et de la progression des cellules en phase S soit indépendante du phénotype cellulaire (normal *versus* cancéreux, et épithélial *versus* fibroblastique).



<u>Figure 38.</u> Effet de différents inhibiteurs de la dégradation des protéines sur la dynamique de *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S

Les cellules MCF7 quiescentes sont stimulées par l'ajout de 10% de sérum dans le milieu. La distribution des cellules dans le cycle cellulaire est contrôlée, aux différents temps indiqués, par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium. Douze heures après la stimulation, les cellules sont traitées avec **(A)** 6µM MG132 (inhibiteur de dégradation protéasomale)**, (B)** 2µM Monensine (**Mon**) ou 10µM Chloroquine (**Chloro**) (inhibiteurs de la dégradation lysosomale). A partir des extraits cellulaires totaux, détection par Western-Blot des protéines *O*-GlcNAcylées (RL2), de la cycline E, de la GAPDH et des protéines ubiquitinylées (anti-polyUbiquitine).

Comme précédemment démontré lors de la transition G2/M (Dehennaut *et al.*, 2007 ; Slawson *et al.,* 2005), nos résultats indiquent que la dynamique de *O*-GlcNAcylation des protéines est également modifiée lors de transition G1/S du cycle cellulaire de cellules somatiques.

3.4. Effet d'inhibiteurs de la dégradation des protéines sur la dynamique de *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la progression du cycle cellulaire est notamment orchestrée par la dégradation protéasomale des protéines-clés (Nakayama & Nakayama, 2006) (§1.2.4, **Figure 6**). De plus, la dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome est connue pour être inhibée par la *O*-GlcNAcylation (§3.5.2)**.** Nous avons donc voulu déterminer si l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation observée lors de la progression en G1 ne correspondait pas à une protection contre la dégradation protéasomale des protéines cibles et si la diminution du niveau *O*-GlcNAc en phase S n'était pas due à une dégradation protéasomale de ces protéines, en supposant qu'elles soient préalablement déglycosylées.

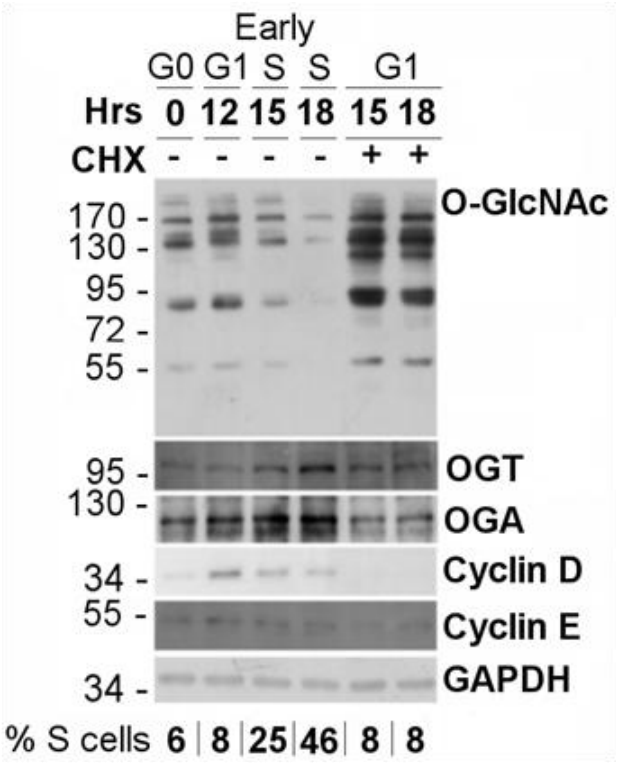
Nous avons aussi utilisé deux inhibiteurs de la dégradation lysosomale, la monensine et la chloroquine, car il a été montré que l'activité lysosomale est plus importante en fin de phase G1 et qu'elle diminue au milieu de la phase S (Quintart *et al.,* 1979). Ces 2 drogues interfèrent avec la dégradation lysosomale en altérant le pH intravésiculaire des lysosomes (Ashfaq et *al.,* 2011 ; Ippoliti *et al.,* 1998).

Etant donné que la baisse de *O*-GlcNAcylation a lieu lors de l'entrée en phase S (15 h après stimulation par le sérum), nous avons décidé d'ajouter les inhibiteurs de dégradation protéique lorsque les cellules sont en phase G1, soit 12 heures après la stimulation par le sérum. Comme le montre le Western blot dans la figure 38A, le traitement des cellules par le MG132 inhibe bien la dégradation protéasomale car on observe une accumulation des protéines polyubiquitinylées dans les cellules traitées par rapport aux cellules non traitées **(Figure 38)**. De plus, l'ajout de MG132 au temps 12 h bloque les cellules en phase G1 (Zhang *et al.,* 2008). En effet le pourcentage des cellules en phase S reste stable aux temps 18 et 24 heures, contrairement aux cellules non traitées pour lesquelles on obtient 66% de cellules en phase S après 24 h de stimulation **(Figure 38A)**. De plus, comme nous pouvons l'observer sur la figure 38A, ce traitement augmente le niveau global de *O*-GlcNAcylation aux temps 18 et 24 heures, comparé aux cellules non traitées.

Cette hausse peut être une conséquence du stress cellulaire engendré par le MG132 car il est connu que le niveau de *O*-GlcNAcylation augmente en réponse à divers stress (Zachara *et al.*, 2004). Par ailleurs, il est aussi très probable que l'absence de la chute du niveau de *O*-GlcNAcylation au temps 18 h en présence de MG132 résulte du blocage des cellules en phase G1 (Han & Park, 2010). Des manipulations complémentaires sont nécessaires pour éclaircir ce point.

L'inhibition de la dégradation lysosomale par la monensine ou la chloroquine dans les cellules MCF7 en G1 entraîne un ralentissement marqué de l'entrée des cellules en phase S. En effet, 18 h après stimulation par le sérum, seulement 8% des cellules traitées par chacun de ces 2 inhibiteurs sont en phase S alors qu'au même temps 30 % des cellules non traitées sont accumulées dans cette phase **(Figure 38B)**. De manière intéressante, nous pouvons observer que l'entrée tardive en phase S des cellules traitées par la monensine ou la chloroquine est parfaitement corrélée à une diminution des protéines *O*-GlcNAcylées **(Figure 38B)**. Ces observations indiquent que les variations de la *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S ne dépendent pas de la voie de dégradation lysosomale puisque son inhibition par la monensine ou la chloroquine ne les perturbe pas.

En conclusion, les résultats obtenus avec le MG132 confirment que la dégradation protéasomale de protéines spécifiques en phase G1 est indispensable à l'entrée des cellules en phase S (Diehl & Ponugoti, 2010). Ils nous indiquent également que les variations de la balance *O*-GlcNAc que nous avons observées dans les cellules MCF7 stimulées 18 h par le sérum **(Figure 35A)** sont inhérentes à la progression des cellules vers la phase S. Les résultats que nous avons obtenus avec les inhibiteurs de la dégradation lysosomale renforcent une fois de plus cette idée et indiquent que cette baisse est indépendante de la dégradation des protéines *O*-GlcNAcylées *via* la voie lysosomale.



<u>Figure 39.</u> La cycloheximide inhibe l'expression protéique de l'OGT et de l'OGA induite par le sérum au cours de la transition G1/S des cellules MCF7

Les cellules quiescentes MCF7 sont stimulées par le sérum et arrêtées 12, 15 et 18 heures après stimulation. Les cellules sont traitées avec la cycloheximide (10µg/mL) 12 h après l'ajout du sérum. La progression des cellules dans cycle cellulaire est analysée par cytométrie en flux (Le pourcentage des cellules en phase S est indiqué). Parallèlement, les protéines *O*-GlcNAcylées, l'OGT, l'OGA, les cyclines D et E et la GAPDH sont détectées par Western blot.

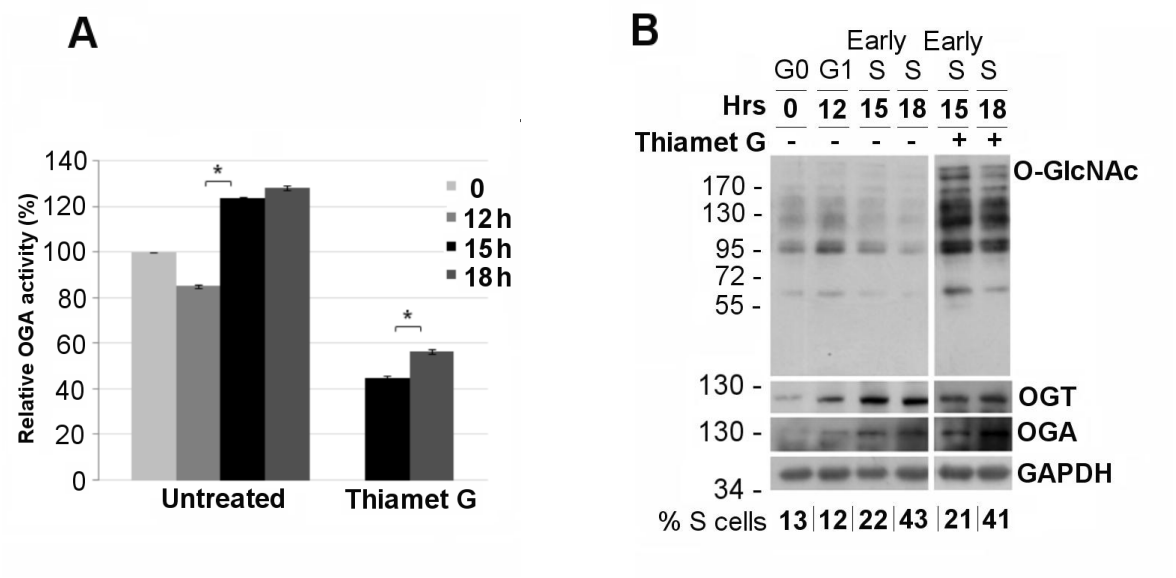
IV. Etude du couple OGT/OGA à la transition G1/S

4.1 Effet de la cycloheximide sur l'expression de l'OGT et de l'OGA dans les cellules en phases G1 et S du cycle cellulaire

Afin de déterminer si l'augmentation progressive de l'OGT et de l'OGA au cours de la progression des cellules à travers la transition G1/S **(Figure 35B)** est dépendante d'une régulation de leur traduction, nous avons traité les cellules MCF7 en G1 par la cycloheximide (CHX), un inhibiteur de la synthèse protéique (Kay & Korner, 1966).

L'analyse par cytométrie en flux montre que l'ajout du CHX 12 h après la stimulation par le sérum empêche la progression des cellules MCF7 vers la phase S **(Figure 39).** Ce résultat est en accord avec l'inhibition de l'expression de la cycline D qui est normalement induite suite à une stimulation par le sérum (Winston & Pledger, 1993). En présence de CHX, aucune variation du niveau protéique de l'OGT et de l'OGA n'est observée par rapport aux cellules quiescentes **(Figure 39)**, suggérant fortement que la synthèse de l'OGT et de l'OGA est induite lors de la progression des cellules en phase G1. La quantification du taux de transcrits de l'OGT et de l'OGA déterminée par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en temps réel révèle que l'induction de leur synthèse protéique en phase G1 n'est pas corrélée à une augmentation de leur taux de transcrit *(Data not shown)*.

De plus, les cellules bloquées en phase G1 par la CHX présentent un niveau global de *O*-GlcNAcylation plus élevé que celui observé dans les cellules non traitées **(Figure 39**, temps 15 h et 18 h). Cette observation suggère que l'expression différentielle de l'OGT et l'OGA régule la dynamique de *O*-GlcNAcylation à la transition G1/S. Cependant, il a été montré qu'un traitement par la CHX dans des cellules privées de glucose entraîne une augmentation du niveau global de *O*-GlcNAcylation (Kang *et al.,* 2009). Il n'est donc pas exclu que l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation que nous observons en présence de CHX soit indépendante de l'arrêt dans le cycle cellulaire. De plus, comme dans le cas du MG132, la CHX peut également induire un stress cellulaire qui provoquerait une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation, comme cela a été montré dans plusieurs lignées cellulaires (COS, CHO, HeLa) en réponse à différents stress (éthanol, stress oxydatif, choc thermique) (Zachara *et al.,* 2004).



<u>Figure 40.</u> L'activité de l'OGA endogène est augmentée à la transition G1/S.

Les cellules MCF7 synchronisées en G0/G1 par 48 h de sevrage sont ensuite stimulées par le sérum puis arrêtées aux différents temps indiqués. Douze heures après stimulation par le sérum, les cellules sont traitées ou non par l'inhibiteur de l'OGA, le Thiamet G (100 nM). **A,** La mesure de l'activité de l'OGA endogène est effectuée en présence du substrat le pNP-GlcNAc comme décrit dans la partie 'Matériels & Méthodes'. L'activité de l'OGA dans les cellules quiescentes représente 100% de son activité. Les écart-types ont été obtenus à partir de 3 expériences indépendantes (*, $p<0.05$ test *t* de Student). **B,** Western blots réalisés avec des anticorps dirigés contre les protéines *O*-GlcNAcylées, l'OGT, l'OGA et la GAPDH. Le pourcentage des cellules dans chaque phase déterminé par cytométrie en flux est reporté pour chaque condition expérimentale.

Le niveau élevé de O-GlcNAcylation observé en présence de ces deux drogues, le MG132 et la CHX, pourrait donc être une conséquence de l'état physiologique stressé de la cellule, indépendamment du cycle cellulaire **(Figures 39A et 40).**

4.2. Dosage de l'activité de l'OGA endogène à la transition G1/S

Nous avons ensuite mesuré *in vitro* l'activité de l'OGA endogène afin de déterminer si la chute du niveau de *O*-GlcNAcylation des protéines à la transition G1/S était corrélée à une modulation de son activité.

Pour cela, nous avons mesuré l'activité de l'OGA endogène en présence du substrat pNP-GlcNAc à pH 6,5 pour limiter l'action des hexosaminidases A et C, dont l'activité est optimale à pH acide. Cette activité est réalisée *in vitro* à partir d'échantillons frais traités ou non avec 100 nM de Thiamet G (TG), un inhibiteur spécifique de l'OGA (Yuzwa *et al.,* 2008). L'activité spécifique de l'OGA est obtenue en soustrayant l'activité de l'OGA mesurée dans les cellules traitées au TG de celle obtenue à partir de cellules non traitées (§V 'Matériels & Méthodes). Comme le montre la figure 40A, l'activité hydrolase de l'OGA endogène augmente significative de 30% dans les cellules qui entrent et progressent en phase S **(Figure 40A)**, en corrélation avec la diminution des protéines *O*-GlcNAcylées après 15 et 18 h de stimulation par le sérum **(Figures 40B**). L'augmentation de l'activité de l'OGA en phase S reflète probablement l'augmentation de son expression protéique précédemment observée par Western blot **(Figure 35).**

Nous avons aussi voulu mesurer l'activité *in vitro* de l'OGT par radioactivité à partir d'échantillon frais. L'activité de l'OGT peut être quantifiée par mesure de l'incorporation d'UDP-GlcNAc tritié, substrat de l'OGT, sur un peptide synthétique tel que la séquence YSDSPSTST provenant de la caséine kinase II (Lefebvre *et al.,* 2012 *in press*). Ce test *in vitro* est utilisé le plus souvent à partir d'OGT recombinante isolée et d'une protéine ou peptide-substrat accepteur. Malgré les nombreux essais, après incubation des extraits cellulaires avec de l'UDP-[^{3}H]-GlcNAc, nous n'avons pas été en mesure de détecter une incorporation de radioactivité suffisante et spécifique du marquage du peptide-substrat accepteur rajouté dans l'échantillon par l'OGT endogène (immunoprécipitée ou non) présente dans le lysat protéique des cellules MCF7.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu déterminer l'importance de l'activité de l'OGA pour le passage des cellules en phase S. Pour cela, les cellules synchronisées en G1 ont été traitées par le TG, 12 heures après stimulation par le sérum.

Le traitement des cellules par le TG entraîne une diminution de 60% de l'activité de l'OGA **(Figure 40A)** et induit une augmentation du niveau global de *O*-GlcNAcylation d'un facteur 2 **(Figure 40B)**. En revanche, le TG n'a pas d'effet sur la progression du cycle cellulaire, comme le montrent les pourcentages de cellules en phase S reportés sur la figure 40B. Or, dans les cellules traitées au TG, nous observons malgré tout une diminution du niveau global de *O*-GlcNAcylation au temps 18 h (41% cellules en phase S) concomitante à une augmentation faible mais significative de 20% de l'activité de l'OGA **(Figure 40)**.

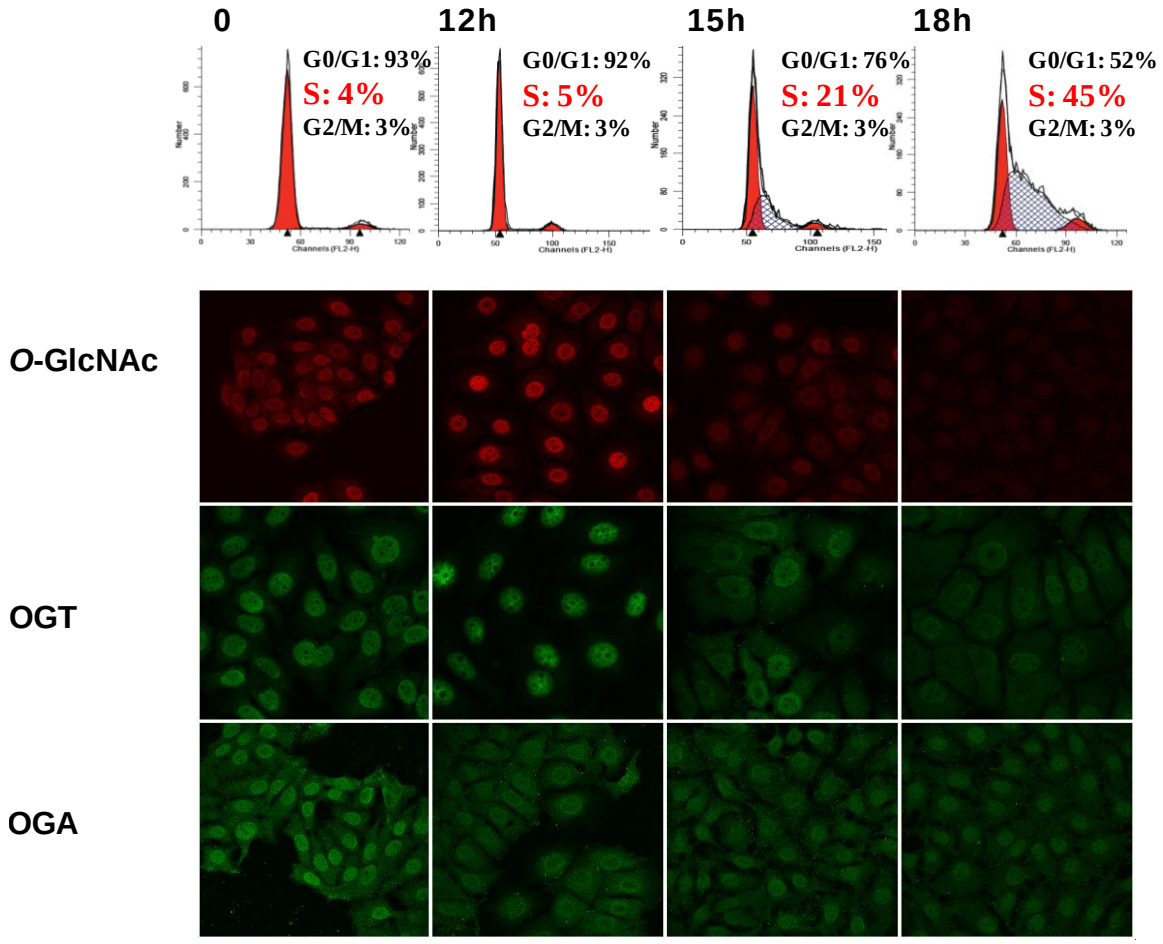
Ceci pourrait s'expliquer par l'effet biologique du TG sur le niveau protéique de l'OGT et l'OGA. En effet, le traitement au TG induit une augmentation significative du niveau protéique de l'OGA et affecte l'augmentation de l'OGT par rapport aux cellules contrôles **(Figure 40B)**. Cette observation avait déjà été faite dans des cellules HeLa traitées avec la PUGNAc ou le GlcNAc-thiazoline, deux autres inhibiteurs de l'OGA (Slawson *et al.,* 2005 ; Slawson *et al.,* 2008). Ces résultats indiquent que l'inhibition pharmacologique de l'OGA n'affecte pas la progression du cycle cellulaire, en accord avec de précédents résultats obtenus dans les cellules HeLa traitées au GlcNAc-thiazoline (Slawson *et al.,* 2008). Ces résultats soulignent également qu'en réponse à l'inhibition de l'activité de l'OGA endogène, les cellules compensent en induisant une augmentation de son expression protéique et en diminuant celle de l'OGT (Slawson *et al.,* 2005 ; Slawson *et al.,* 2008).

V. Etude de la localisation de l'OGT et l'OGA dans les phases précoces du cycle cellulaire

5.1. Détection par immunofluorescence en microscopie confocale

Afin de compléter notre étude de la dynamique de *O*-GlcNAcylation lors de la transition G1/S, nous avons analysé la localisation de l'OGT et de l'OGA endogènes, ainsi que des protéines *O*-GlcNAcylées, dans les cellules MCF7 quiescentes, en phase G1 et en phase S. Cette étude a été réalisée par immunofluorescence indirecte et les images ont été obtenues par microscopie confocale (en collaboration avec le Dr François Foulquier, UMR 8576, sur la plateforme d'imagerie BiCéFaL, IRI CNRS USR 3078).

La détection de l'OGT et de l'OGA a nécessité une optimisation des protocoles. Nous avons dû notamment augmenter le temps de perméabilisation (0,5% de Triton X-100 dans du PBS)

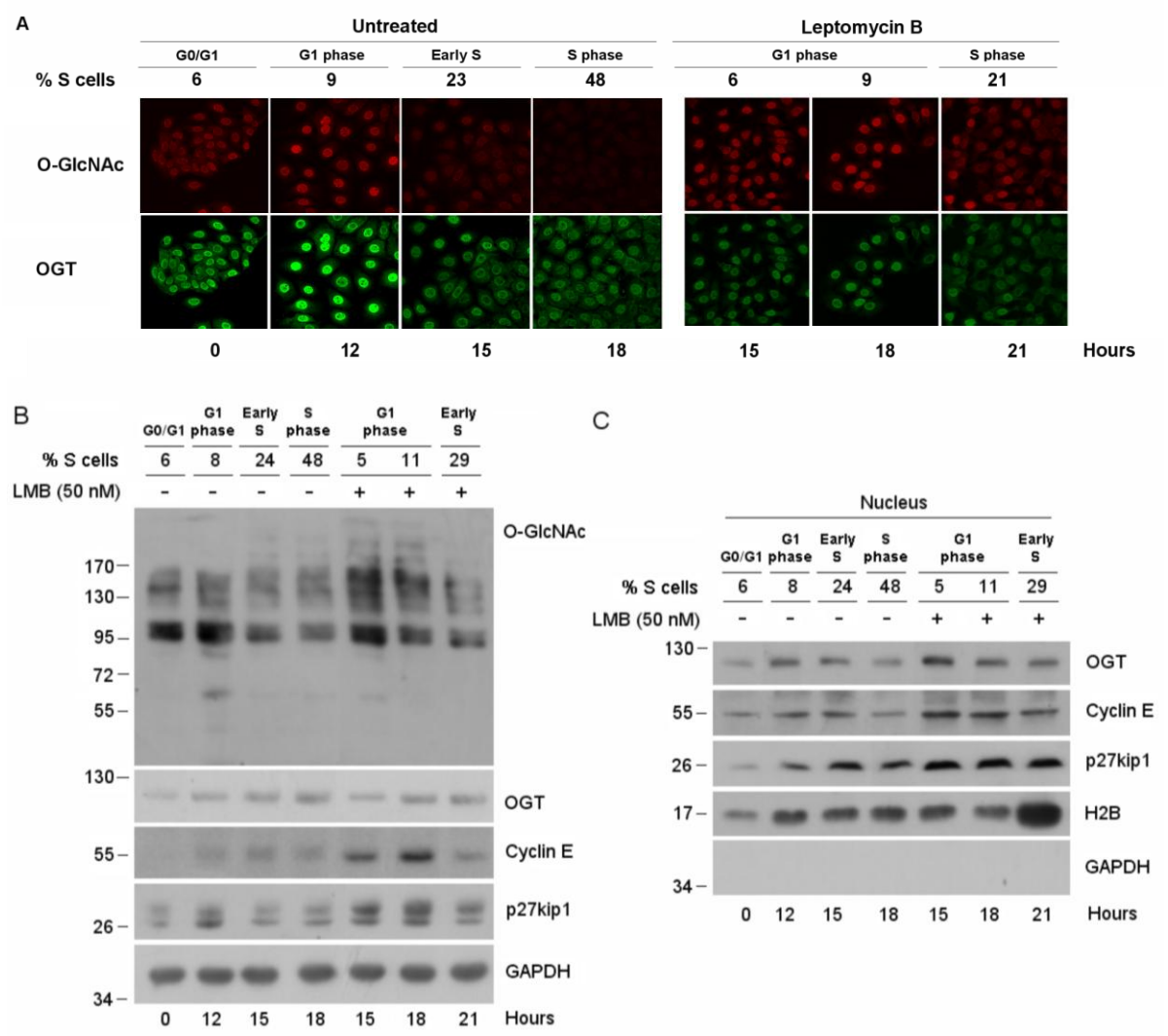


<u>Figure 41.</u> Localisation des protéines *O*-GlcNAcylées, de l'OGT et de l'OGA endogènes à la transition G1/S

Les cellules MCF7 quiescentes (temps 0) sont stimulées pendant 12, 15 ou 18 heures par le sérum. Pour chaque temps de stimulation, les cellules sont fixées, perméabilisées, puis incubées avec les anticorps indiqués. Le marquage immunofluorescent a été obtenu par microscopie confocale. En parallèle, l'analyse de la progression des cellules dans le cycle cellulaire a été vérifiée par cytométrie en flux.Le temps 12 h correspond à la phase G1, le temps 15 h à l'entrée en phase S et le temps 18 h à la phase S.

pour la détection de l'OGT. Nous avons commencé nos expériences avec un temps de perméabilisation de 5 minutes mais le marquage de l'OGT n'était présent qu'au niveau cytosolique. Connaissant sa localisation nucléocytoplasmique (§3.2.1, introduction *O*-GlcNAcylation), nous avons alors testé différents temps de perméabilisation afin de faciliter l'accès de l'anticorps aux différents compartiments subcellulaires. Après plusieurs essais, le temps optimal de perméabilisation s'est avéré être de 20 minutes. Les figures ci -dessous présentant la localisation de l'OGT ainsi que celles des protéines *O*-GlcNAcylées ont donc été obtenues à partir des cellules MCF7 perméabilisées pendant 20 minutes puis incubées avec l'anticorps anti- l'OGT ou anti-*O*-GlcNAc (§VI 'Matériels & Méthodes').
Nous avons ensuite utilisé le même protocole pour la détection de l'OGA que celui de l'OGT (§VI 'Matériels & Méthodes') mais le marquage obtenu était aspécifique (sans localisation précise). Afin de pallier à ce problème, nous avons testé plusieurs tampons de fixation des cellules (3% PAF ou 100% Méthanol) et différentes dilutions d'anticorps secondaire (Hilyte Fluor™ 488, du 1/600 au 1/1.000). Suite aux multiples essais, le meilleur marquage (spécificité et netteté) a été obtenu en fixant les cellules dans 100% méthanol et avec une dilution de l'anticorps secondaire au 1/1.000^{ème}.

Une fois les protocoles d'immunofluorescence optimisés, nous avons pu étudier la localisation des protéines *O*-GlcNAcylées, de l'OGT et de l'OGA dans les cellules MCF7 quiescentes, en phase G1 et en phase S. Dans les cellules quiescentes, les protéines *O*-GlcNAc, l'OGT et l'OGA sont localisées à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, avec cependant un marquage nucléaire prédominant **(Figure 41)**. Pour les protéines *O*-GlcNAc, le marquage nucléaire s'intensifie dans les cellules en phase G1 (12 h) puis, dès que les cellules entrent (15 h) et progressent (18 h) en phase S, on observe une nette diminution du marquage à la fois nucléaire et cytoplasmique **(Figure 41, ligne 1)**. Ces résultats sont en parfaite corrélation avec ceux obtenus par Western blot **(Figure 35)**.
De manière intéressante, le marquage fluorescent de l'OGT endogène reflète parfaitement celui des protéines *O*-GlcNAcylées. En effet, en phase G1, l'OGT est préférentiellement localisée dans le noyau puis le marquage nucléaire diminue progressivement lorsque les cellules entrent en phase S, concomitamment à une augmentation du marquage cytoplasmique **(Figure 41, ligne 2)**. En revanche, l'OGA est présente de manière homogène dans les deux compartiments cellulaires tout au long de la cinétique **(Figure 41, ligne 3)**.



<u>Figure 42.</u> Effet de la leptomycine B sur la balance *O*-GlcNAc et sur la localisation de l'OGT à la transition G1/S

Les cellules MCF7 quiescentes sont stimulées par le sérum puis arrêtées aux temps indiqués. Détection par marquage en immunofluorescence **(A)** et Western blots (**B)** des protéines *O*-GlcNAcylées et de l'OGT dans les cellules MCF7 traitées ou non avec 50 nM de LMB, 12 heures après stimulation par le sérum. La détection par Western blot de la Cycline E sert de marqueur de la transition G1/S et celle de p27kip1 de contrôle de l'efficacité de la LMB. La détection de la GAPDH et de l'histone H2B sert de marqueur de fractionnement respectivement de la fraction cytoplasmique et nucléaire. La proportion des cellules en phase S obtenue par cytométrie en flux est indiquée.

Ces résultats révèlent pour la première fois que durant les phases précoces du cycle cellulaire, la localisation des protéines *O*-GlcNAcylées et de l'OGT est différentiellement régulée dans les compartiments nucléaires et cytoplasmiques.

5.2 Effet de la leptomycine B sur la localisation subcellulaire de l'OGT entre les phases G1 et S

L'augmentation du marquage nucléaire de l'OGT observé par immunofluorescence peut être due à l'augmentation de sa synthèse protéique que nous avons mis en évidence précédemment (**Figure 39**, §4.1). Cette augmentation pourrait résulter également d'une translocation nucléaire transitoire de l'OGT, comme ce qui est connu pour certaines kinases telles que les MAPK **(Figure 41, ligne 2).** En effet, la kinase ERK par exemple est rapidement transloquée au noyau suite à sa phosphorylation activatrice par MEK (Lidke *et al.,* 2010 ; **Figure 12** dans §2.2.2), puis est exportée du noyau grâce à sa séquence NES (*Nuclear Export Signal*) (Adachi *et al.,* 2000). D'autres protéines sont transloquées dans le noyau grâce à leur séquence NLS telles que la protéine pRB (Zacksenhaus *et al.,* 1993) et l'inhibiteur p21Cip1 (Zhou *et al.,* 2001), ce qui pourrait être le cas pour l'OGT qui possède une séquence NLS putative (Lubas *et al.,* 1997). La présence d'une séquence de type NLS et/ou NES va faire appel au mécanisme actif d'import/export de la cellule.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé un inhibiteur réversible de l'export nucléaire, la leptomycine B (LMB) (Fornerod *et al.,* 1997). La LMB se lie à la protéine CRM-1 (*Chromosome Region Maintenance 1*) nécessaire à l'assemblage d'un complexe d'export nucléaire (Verhagen *et al.,* 2006), inhibant ainsi spécifiquement l'export nucléaire actif. Comme la diminution du marquage nucléaire de l'OGT est observé en phase S au temps 15 h, nous avons ajouté la LMB 12 h après la stimulation par le sérum, c'est à dire quand les cellules sont synchronisées en phase G1.

En premier lieu, nous avons vérifié l'activité inhibitrice de la LMB sur l'export nucléaire en confirmant par western-blot l'accumulation nucléaire de l'inhibiteur p27kip1 dans les cellules traitées à la LMB (Connor *et al.,* 2003) **(Figure 42C)**.

Il a été précédemment décrit que la LMB affecte réversiblement la progression du cycle cellulaire de cellules NIH 3T3 (fibroblastes de souris) et 3Y1 (fibroblastes de rat) (Tsuchiya A *et al.,* 2007 ; Yoshida *et al.,* 1990). De même, dans les cellules MCF7, l'analyse en cytométrie en flux montre que le traitement à la LMB retarde de 6 heures l'entrée des cellules en phase

S : 15 h après la stimulation au sérum, seulement 5% des cellules traitées à la LMB sont en phase S, comparés aux 24% de cellules non traitées, puis au temps 21 h, 29% de cellules traitées à la LMB se sont accumulées en phase S **(Figure 42A)**. Ceci est confirmé par la détection en Western blot de la cycline E **(Figure 42B,** WB cycline E**)**.

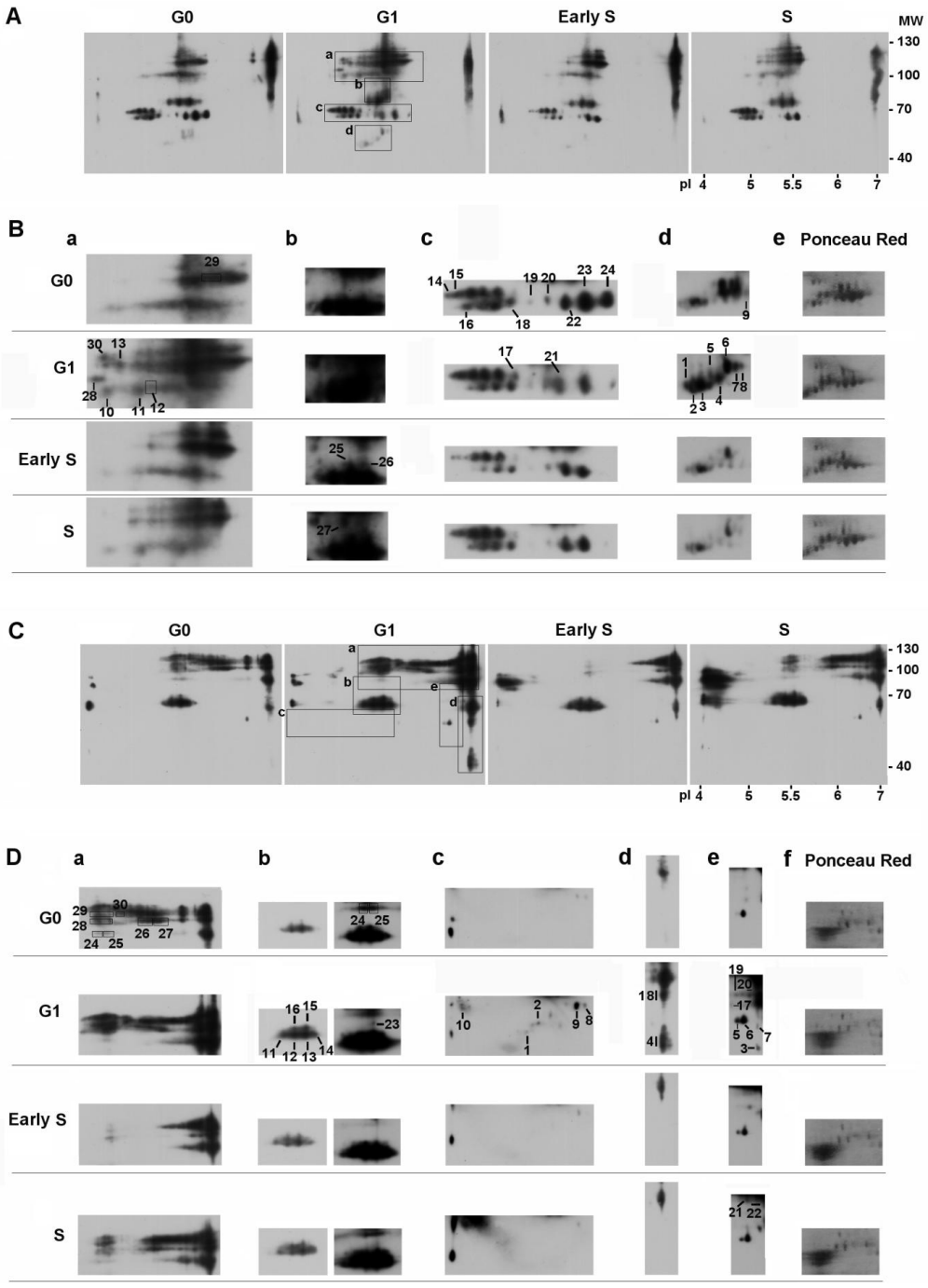
De façon très intéressante, nous observons par immunofluorescence que le marquage nucléaire des protéines *O*-GlcNAcylées et de l'OGT s'intensifie dans les cellules traitées 6 h à la LMB par rapport à la condition contrôle (temps 18 h pour les cellules traitées à la LMB *versus* temps 15 h pour les cellules non traitées, **Figure 42A).** Cependant, une fois que les cellules traitées à la LMB entrent en phase S avec un retard de 6 h (temps 21 h), l'intensité du marquage nucléaire des protéines *O*-GlcNAcylées et de l'OGT diminue et revient à un niveau comparable à celui obtenu au temps 15 h dans les cellules contrôles.

Nous avons également analysé par Western-blot l'effet de la LMB sur les variations du niveau global de *O*-GlcNAcylation et sur la localisation intracellulaire de l'OGT, à partir d'extraits cellulaires totaux **(Figure 42B)** et de la fraction nucléaire **(Figure 42C).** Sur les lysats totaux, nous observons que les variations des protéines *O*-GlcNAc dans les cellules traitées à la LMB sont comparables à celles obtenues dans les cellules contrôles, mais avec un décalage de 6 h, conformément au retard de l'entrée des cellules en phase S induit par la LMB (**Figure 42B**, WB *O*-GlcNAc). De plus, la LMB n'affecte pas l'expression protéique de l'OGT au cours de la progression dans le cycle cellulaire (**Figure 42B**, WB OGT).

Comme le montre la figure 42C, la détection par Western-blot de l'OGT dans la fraction nucléaire concorde parfaitement avec les résultats d'immunofluorescence : Le niveau nucléaire de l'OGT est significativement augmenté aux temps 15 h et 18 h en présence de LMB (phase G1), avant de diminuer au temps 21 h lorsque les cellules entrent en phase S.

Ces résultats préliminaires suggèrent donc que durant les phases précoces du cycle cellulaire, l'OGT transiterait entre les compartiments cytosolique et nucléaire. Une fois les cellules entrées en phase S, l'OGT serait exportée du noyau par un mécanisme actif d'export nucléaire, sensible à la LMB. Le mécanisme de l'import/export nucléaire de l'OGT à travers les étapes précoces du cycle cellulaire reste néanmoins à définir.

Par ailleurs, nos résultats d'IF mettent en évidence une superposition du marquage de l'OGT et des protéines *O*-GlcNAc au cours de la progression vers la phase S **(Figures 41 et 42A)**. Il semblerait que les changements de localisation de l'OGT régulés par la progression du cycle cellulaire lui permettent de glycosyler spécifiquement et rapidement des protéines cibles en allant se localiser directement dans le compartiment approprié.



<u>Figure 43.</u> Détection des protéines cytosoliques et nucléaires dont la *O*-GlcNAcylation est dépendante du cycle cellulaire

A partir de cellules MCF7 synchronisées dans le cycle cellulaire (phases G0, G1 et S), les extraits **(A)** cytoplasmiques et **(C)** nucléaires obtenus après fractionnement subcellulaire ont été séparés par électrophorèse 2D (strips pH 4-7, SDS-PAGE 8%) puis les protéines *O*-GlcNAc ont été détectées par Western blot à l'aide de l'anticorps RL2. Les régions d'intérêts dans lesquelles les spots ont été découpés et identifiés sont représentées sur le Western blot des cellules en G1. Agrandissement des régions d'intérêts pour la fraction cytoplasmique **B** (**a-d**) et nucléaire **D** (**a-e**) à partir d'expositions plus longues. Les spots numérotés sont ceux identifiés par MS/MS et les protéines correspondantes sont reportées dans les tableaux 1 (Fraction cytoplasmique) et 2 (Fraction nucléaire). **B, e** et **D, f** La coloration au rouge ponceau des différentes membranes de nitrocellulose sert de marqueur de charge. Les résultats sont représentatifs de 4 expériences obtenues à partir de 3 lysats cellulaires différents.

VI. Identification des protéines cytosoliques et nucléaires différentiellement *O*-GlcNAcylées à la transition G1/S

6.1 Profil global des protéines *O*-GlcNAc identifiées

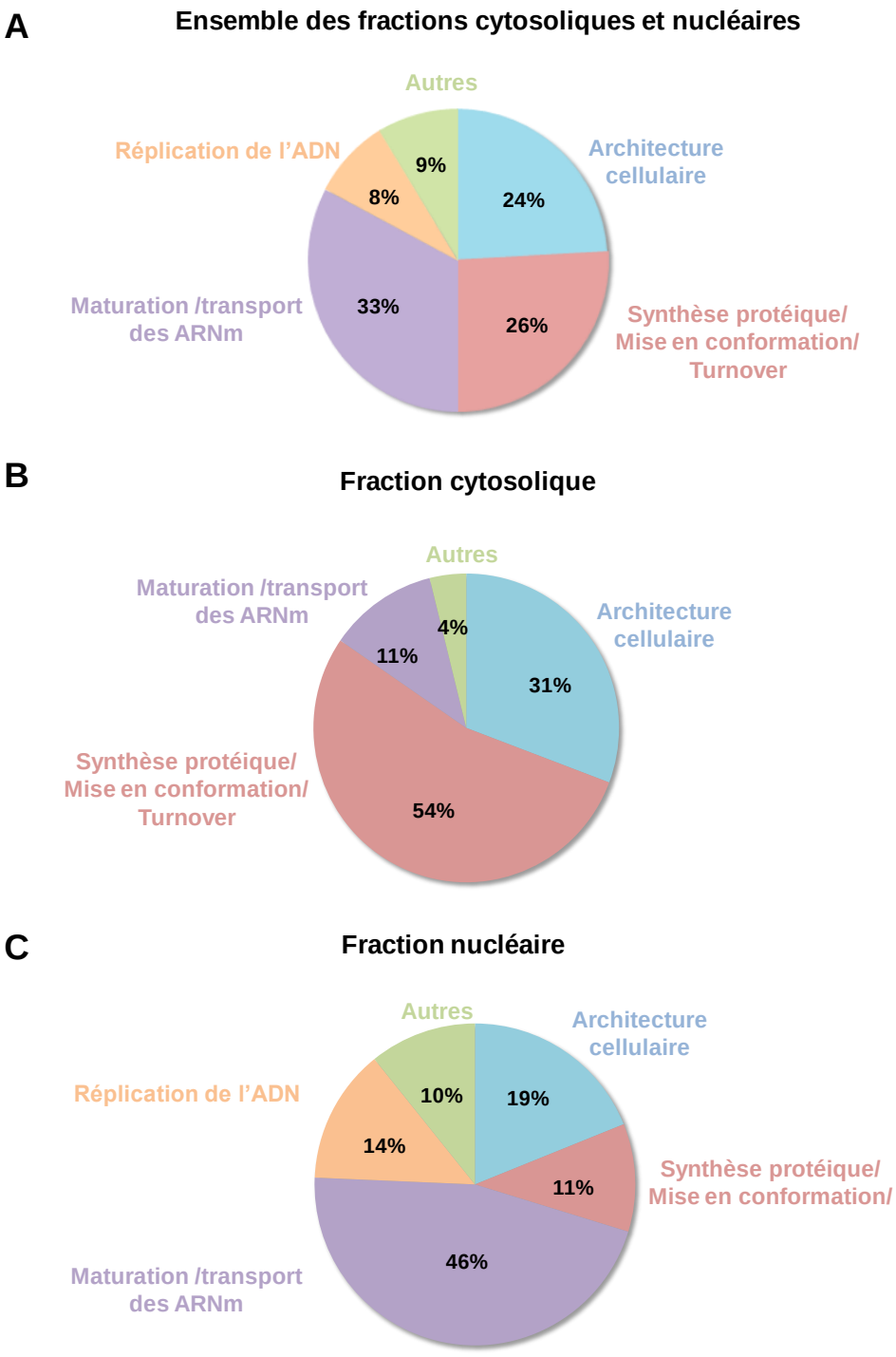
La deuxième partie de mes travaux de thèse a porté sur l'identification des protéines dont la *O*-GlcNAcylation varie entre les phases G1 et S afin de connaître les processus cellulaires impliqués dans la prolifération cellulaire potentiellement régulés par l'OGT. Par Western blot et immunofluorescence, nous avons observé des variations importantes du niveau de *O*-GlcNAcylation lors des phases précoces du cycle cellulaire (**Figure 35A)** qui se sont avérées à la fois très différentes entre les compartiments intracellulaires (**Figure 41, ligne 1),** et protéines spécifiques (**Figure 33C)**. Afin de séparer et de détecter les protéines *O*-GlcNAc minoritaires, nous avons donc opté pour un fractionnement cellulaire Cytosol/Noyau avant la séparation des protéines par électrophorèse 2D. L'efficacité du fractionnement a été vérifiée en détectant par Western blot la GAPDH cytosolique et l'histone H2B nucléaire (**Figure 42,** WB GAPDH et H2B, §VII 'Matériels & Methodes).

Après fractionnement subcellulaire, il nous a fallu tester différentes méthodes de dessalage et de concentration des protéines pour chacune des deux fractions. Au final, la fraction cytosolique a été concentrée par précipitation à l'acétone (80% v/v) et la fraction nucléaire à l'aide d'un kit commercial (2D-Clean-Up kit, GE Healthcare).

Pour détecter plus finement les protéines dont la *O*-GlcNAcylation est modifiée à la transition G1/S, les protéines de chaque fraction ont été séparées par électrophorèse 2D. Pour minimiser le chevauchement de spots sur les gels, nous avons choisi des strips de gamme pH 4-7. On perd la résolution de séparation pour les protéines basiques, mais on gagne en résolution pour la majorité des protéines, dont le pI se situe entre 4 et 7.

Enfin, nous avons dû optimiser les conditions de Western blot (dilution anticorps primaire et secondaire, tampon de blocage) pour diminuer le bruit de fond sur les membranes de nitrocellulose, dans le but de pouvoir détecter aussi les spots *O*-GlcNAc les moins intenses.

De la même manière que ce que nous avons observé précédemment par immunofluorescence (**Figure 41**), la *O*-GlcNAcylation des protéines de la fraction nucléaire augmente fortement au



<u>Figure 44.</u> Distribution des protéines *O*-GlcNAcylées identifiées par protéomique en fonction du processus biologique dans lequel elles sont impliquées

cours de la phase G1 et diminue brusquement lorsque les cellules entrent dans la phase S (**Figure 43C**). Cette différence d'intensité est particulièrement importante sur le groupe de spots de haut poids moléculaires (**zoom a, Figure 43C**). Dans la fraction cytoplasmique, les variations de *O*-GlcNAcylation au cours de la phase G1 sont plus spécifiques de certains spots, et le niveau global de protéines *O*-GlcNAcylées augmente en phase S par rapport à la phase G1 (**Figure 43A**).

Dans un deuxième temps, pour chaque fraction et pour chaque temps de la cinétique (0, 12, 15 et 18 heures), les gels 2D ont été faits en duplicate, l'un utilisé pour la détection des protéines O-GlcNAc par Western blot, l'autre coloré au nitrate d'argent afin de découper les spots d'intérêt. Après superposition des deux images (WB/coloration) grâce au logiciel Image J®, nous avons sélectionné puis découpé les spots différentiellement *O*-GlcNAcylés entre les phases G0, G1 et S (**Figures 43B et D**). Après digestion trypsique, les protéines ont été identifiées par spectrométrie de masse en tandem (Plateforme de spectrométrie de masse, Lille Nord de France). Les spots correspondants sont numérotés dans les zones agrandies représentées sur la figure 44B pour le cytoplasme et 44D pour le noyau.

Au total, nous avons identifié 58 protéines dont la liste est reportée dans le tableau 2 pour les protéines *O*-GlcNAc identifiées dans la fraction cytosolique et dans le tableau 3 pour les protéines identifiées dans la fraction nucléaire **(Tableaux 2 et 3)**. Pour toutes ces protéines, excepté les cytokératines 8 et 18, c'est la première fois que sont reportés des changements de *O*-GlcNAcylation dépendants de la progression dans le cycle cellulaire.

Ces protéines interviennent dans divers processus biologiques dont les plus représentés sont l'architecture cellulaire (24%), la synthèse /mise en conformation/transport des protéines (26%) et la maturation/transport des ARNm (33%) **(Figure 44A)**. Parmi ces protéines, 13 d'entre elles sont de nouvelles cibles potentielles de l'OGT (repérées par (-) dans les tableaux) et 14 appartiennent à des familles dont certains membres ont déjà été reportés comme étant *O*-GlcNAcylés (repérées par (*) dans les tableaux). Quelques protéines, essentiellement des protéines de structure, ont été identifiées dans les 2 fractions, comme l'actine **(Tableaux 2 et 3)**, les cytokératines **(Tableau 2)** et les lamines A/C et B1 **(Tableau 3).** Par ailleurs, certaines protéines sont retrouvées dans plusieurs spots, comme l'HnRNP K qui a été identifiée dans 4 spots de la fraction cytosolique **(Figure 43B,** spots n°13, 18, 19 et 21 ; **Tableau 2)**.

Protein name	Entry name	Accession number	MW / pI	Mascot Score[1] (matched peptides)	Spot[2]
Structural component and cytoskeleton					
Actin, cytoplasmic 1	ACTB	P60709	41 470/5.32	118 (5)	2, 3
Keratin, type 1 cytoskeletal 9	K1C9	P35527	62 027/5.14	141 (7)	1, 2, 5, 7, 8
Keratin, type 1 cytoskeletal 14	K1C14	P02533	51 529/5.09	311 (9)	4, 5
Keratin, type 1 cytoskeletal 16	K1C16	P08779	51 236/4.99	251 (8)	4, 7
Keratin, type 1 cytoskeletal 17	K1C17	Q04695	48 076/4.97	209 (8)	4, 7
Keratin, type 1 cytoskeletal 18	K1C18	P05783	48 029/5.04	171 (5)	1, 2, 3
Keratin, type 2 cytoskeletal 5	K2C5	P13647	62 340/7.59	306 (12)	4, 7
Keratin, type 2 cytoskeletal 8	K2C8	P05787	53 671/5.52	521 (7)	1-8
Protein biosynthesis, folding, transport and turnover					
Eukaryotic initiation factor 4A-I	eIF4A-I	P60842	46 125/5.32	363 (13)	7, 8
Heat shock protein HSP60, mitochondrial	HSP60	P10809	61 016/5.70	414 (20)	19-22
Heat shock cognate 71 kDa	HSP7C	P11142	70 854/5.37	479 (21)	25, 26
Heat shock protein HSP 90-alpha	HS90A	P07900	85 006/4.94	1149 (61)	10-12
Heat shock protein HSP 90-beta	HS90B	P08238	83 554/4.97	1430 (73)	11, 12
Importin subunit alpha-7	IMA7	O60684	59 991/4.89	23 (3)	16
Importin-5	IPO5	O00410	123 550/4.83	34 (2)	28
Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75	P38646	73 635/5.87	35 (2)	26
T-complex protein 1 subunit epsilon	TCPE	P48643	59 633/5.45	94 (12)	23, 24
T-complex protein 1 subunit theta	TCPQ	P50990	59 583/5.42	127 (10)	23, 24
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	UBP5	P45974	95 725/4.91	33 (2)	13
Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	P22314	117 774/5.49	118 (4)	29
UV excision repair protein RAD23 homolog B	RD23B	P54727	43 145/4.79	87 (4)	14, 15
Valosin-containing Protein	VCP	P55072	89 300/5.14	174 (24)	27
mRNA processing					
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRPK	P61978	50 944/5.39	184 (10)	17-19, 21
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRPU	Q00839	90 528/5.76	37 (4)	30
Caprin-1	CAPR1	Q14444	78 489/5.14	100 (6)	12
Others					
UPF0364 protein C6orf211	CF211	Q9H993	51140/5.48	64 (4)	9

[1] The higher score obtained for each of these candidates is reported here

[2] Spots are numbered according to Fig. 3B

<u>Tableau 2.</u> Protéines différentiellement *O*-GlcNAcylées en G1/S identifiées dans la fraction cytosolique.

Ceci souligne le fait qu'une protéine puisse être réversiblement modifiée par plusieurs MPTs, comme c'est le cas pour l'HnRNP K qui est phosphorylée, acétylé et méthylée (Kimura *et al.*, 2003).

Pour la fraction cytosolique, plus de 50% des protéines *O*-GlcNAc identifiées participent à la traduction, la mise en conformation et le transport des protéines **(Figure 44B),** dont le facteur d'initiation de la traduction eIF4A-I, les chaperones HSP90A, HSP90B, HSP7C, les sous-unités epsilon et theta de TCP1 (T-complex protein 1) et l'importine-5. Nous avons aussi identifié 3 protéines impliquées dans la maturation des ARNm, l'HnRNP K, l'HnRNP U et la Caprine-1 **(Tableau 2, Figure 44B**).

Par contre, dans la fraction nucléaire, 46 % des protéines *O*-GlcNAc identifiées jouent un rôle dans la maturation et le transport des ARNm **(Figure 44C),** telles que les ARN hélicases DDX, les protéines HnRNP (HnRNP G, L, M, U, I) et la protéine d'épissage SF3A1 **(Tableau 3, Figure 43D).** De façon très intéressante, une catégorie de protéines émerge spécifiquement dans la fraction nucléaire. Il s'agit des protéines *MiniChromosome Maintenance* (MCM) -2, -3, -6 et -7, impliquées dans l'initiation de la réplication de l'ADN **(Tableau 3, Figure 43D)**.

L'identification des protéines nucléaires et cytoplasmiques différentiellement *O*-GlcNAcylées permet de donner une vue d'ensemble des processus biologiques potentiellement régulés par la *O*-GlcNAcylation lors de la progression des cellules à travers les phases G0, G1 et S.

6.2 Validation des variations de *O*-GlcNAcylation de 3 protéines cytosoliques

Malgré une optimisation de la résolution de la séparation des protéines par électrophorèse 2D, la présence de plusieurs protéines dans un même spot ou d'une protéine dans divers spots, nécessite une validation des changements de *O*-GlcNAcylation par une autre approche expérimentale. Nous avons donc validé les variations sur 7 protéines ayant un rôle biologique important pour la progression normale du cycle cellulaire. Pour toutes, exceptée pour la cytokératine 8, c'est la première fois que des variations de leur *O*-GlcNAcylation dépendantes du cycle cellulaire sont reportées.

L'HnRNP K est une protéine cytosolique abondante qui transite entre le noyau et le cytoplasme, et interagit avec de nombreuses protéines régulant la transcription, la traduction ou encore la maturation des ARN (Carpenter *et al.*, 2006).

Protein name	Entry name	Accession number	MW / pI	Mascot Score[1] (matched peptides)	Spot[2]
Structural component and cytoskeleton					
Actin, cytoplasmic 1	ACTB	P60709	41 470/5.32	3446 (173)	1, 2
Alpha-actinin-1	ACTN1	P12814	102 993/5.25	40 (2)	29
Alpha-actinin-4	ACTN4	O43707	104 788/5.27	728 (30)	24, 25
Coronin-1A	COR1A	P31146	50 994/6.25	150 (9)	5, 6
Ezrin	EZR1	P15311	69 370/5.94	490 (24)	19, 20
Lamin-A/C	LMNA	P02545	74 095/6.57	803 (29)	18
Lamin-B1	LMNB1	P20700	66 368/5.32	264 (8)	1
Protein biosynthesis and folding					
Stress-70 protein, mitochondrial	GRP75	P38646	73 635/5.87	552 (23)	15, 16
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	HSP71	P08107	70 009/5.48	1471 (57)	13, 14
UV excision repair protein RAD23 homolog B	RD23B	P54727	43 145/4.79	135 (5)	10
Heat shock cognate 71 kDa	HSP7C	P11142	70 854/5.37	2283 (99)	11, 12
mRNA processing and transcription regulation					
ATP-dependent RNA helicase DDX39	DDX39	O00148	49 098/5.46	77 (3)	9, 23
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3	CPSF3	Q9UKF6	77 436/5.37	33 (1)	23
Cleavage stimulation factor subunit 2	CSTF2	P33240	60 920/6.36	114 (4)	17
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G	HNRPG	P38159	42 306/10.06	406 (15)	4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRPL	P14866	64 092/8.46	63 (1)	18
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRPM	P52272	77 464/8.84	58 (2)	18
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRPU	Q00839	90 528/5.76	547 (23)	26-28, 30
HnRNP D0 = AU-rich element RNA-binding protein 1	HNRPD	O14979	38 410/7.62	80 (2)	3
Matrin-3	MATR3	P43243	94 565/5.96	164 (8)	26
Polypyrimidine tract-binding protein 1 (hnRNP I)	PTPB1	P26599	57 186/9.22	50 (1)	7
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	DDX17	Q92841	72 326/8.82	181 (7)	18, 20
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5	P17844	69 105/9.06	310 (13)	18
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	DDX6	P26196	54 382/8.85	51 (1)	7
Splicing factor 3A subunit 1	SF3A1	Q15459	88 831/5.15	367 (17)	26, 27
Transcription intermediary factor 1-beta	TIF1B	Q13263	88 493 /5.52	69 (1)	28
U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein Prp31	PRP31	Q8WWY3	55 421/5.63	230 (10)	8, 9
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2	Q15029	109 366/4.84	196 (7)	28
DNA replication					
DNA replication licensing factor MCM2	MCM2	P49736	101 832 /5.34	53 (1)	28
DNA replication licensing factor MCM3	MCM3	P25205	90 924/5.53	424 (19)	24, 25
DNA replication licensing factor MCM6	MCM6	Q14566	92 831 /5.29	1065 (49)	24
DNA replication licensing factor MCM7	MCM7	P33993	81 257/6.08	1001 (37)	21, 22
X-ray repair cross-complementing protein 6	XRCC6	P12956	69 799/6.23	118 (4)	17
Others					
Kinectin	KTN1	Q13263	156 179/5.52	39 (2)	29
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	MYPT1	O14974	115 211/5.31	38 (1)	29
Putative oxidoreductase GLYR1	GLYR1	Q49A26	60 518/9.27	64 (2)	18
Trifunctional enzyme subunit beta, mitochondrial:3-ketoacyl-CoA thiolase	TP-beta	P55084	51 262/9.45	105 (4)	3

[1] The higher score obtained for each of these candidates is reported here

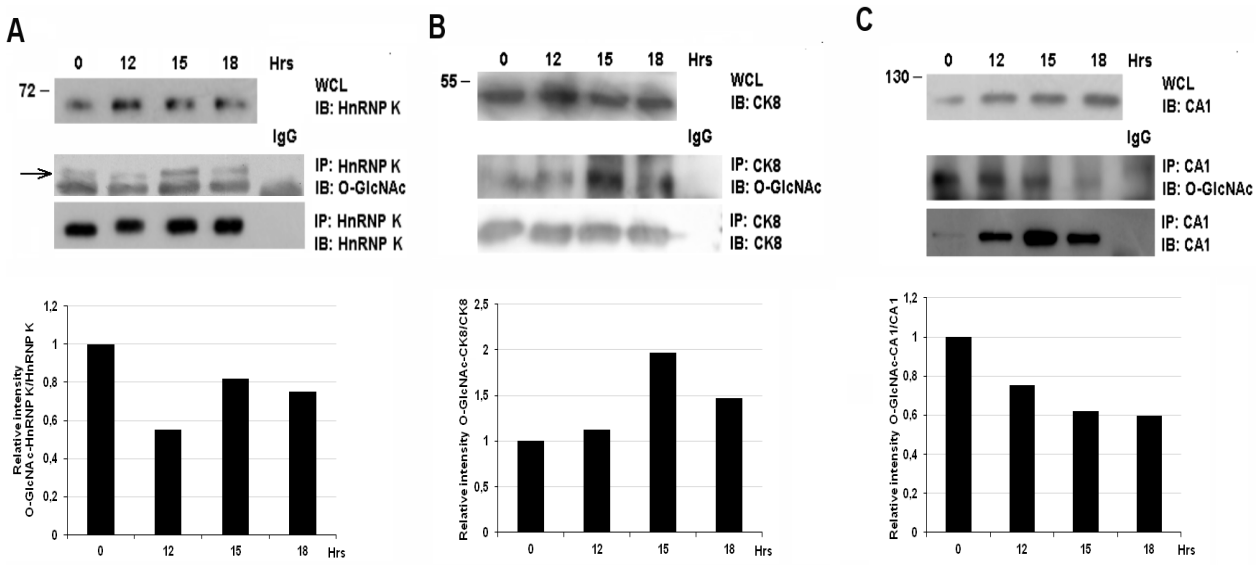
[2] Spots are numbered according to Fig. 3D

Tableau 3. Protéines différentiellement *O*-GlcNAcylées en G1/S identifiées dans la fraction nucléaire

Son expression est régulée par les facteurs de croissance (Ostrowski *et al.,* 2001 ; Mandal *et al.,* 2000), comme ce que nous observons par Western blot à partir des extraits totaux **(Figure 45**, IB HnRNP K). HnRNP K est aussi sujette à de nombreuses MPTs dont la phosphorylation, l'acétylation et la méthylation (Kimura *et al.,* 2003). Sa phosphorylation module aussi bien son activation que sa localisation intracellulaire (Habelhah *et al.,* 2001a ; Habelhah *et al.,* 2001b). Elle est notamment phosphorylée sur les sérines 284 et 302 par la kinase ERK, suite à la stimulation mitogène, ce qui entraîne une accumulation de sa localisation cytoplasmique (Habelhah *et al.,* 2001a). De plus, HnRNP K a déjà été montrée comme étant *O*-GlcNAcylées (Nandi *et al.,* 2006 ; Gurcel *et al.,* 2008 ; Wang *et al.,* 2009) mais c'est la première fois que des variations de *O*-GlcNAcylation sont reportées pour cette protéine lors des étapes précoces du cycle cellulaire. De façon intéressante, la phosphorylation d'HnRNP K augmente suite à l'activation de la voie MAPK, et nos résultats montrent qu'inversement sa *O*-GlcNAcylation diminue dans les cellules en G1 et augmente en phase S **(Figure 45A).** De plus, un des sites *O*-GlcNAc potentiels prédits, la sérine 276, est localisé à proximité d'un site de phosphorylation (Ser284) ciblé par la kinase ERK. Ces résultats suggèrent qu'il pourrait exister une compétition entre ces deux MPTs dans la phase G1 du cycle cellulaire. Cependant, des manipulations supplémentaires sont nécessaires pour appuyer cette hypothèse.

Dans la fraction cytosolique, plusieurs cytokératines (CKs) ont été identifiées dans les spots n°1 à 8 pour lesquels nous observons une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation en phase G1 puis une diminution en phase S. Cependant, il est difficile d'obtenir les variations individuelles de *O*-GlcNAcylation pour chacune d'entres elles puisqu'elles sont retrouvées dans plusieurs spots (de 2 spots, jusqu'à 8 spots pour la CK8). Cette observation souligne le jeu complexe des MPTs sur les CKs lors de la progression des cellules dans le cycle cellulaire.

Parmi les CKs identifiées, la CK8 est un composant majeur des filaments intermédiaires. Une dérégulation de l'expression et de la phosphorylation de CK8 est associée à une augmentation du caractère invasif et métastatique des cellules (Raul *et al.,* 2004 ; Mizuuchi *et al.,* 2009). La phosphorylation de CK8 régule notamment son association avec différents partenaires ainsi que sa dynamique d'assemblage dans les filaments intermédiaires (Omary *et al.,* 2006 ; Ku & Omary, 2006 ; Ku & Omary, 1995). De plus, il a déjà été reporté que CK8 est *O*-GlcNAcylée (Chou *et al.,* 1992) et que sa glycosylation augmente dans les cellules HeLa et HT29 bloquées en G2/M par le nocodazole (Chou & Omary, 1994).



<u>Figure 45.</u> Variation de la *O*-GlcNAcylation de l'HnRNP K, la Cytokératine 8 et la Caprine-1

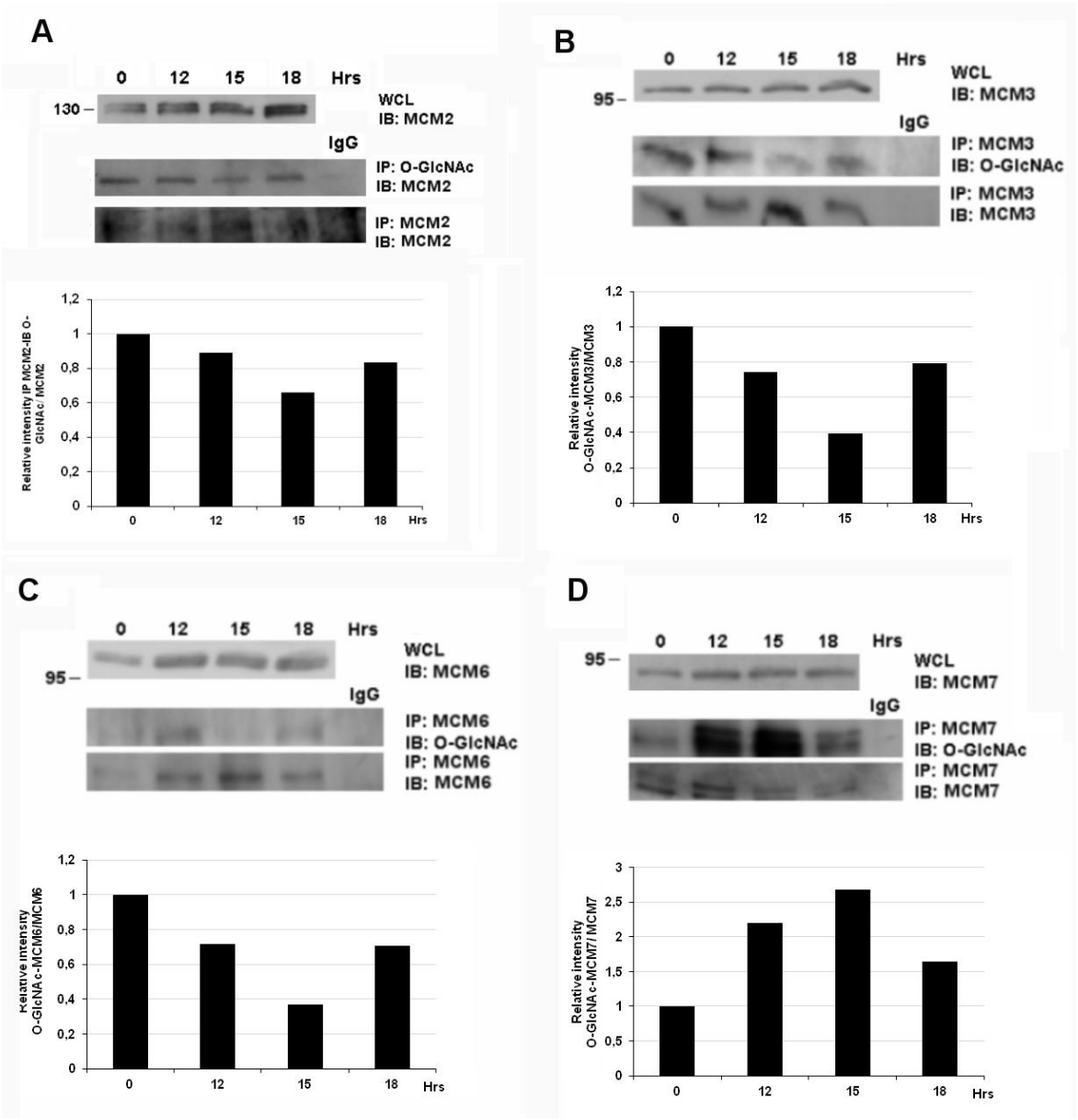
Immunoprécipitation des protéines d'intérêts à partir des extraits totaux (WCL, *whole cell lysate*) de cellules MCF7 en G0 (0), G1 (12H), début de S (15H) et S tardive (18H). Détection de la O-GlcNAcylation des protéines immunoprécipitées par Western blot (RL2). Pour chaque protéine, la quantification relative du niveau de *O*-GlcNAcylation est réalisée par mesures densitométriques (D.O. IB *O*-GlcNAc après IP/ IB protéine in WCL). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Par immunoprécipitation, nous montrons ici que la *O*-GlcNAcylation de la CK8 est transitoirement augmentée d'un factor 2 quand les cellules entrent en phase S, alors que son expression reste constante **(Figure 45B)**. L'ensemble de ces résultats indique que la *O*-GlcNAcylation de la CK8 varie tout au long du cycle cellulaire, dans les phases précoces (G1 et S), comme dans les phases tardives (G2/M). De façon intéressante, la phosphorylation de la CK8 augmente en phase S lorsque nous observons une diminution de sa *O*-GlcNAcylation (Liao *et al.,* 1995). Les sites *O*-GlcNAc identifiés se situe à proximité de ces sites de phosphorylation. Il a d'ailleurs été montré *in vitro* que la *O*-GlcNAcylation de la sérine 48 de la CK8 entre en compétition avec la phosphorylation de la sérine 52, indiquant un dialogue entre ces deux MPTs qui pourrait se produire lors de la transition G1/S du cycle cellulaire afin de participer au remodelage cellulaire (Ku & Omary, 1995; Tao *et al.,* 2006.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la *O*-GlcNAcylation de la Caprine-1 (*cytoplasmic activation/proliferation-associated protein-1*), précédemment immunoprécipitée par de nouveaux anticorps anti-*O*-GlcNAc (Teo *et al.,* 2008). La caprine-1 est une protéine phosphorylée et exclusivement cytosolique dont l'expression est nécessaire à la progression des cellules à travers la transition G1/S. En effet, son inhibition entraîne une accumulation des cellules en phase G1 (Wang *et al.,* 2005). Par Western blot, nous avons confirmé l'augmentation de son niveau protéique dans les cellules proliférantes comparées aux cellules quiescentes **(Figure 45C, WB WCL Caprine-1)** (Wang *et al*., 2005). Par immunoprécipitation, nous montrons pour la première fois une diminution progressive de sa *O*-GlcNAcylation lors de la progression des cellules vers la phase S **(Figure 45C)**. Même si certains sites de phosphorylation ont été identifiés dans des cellules en mitose (Olsen *et al.,* 2010), le rôle de ces deux MPTs sur l'activité biologique de cette protéine reste à être déterminé.

6.3 Validation des variations de *O*-GlcNAcylation des protéines MCMs identifiées dans la fraction nucléaire

En charge du maintien de l'intégrité génomique, la réplication de l'ADN est finement contrôlée d'une part par l'organisation et la compaction des nucléosomes constitués de deux tétramères d'histones H2A, H2B, H3 et H4, et d'autre part par l'arrimage du complexe de pré-réplication sur les origines de réplication (Alabert & Groth, 2012).



<u>Figure 46.</u> Variations de la *O*-GlcNAcylation de la MCM2, MCM3, MCM6 et MCM7 dans les phases précoces du cycle cellulaire

Immunoprécipitation des protéines d'intérêts à partir des extraits totaux (WCL, *whole cell lysate*) de cellules MCF7 en G0 (0), G1(12H), début de S (15H) et S tardive (18H). Détection de la O-GlcNAcylation des protéines immunoprécipitées par Western blot (RL2). Pour chaque protéine, la quantification relative du niveau de *O*-GlcNAcylation est réalisée par mesures densitométriques (D.O. IB *O*-GlcNAc après IP/ IB protéine in WCL). Les résultats sont représentatifs de 2 expériences indépendantes.

Nous avons vu dans l'introduction que de plus en plus de données expérimentales ont montré une contribution de la *O*-GlcNAcylation de ces histones dans la régulation de la condensation de la chromatine au cours du cycle cellulaire (Sakabe *et al.*, 2010 ; Sakabe et Hart, 2010 ; Zhang *et al.*, 2011). Nos résultats de protéomique confirmés par immunoprécipitation montrent pour la première fois que le niveau de *O*-GlcNAcylation de 4 protéines MCM varie au cours des phases précoces du cycle cellulaire. Comme nous l'avons développé dans l'introduction (§2.1), les protéines MCMs interagissent entre elles pour former le complexe MCM2-7, composant majeur du complexe de pré-réplication qui initie la synthèse d'ADN en début de phase S. Lorsque les cellules entrent en phase S, plusieurs kinases viennent recruter d'autres partenaires et activer l'activité hélicase du complexe de pré-réplication pour initier la réplication de l'ADN (Alabert & Groth, 2012).

Par Western-blot sur lysat total, on peut observer que le niveau des protéines MCM2, -3, -6 et -7 augmente progressivement jusqu'en phase S **(Figure 46**, WB WCL). Ces résultats concordent avec une étude qui a montré l'induction de l'expression des protéines MCM par le facteur de transcription c-Myc (Zeller *et al.*, 2006) qui est rapidement activé après stimulation par les facteurs mitogènes du sérum (Dean *et al.*, 1986).

Par immunoprécipitation, nous montrons que la *O*-GlcNAcylation des MCM2, MCM3 et MCM6 diminue de 40 à 60% lorsque les cellules sont en G1/S puis augmente lorsque les cellules progressent en phase S. Au contraire, la *O*-GlcNAcylation de la MCM7 augmente d'un facteur 3 dans les cellules à la transition G1/S puis diminue dans les cellules en phase S **(Figure 46)**.

Seules les protéines MCM6 et MCM7 avaient été décrites *O*-GlcNAc dans des cellules HeLa après marquage métabolique des protéines *O*-GlcNAc avec du GlcNAz peracétylé et enrichissement sur avidine après couplage à un tag phosphine-biotine (Nandi *et al.*, 2006). Il serait intéressant de déterminer si les MCM4 et MCM5 sont également *O*-GlcNAcylées au cours du cycle cellulaire, leur pI étant trop basique pour la gamme de pH sur laquelle nous avons travaillé (pI 6.28 pour MCM4; pI 8.64 pour MCM5). Enfin, il est important de noter que compte tenue de la méthode d'extraction peu stringente que nous avons utilisée pour préparer le lysat protéique total pour l'immunoprécipitation des protéines, il est probable que les protéines MCMs *O*-GlcNAcylées que nous détectons par IP appartiennent davantage à la fraction des MCMs non liées à la chromatine qu'à celle liées à la chromatine. Cela reste à confirmer par fractionnement subcellulaire.

Nos résultats reportent pour la première fois que plusieurs composants du complexe MCM2-7 sont *O*-GlcNAcylées lors de la transition G1/S et que leur *O*-GlcNAcylation varie au cours des phases précoces du cycle cellulaire. De plus, malgré l'appartenance de ces protéines au même complexe, nous confirmons que la *O*-GlcNAcylation est protéine-spécifique puisque le niveau de *O*-GlcNAcylation varie différemment à la transition G1/S selon la protéine MCM étudiée. L'étude du rôle fonctionnel de la *O*-GlcNAcylation des MCMs est donc très intéressante car au même titre que la phosphorylation, cette glycosylation pourrait participer à la régulation de leur fixation à l'ADN, de leur interaction entre elles ou avec leurs partenaires, ou encore de l'activité hélicase du complexe MCM2-7. Nos résultats suggèrent un rôle potentiel de la *O*-GlcNAcylation dans la mise en place du complexe de pré-réplication indispensable au bon déroulement de la synthèse de l'ADN en phase S et, par là même, dans le maintien de l'intégrité du génome.

VII. Conclusion générale

Mes travaux de thèse sur l'étude de la *O*-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire permettent de mieux comprendre le lien étroit entre la dynamique de *O*-GlcNAcylation et le cycle cellulaire (§4.1, introduction '*O*-GlcNAc & Cycle cellulaire').

Dans un premier temps, nous avons étudié les variations de *O*-GlcNAcylation dans l'intégralité du cycle cellulaire ce qui nous a permis de confirmer que la balance *O*-GlcNAc est régulée de manière dépendante du cycle cellulaire. En accord avec la littérature, nous observons une augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation lors de la transition G2/M (Dehennaut *et al.*, 2007 ; Dehennaut *et al.*, 2008) mais nous révélons pour la première fois un niveau élevé de *O*-GlcNAcylation en phase G1 suivi d'une chute notable de la *O*-GlcNAcylation des protéines lors de l'entrée des cellules en phase S. Ces variations de *O*-GlcNAcylation lors des phases précoces du cycle cellulaire sont associées avec des changements d'expression de l'OGT et de l'OGA, de localisation intracellulaire de l'OGT, et d'une augmentation de l'activité de l'OGA endogène.

Dans un second temps, l'identification des protéines dont la *O*-GlcNAcylation est modifiée entre les phases G0/G1, G1 et S, apporte une vision globale des différentes fonctions biologiques potentiellement régulées par la *O*-GlcNAcylation lors des étapes précoces du cycle cellulaire.En effet, en combinant la séparation des protéines par électrophorèse

bidimensionnelle, la détection des protéines *O*-GlcNAcylées par Western blot et le séquençage peptidique par spectrométrie de masse en tandem, nous avons identifié avec succès 58 protéines cytosoliques et nucléaires différentiellement *O*-GlcNAcylées à la transition G1/S.

Ces résultats mettent en évidence pour la première fois des variations de *O*-GlcNAcylation de nombreuses protéines cytosoliques et nucléaires impliquées dans divers processus biologiques (Architecture cellulaire, synthèse des protéines/mise en conformation/turnover, maturation et transports des ARNm, et dans la réplication de l'ADN) indispensables à la progression normale des cellules dans le cycle cellulaire et nécessaires au maintien de l'intégrité du génome.

DISCUSSION

&

PERSPECTIVES

Discussion et Perspectives

Il est bien établi que la voie PI3K/AKT est importante pour la progression du cycle cellulaire, en régulant notamment l'expression de la cycline D1 au début de la phase G1 (Muise-Helmericks *et al.,* 1998 ; Liang & Slingerland, 2003). Nos résultats confirment que l'activation de cette voie est nécessaire pour la prolifération induite par le sérum car l'inhibition pharmacologique de la PI3K par la wortmaninne bloque les cellules MCF7 en G0 et inhibe l'induction de l'expression des cyclines D et E nécessaires à la phase G1 (**Figure 34A**). De plus, nous montrons que l'inhibition de la PI3K perturbe la dynamique *O*-GlcNAc induite par le sérum au cours du cycle cellulaire **(Figure 34B).** Dans notre équipe, nous avons également montré que l'inhibition de l'OGT par l'Ac-5S-GlcNAc (Gloster *et al.,* 2011) ou par ARN interférence diminue l'activation de la voie PI3K/AKT et l'induction de l'expression de la cycline D1 dans les cellules MCF7 stimulées par le sérum (Olivier-Van Stichelen *et al., soumis*)**.** Nos résultats sont en accord avec ceux de Carrillo et collaborateurs qui ont montré que le traitement des cellules COS7 par la wortmaninne bloque la reprise du cycle cellulaire stimulée par le sérum et altère l'augmentation du niveau de *O*-GlcNAcylation observée dans les cellules contrôles (Carrillo *et al.,* 2010). Ces données suggèrent que dans un contexte de reprise du cycle cellulaire, une régulation réciproque existe entre la voie PI3K/AKT et la dynamique de *O*-GlcNAcylation en réponse aux facteurs mitogènes, comme cela est décrit pour l'insuline (Whelan *et al.,* 2008 ; Yang *et al.,* 2008).

Par ailleurs, la fixation de l'insuline sur son récepteur membranaire stimule la tyrosine-phosphorylation de l'OGT, ce qui augmenterait son activité catalytique (Whelan *et al.,* 2008). Etant donné que le sérum contient de nombreux facteurs de croissance (IGF-1, FGF, EGF,…) qui se fixent à des RTK et que l'OGT est phosphorylée sur des résidus tyrosine, mais aussi sérines et thréonines, il serait intéressant de déterminer quelles sont les kinases capables de phosphoryler l'OGT et dans quelle mesure sa phosphorylation peut réguler son activité induite par les facteurs mitogènes. Cette question est actuellement en cours d'étude au sein de notre équipe (Dr I El-yazidi).

Jusqu'à présent, la plupart des travaux portant sur la régulation de la mitose par la *O*-GlcNAcylation ont été menés en perturbant la balance *O*-GlcNAc par des inhibiteurs ou par surexpression de l'OGT ou de l'OGA (Slawson *et al.,* 2005 ; Wang *et al.,* 2010 ; Sakabe & Hart, 2010 ; Yang *et al.,* 2012). L'originalité de notre travail repose sur l'observation des

variations de la dynamique endogène d'*O*-GlcNAcylation dans des cellules progressant de manière synchronisée dans le cycle cellulaire. Ainsi, nous rapportons pour la première fois que la progression en phase G1 est clairement associée à une augmentation des protéines *O*-GlcNAcylées, ces résultats ayant été observés dans différentes lignées cellulaires et obtenus avec deux méthodes de synchronisation. Au sein de notre équipe, nous avons montré récemment que cette augmentation est visible dès la première heure de stimulation des cellules MCF7 par le sérum (Olivier-Van Stichelen *et al., soumis*).

La phase G1 est caractérisée par une augmentation de la biosynthèse des protéines, associée à un métabolisme cellulaire très actif du fait des besoins en molécules précurseurs et énergétiques (§2.3.2). Nos résultats mettent en évidence un lien entre la dynamique *O*-GlcNAc et la traduction protéique dans le contexte du cycle cellulaire. En effet, nous avons montré que des protéines impliquées dans la régulation de la traduction, comme le facteur d'initiation de la traduction eIF4A-I, et de la mise en conformation des protéines néosynthétisées, comme l'HSP90 et les protéines TCP, sont différentiellement glycosylées dans les premières phases du cycle cellulaire. Nous avons également montré que plusieurs protéines de la famille des HnRNP (HnRNP K, G, L, M, U) étaient soumises à la balance *O*-GlcNAc de manière dépendante du cycle cellulaire. Ces protéines régulent la maturation, le transport et la stabilité des ARNm, et en particulier celui de c-Myc dont la synthèse et l'activation est indispensable à l'entrée dans le cycle cellulaire (Carpenter *et al.,* 2006). Il serait intéressant de compléter ces données descriptives par une étude plus approfondie des voies de signalisation et des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la traduction et contrôlés par le couple OGT/OGA lors de l'entrée dans le cycle cellulaire.

Nous montrons également que l'entrée dans la phase S est concomitante à une chute transitoire du niveau de *O*-GlcNAcylation, suivie d'une augmentation à la transition G2/M **(Figure 33)**. L'augmentation de la *O*-GlcNAcylation que nous observons en G2/M dans des cellules somatiques a été observée précédemment dans l'ovocyte de Xénope (Dehennaut *et al.,* 2007 ; 2008). Nous avons observé que la baisse de *O*-GlcNAcylation à l'entrée en phase S est corrélée à l'augmentation de l'activité de l'OGA endogène qui résulte très certainement de l'augmentation du niveau protéique de l'OGA **(Figures 35 et 39)**. Nos résultats montrent cependant que l'inhibition de l'activité catalytique de l'OGA n'empêche pas l'entrée des cellules en phase S, ce qui suggère que cette baisse proviendrait plus de la régulation de l'activité de l'OGT que de celle de l'OGA. Etant donné le lien direct entre l'entrée du glucose dans la cellule et la biosynthèse de l'UDP-GlcNAc, notre hypothèse est que la baisse des

protéines *O*-GlcNAc observée en phase S reflète les changements du métabolisme glucidique. En effet, une étude récente montre que la glycolyse est élevée en phase G1 et diminue en phase S (Tudzarova *et al.,* 2011 ; Colombo *et al.,* 2011). Durant la phase G1, le flux de la glycolyse est élevé, ce qui peut expliquer l'augmentation de *O*-GlcNAcylation que nous observons **(Figure 33)**. En fin de G1, ce flux diminue, notamment à cause de la dégradation d'enzymes de la glycolyse médiée par l'ubiquitine ligase APC/C-Cdh1 (Tudzarova et *al.,* 2011). De ce fait, au lieu d'être dirigé vers la glycolyse par la Glucose-phosphate Isomérase, le Glc-6-P est orienté vers la voie des pentoses phosphates afin de fournir les précurseurs métaboliques nécessaires à la synthèse d'ADN (Colombo *et al.,* 2011). La synthèse de Fructose-6-Phosphate, point de départ de la voie HBP, et donc celle de l'UDP-GlcNAc, diminue, ce qui impacte directement l'activité de l'OGT. De plus, une légère baisse de l'expression de la Glucosamine-6-phosphate acétyltransférase ($GlcNH_2$-6-P → GlcNAc-6-P) a été reportée lors de la transition G1/S dans des cellules myéloïdes de souris (Boehmelt *et al.,* 2000), confortant l'hypothèse que la synthèse d'UDP-GlcNAc est diminuée à la transition G1/S. Ces mêmes auteurs ont également montré une très forte augmentation de l'expression de cette enzyme lorsque les cellules entrent en G2/M, ce qui concorde parfaitement avec la hausse des protéines *O*-GlcNAcylées que nous avons observée dans les cellules MCF7 à cette transition **(Figure 33)**.

L'ensemble de ces données suggèrent fortement que la dynamique *O*-GlcNAc que nous avons mise en évidence reflète la régulation du flux de la glycolyse au cours du cycle cellulaire. Il semble que la réciproque soit également vraie: En retour, la *O*-GlcNAcylation peut moduler l'activité d'enzymes de la glycolyse, comme ce qui a été décrit récemment pour la phosphofructokinase 1 (PFK1) (Yi *et al.,* 2012). En effet, l'activité de PFK1 (Fru-6-P →Fru-1,6-DiP) est diminuée lorsqu'elle est sous sa forme glycosylée, contribuant là aussi à rediriger le Glc-6-P vers la voie des pentoses phosphates. De manière intéressante, l'inhibition de la PFK1 par l'OGT est observée uniquement dans les cellules cancéreuses et contribue à la prolifération cellulaire et au développement tumoral (Yi *et al.,* 2012). Ainsi, l'augmentation de l'entrée de glucose dans les cellules cancéreuses subvient à l'accroissement des besoins énergétiques et métaboliques pour soutenir la croissance tumorale (Bensinger & Christofk, 2012). Cette entrée massive de glucose se répercute *via* la voie HBP sur l'activité de l'OGT et la *O*-GlcNAcylation des protéines (Caldwell *et al.,* 2010 ; Gu *et al.,* 2010 Mi *et al.,* 2011). En retour, l'OGT contribue à amplifier l'avantage métabolique des cellules cancéreuses en favorisant des intermédiaires de la glycolyse (Yi *et al.,* 2012). D'autre part, l'OGT participe

également à l'emballement de la prolifération cellulaire en dérégulant le cycle cellulaire, en particulier *via* FOxM1 (Caldwell et *al.*, 2010).

Nos résultats montrent que les changements de la dynamique *O*-GlcNAc dans le cycle cellulaire s'accompagnent d'une régulation de la localisation intracellulaire de l'OGT **(Figure 41)**, venant ainsi compléter les données bibliographiques actuelles. Lors de la mitose, l'OGT se localise préférentiellement au niveau du fuseau mitotique puis migre vers le midbody lors de la cytokinèse, cette localisation étant nécessaire pour mener à bien le déroulement des évènements mitotiques (Slawson *et al.,* 2008). Il a également été montré qu'une partie de l'OGT est très rapidement relocalisée à la membrane plasmique suite à une stimulation par le sérum (Yang *et al.,* 2008). Nous observons un marquage intense et transitoire de l'OGT endogène dans le noyau en phase G1. Nos résultats suggèrent également, et pour la première fois, que l'OGT serait ensuite exportée dans le cytoplasme lorsque les cellules entrent en phase S. Le transfert de l'OGT du noyau vers le cytoplasme en début de S semble faire appel à un mécanisme actif d'export nucléaire car il est inhibé par la leptomycine B. La leptomycine B inhibe l'export nucléaire en se liant à la protéine CRM-1 qui est indispensable à la formation des complexes d'export nucléaire. La protéine CRM-1 reconnaît la séquence NES des protéines et se lie à RAN-GTP afin de traverser le pore nucléaire (Verhagen *et al.*, 2006). Ces résultats novateurs suggèrent que l'OGT posséderait une séquence NES lui permettant d'être activement exportée vers le cytoplasme en début de phase S. Par des approches d'immunofluorescence et de co-immunoprécipitation, en présence ou non de LMB, nous déterminerons si l'OGT s'associe avec la protéine CRM-1 à la transition G1/S (Connor *et al.,* 2003). Afin de confirmer l'export nucléaire actif de l'OGT, nous analyserons si la translocation de l'OGT vers le cytoplasme lors de l'entrée en phase S est altérée en présence d'un dominant négatif de Ran (RanQ69L), afin de bloquer l'apport en énergie Ran-dépendant nécessaire à l'export des protéines (Kehlenbach *et al.,* 1999). Les résultats de ces expériences apporteront de nouveaux éléments de compréhension sur le transfert nucléocytoplasmique de l'OGT au cours des phases précoces du cycle cellulaire.

Notre étude protéomique ouvre de nouvelles perspectives sur les acteurs moléculaires dont la *O*-GlcNAcylation peut potentiellement participer à la régulation du cycle cellulaire. En particulier, nous avons identifié les protéines MCMs qui ont un rôle crucial à la transition G1/S (§2.4). En effet, les protéines MCMs forment le complexe hélicase MCM2-7, un des composants majeur du complexe de pré-réplication indispensable à l'initiation et l'élongation

de la réplication de l'ADN. Nous avons souligné dans l'introduction que la phosphorylation des différentes protéines MCMs participe au contrôle de l'initiation de la réplication en régulant l'arrimage des MCMs sur la chromatine, l'interaction avec des partenaires ou encore la maturation du complexe de pré-réplication **(Figure 17)**. Nos résultats suggèrent pour la première fois que la *O*-GlcNAcylation des MCMs participerait également à la régulation de l'initiation de la synthèse d'ADN en phase S.

En continuité de mes travaux de thèse, nous allons nous attacher à décrypter le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur les protéines MCMs. Comme la *O*-GlcNAcylation des protéines MCMs endogènes détectée après immunoprécipitation donne un signal faible, nous privilégierons le marquage des protéines *O*-GlcNAc par le marquage enzymatique par la GalNAz (Click-It, §3.1) afin d'amplifier le signal des protéines MCMs *O*-GlcNAcylées.

Dans un premier temps, nous déterminerons dans quelle mesure le couple OGT/OGA régule

1/ l'interaction des protéines MCMs au sein du complexe MCM2-7,

2/ le recrutement des facteurs Cdc6 et Cdt1 (qui ont aussi des sites potentiels *O*-GlcNAc avec un très bon score),

3/ le recrutement du complexe MCM2-7 sur la chromatine en phase G1.

Par des expériences de co-immunoprécipitation et de fractionnement subcellulaire, nous déterminerons si les protéines MCMs *O*-GlcNAcylées sont fixées sur la chromatine, en modulant ou non l'activité de l'OGT ou l'OGA (inhibiteurs ou siRNA). Nous évaluerons l'impact de la perturbation de la balance *O*-GlcNAc sur la fonctionnalité du complexe MCM2-7 et l'initiation de la réplication de l'ADN en mesurant l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN en cours de réplication.

Par ailleurs, comme nous l'avons souligné dans l'introduction, le couple OGT/OGA est capable d'interagir avec différentes kinases et phosphatases (§ 3.4.3). Dans un second temps, par des expériences de co-immunoprécipitation nous étudierons donc si l'OGT et l'OGA interagissent avec les kinases connues pour phosphoryler les protéines MCMs, la CDK1, la CDK2 et cdc7. La formation transitoire de ces complexes multienzymatiques serait un moyen de réguler finement et rapidement les MPTs du complexe de pré-réplication, comme ce qui a été démontré lors de la mitose (Slawson *et al.,* 2008). La surexpression ou l'inhibition d'un des composants des complexes potentiels permettra d'étudier l'influence mutuelle des activités enzymatiques sur la balance *O*-GlcNAcylation/phosphorylation des protéines d'intérêt.

Par ETD-MS/MS, nous procéderons également à l'identification des sites *O*-GlcNAc sur chacune des protéines MCMs. Une fois les sites identifiés, notre objectif est de muter un ou

plusieurs d'entre eux, afin de mieux appréhender l'impact de leur *O*-GlcNAcylation sur la phosphorylation et les propriétés fonctionnelles des MCMs, comme les études qui ont été menées au sein de notre équipe sur la delta-lactoferrine (Hardivillé *et al.,* 2010) et la beta-caténine (Olivier-Van Stichelen *et al.,* en préparation). Parmi les sites *O*-GlcNAc potentiels, certains sont identiques ou proches de sites phosphorylés. C'est le cas de la sérine 5 de MCM2 dont la phosphorylation favorise sa fixation sur la chromatine (Chuang *et al.,* 2009), et de la sérine 27 dont la phosphorylation par cdc7 est essentielle à l'activité ATPase du complexe MCM2-7 (Tsuji et *al.,* 2006). Sur la MCM 4, la phosphorylation des thréonines 7 et 19 et de la sérine 54 inhibe l'activité hélicase du sous-complexe (Ishimi et *al.,* 2003 ; Ishimi *et al.,*1997). Comme l'illustrent ces exemples, il est fort probable que la balance *O*-GlcNAcylation/phosphorylation existe sur les différentes protéines MCMs, apportant ainsi un niveau supplémentaire de régulation de l'initiation de la réplication de l'ADN.

Enfin, nous déterminerons si le niveau de *O*-GlcNAcylation des protéines MCMs est modifié dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales, et s'il existe une relation sur leur surexpression et/ou suractivation dans le cancer. En effet, les protéines MCMs sont surexprimées *in vivo* dans de nombreux types de cancers et leur surexpression est corrélée au potentiel prolifératif de la tumeur (Perou *et al.,* 1999 ; Giaginis *et al.,* 2010). Par exemple, dans les cancers du sein invasifs, l'expression de MCM2 est corrélée positivement avec le grade tumoral et négativement avec l'expression des récepteurs aux hormones (ER et Pg) (Wojnar *et al.,* 2011). De même, l'expression de MCM2 et MCM5 est corrélée avec le potentiel prolifératif des cellules tumorales de côlon (Giaginis *et al.,* 2009). Après avoir déterminé le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur les protéines MCMs et son impact sur l'initiation de la réplication de l'ADN, nous travaillerons sur des modèles de lignées cellulaires (lignées mammaires, MCF10A, MCF7, MDA-MB-231 ; et lignées colorectales normale (fœtale) CCD841CoN, de carcinome HCT116, et d'adénocarcinome HT29). A partir de ces différentes lignées, nous comparerons les profils de *O*-GlcNAcylation des protéines MCMs, fixées ou non à la chromatine, en relation avec le taux d'initiation de la synthèse d'ADN.

L'ensemble de ces résultats nous permettra d'appréhender le rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'activité du complexe MCM2-7. Ainsi, nous espérons contribuer à mieux connaître les acteurs protéiques (dé)régulés par l'augmentation de l'activité de l'OGT facilitant la prolifération anarchique des cellules cancéreuses.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

A

Adachi, M., Fukuda, M., and Nishida, E. (2000). Nuclear Export of Map Kinase (ERK) Involves a Map Kinase Kinase (Mek-Dependent) Active Transport Mechanism. J Cell Biol *148*, 849–856.

Alabert, C., and Groth, A. (2012). Chromatin replication and epigenome maintenance. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 153–167.

Aladjem MI. (2007). Replication in context: dynamic regulation of DNA replication patterns in metazoans. Nat. Rev. Genet. 8: 588-600.

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., et al. (2012). Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 7280–7285.

Alvino, G.M., Collingwood, D., Murphy, J.M., Delrow, J., Brewer, B.J., and Raghuraman, M.K. (2007). Replication in Hydroxyurea: It's a Matter of Time. Mol Cell Biol *27*, 6396–6406.

Anand, P., and Stamler, J.S. (2012). Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. J. Mol. Med. 90, 233–244.

Andrali, S.S., Qian, Q., and Ozcan, S. (2007). Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation. J. Biol. Chem. 282, 15589–15596.

Anjum R, et Blenis J. (2008). The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. Nature Reviews Molecular Cell Biology 9: 747-758.

Anon. The Cell - NCBI Bookshelf. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/

Aparicio OM, Stout AM, et Bell SP. (1999). Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 9130-9135.

Ashfaq, U., Javed, T., Rehman, S., Nawaz, Z., and Riazuddin, S. (2011). Lysosomotropic agents as HCV entry inhibitors. Virology Journal *8*, 163.

B

Bach S, Knockaert M, Reinhardt J, Lozach O, Schmitt S, Baratte B, et al. (2005). Roscovitine Targets, Protein Kinases and Pyridoxal Kinase. J. Biol. Chem. 280: 31208-31219.

Ballabeni A, Zamponi R, Caprara G, Melixetian M, Bossi S, Masiero L, et al. (2009). Human CDT1 associates with CDC7 and recruits CDC45 to chromatin during S phase. J. Biol. Chem. 284: 3028-3036.

Banerjee, S., Robbins, P.W., and Samuelson, J. (2009). Molecular characterization of nucleocytosolic O-GlcNAc transferases of Giardia lamblia and Cryptosporidium parvum. Glycobiology 19, 331–336.

Bártová I, Koca J, et Otyepka M. (2008). Regulatory phosphorylation of cyclin-dependent kinase 2: insights from molecular dynamics simulations. J Mol Model 14: 761-768.

Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature 421, 499–506.

Beausoleil SA, Villén J, Gerber SA, Rush J, et Gygi SP. (2006). A probability-based approach for high-throughput protein phosphorylation analysis and site localization. Nat. Biotechnol. 24: 1285-1292.

Bell SP, et Dutta A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. Annu. Rev. Biochem. 71: 333-374.

Bell SP. (2002). The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. Genes Dev. 16: 659-672.

Bensinger, S.J., and Christofk, H.R. (2012). New aspects of the Warburg effect in cancer cell biology. Semin. Cell Dev. Biol. 23, 352–361.

Blomen VA, et Boonstra J. (2007). Cell fate determination during G1 phase progression. Cell. Mol. Life Sci. 64: 3084-3104.

Blow JJ, et Dutta A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6: 476-486.

Bockstaele, L., Coulonval, K., Kooken, H., Paternot, S., and Roger, P.P. (2006). Regulation of CDK4. Cell Div 1: 25.

Boehmelt, G., Wakeham, A., Elia, A., Sasaki, T., Plyte, S., Potter, J., Yang, Y., Tsang, E., Ruland, J., Iscove, N.N., et al. (2000). Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. EMBO J 19, 5092–5104.

Bonenfant, D., Towbin, H., Coulot, M., Schindler, P., Mueller, D.R., and van Oostrum, J. (2007). Analysis of dynamic changes in post-translational modifications of human histones during cell cycle by mass spectrometry. Mol. Cell Proteomics 6: 1917–1932.

Boutros R, Dozier C, et Ducommun B. (2006). The when and wheres of CDC25 phosphatases. Curr. Opin. Cell Biol. 18: 185-191.

Boutros R, Lobjois V, et Ducommun B. (2007). CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? Nat. Rev. Cancer 7: 495-507.

Boyce, M., and Bertozzi, C.R. (2011). Bringing chemistry to life. Nat. Methods 8, 638–642.

Bracken AP, Ciro M, Cocito A, et Helin K. (2004). E2F target genes: unraveling the biology. Trends in Biochemical Sciences 29: 409-417.

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 Lett. 41, 181–184.

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. J. Biol. Chem. 277, 14764–14770.

Butkinaree, C., Cheung, W.D., Park, S., Park, K., Barber, M., and Hart, G.W. (2008). Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. J. Biol. Chem. 283, 23557–23566.

C

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, 2831–2842.

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, 376–388.

Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, et Worland PJ. (1996). Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK) 2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. Cancer Res. 56: 2973-2978.

Carpenter CL, et Cantley LC. (1996). Phosphoinositide 3-kinase and the regulation of cell growth. Biochim. Biophys. Acta 1288: M11-16.

Carpenter, B., MacKay, C., Alnabulsi, A., MacKay, M., Telfer, C., Melvin, W.T., and Murray, G.I. (2006). The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. Biochim. Biophys. Acta 1765, 85–100.

Carriere A, Ray H, Blenis J, et Roux PP. (2008). The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. Front. Biosci. 13: 4258-4275.

Carrillo, L.D., Froemming, J.A., and Mahal, L.K. (2011). Targeted in vivo O-GlcNAc sensors reveal discrete compartment-specific dynamics during signal transduction. J. Biol. Chem. *286*, 6650–6658.

Castellano E, et Downward J. (2011). RAS Interaction with PI3K More Than Just Another Effector Pathway. Genes & Cancer 2: 261‑274.

Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, et al. (2003). Involvement of PI3K/AKT pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. Leukemia 17: 590-603.

Cheng, X., and Hart, G.W. (2000). Glycosylation of the murine estrogen receptor-alpha. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 75, 147–158.

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. J. Biol. Chem. 276, 10570–10575.

Cheung, W.D., and Hart, G.W. (2008). AMP-activated protein kinase and p38 MAPK activate O-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. J. Biol. Chem. 283, 13009–13020.

Chinami M, Yano Y, Yang X, Salahuddin S, Moriyama K, Shiroishi M, et al. (2005). Binding of HTm4 to Cyclin-dependent Kinase (Cdk)-associated Phosphatase (KAP)·Cdk2·Cyclin A Complex Enhances the Phosphatase Activity of KAP, Dissociates Cyclin A, and Facilitates KAP Dephosphorylation of Cdk2. J. Biol. Chem. 280: 17235-17242.

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. J. Cell. Sci. *107 (Pt 7)*, 1833–1843.

Chou, C.F., Smith, A.J., and Omary, M.B. (1992). Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. J. Biol. Chem. *267*, 3901–3906.

Chou, T.Y., Dang, C.V., and Hart, G.W. (1995). Glycosylation of the c-Myc transactivation domain. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 4417–4421.

Choudhary C, Olsen JV, Brandts C, Cox J, Reddy PNG, Böhmer FD, et al. (2009). Mislocalized activation of oncogenic RTKs switches downstream signaling outcomes. Mol. Cell 36: 326-339.

Chuang L-C, Teixeira LK, Wohlschlegel JA, Henze M, Yates JR, Méndez J, et al. (2009). Phosphorylation of Mcm2 by Cdc7 promotes pre-replication complex assembly during cell-cycle re-entry. Mol. Cell 35: 206-216.

Cicenas, J., and Valius, M. (2011). The CDK inhibitors in cancer research and therapy. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 137, 1409–1418.

Clark, P.M., Dweck, J.F., Mason, D.E., Hart, C.R., Buck, S.B., Peters, E.C., Agnew, B.J., and Hsieh-Wilson, L.C. (2008). Direct in-gel fluorescence detection and cellular imaging of O-GlcNAc-modified proteins. J. Am. Chem. Soc. 130, 11576–11577.

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. EMBO J. 27, 2780–2788.

Classon M, et Harlow E. (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. Nature Reviews Cancer 2: 910-917.

Clute P, et Pines J. (1999). Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. Nat. Cell Biol. 1: 82-87.

Cobrinik D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. Oncogene 24: 2796-2809.

Colombo, S.L., Palacios-Callender, M., Frakich, N., Carcamo, S., Kovacs, I., Tudzarova, S., and Moncada, S. (2011). Molecular basis for the differential use of glucose and glutamine in cell proliferation as revealed by synchronized HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 21069–21074.

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, 7845–7852.

Comtesse, N., Maldener, E., and Meese, E. (2001). Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 283, 634–640.

Connor, M.K., Kotchetkov, R., Cariou, S., Resch, A., Lupetti, R., Beniston, R.G., Melchior, F., Hengst, L., and Slingerland, J.M. (2003). CRM1/Ran-mediated nuclear export of p27(Kip1) involves a nuclear export signal and links p27 export and proteolysis. Mol. Biol. Cell *14*, 201–213.

Cooper GM. (2000). The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Cooper S. (2006). Checkpoints and restriction points in bacteria and eukaryotic cells. Bioessays 28: 1035-1039.

Copeland, R.J., Bullen, J.W., and Hart, G.W. (2008). Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 295, E17–28.

D

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 2alpha. Biochemistry 42, 5453–5460.

Dean, M., Levine, R.A., and Campisi, J. (1986). c-Myc regulation during retinoic acid-induced differentiation of F9 cells is posttranscriptional and associated with growth arrest. Mol. Cell. Biol. *6*, 518–524.

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. J. Biol. Chem. 282, 12527–12536.

Dehennaut, V., Hanoulle, 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. Biochem. Biophys. Res. Commun. 369, 539–546.

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. Mol. Cell Proteomics 7, 2229–2245.

Dephoure, N., Zhou, C., Villén, J., Beausoleil, S.A., Bakalarski, C.E., Elledge, S.J., and Gygi, S.P. (2008). A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. PNAS 105, 10762–10767.

Dias, W.B., and Hart, G.W. (2007). O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. Mol Biosyst 3, 766–772.

Dias, W.B., Cheung, W.D., Wang, Z., and Hart, G.W. (2009). Regulation of calcium/calmodulin-dependent kinase IV by O-GlcNAc modification. J. Biol. Chem. 284, 21327–21337.

Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, et Sherr CJ. (1998). Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. Genes Dev. 12: 3499-3511.

Diehl, J.A., and Ponugoti, B. (2010). Ubiquitin-Dependent Proteolysis in G1/S Phase Control and Its Relationship with Tumor Susceptibility. Genes & Cancer *1*, 717–724.

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. J. Biol. Chem. 269, 19321–19330.

Donzelli M, et Draetta GF. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. EMBO Rep. 4: 671-677.

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. J. Am. Chem. Soc. 128, 16484–16485.

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, 781–792.

E

Echard A, et O'Farrell PH. (2003). The degradation of two mitotic cyclins contributes to the timing of cytokinesis. Curr. Biol. 13: 373-383.

Edinger AL, et Thompson CB. (2002). Akt Maintains Cell Size and Survival by Increasing mTOR-dependent Nutrient Uptake. Mol. Biol. Cell 13: 2276-2288.

Evrin C, Clarke P, Zech J, Lurz R, Sun J, Uhle S, et al. (2009). A double-hexameric MCM2-7 complex is loaded onto origin DNA during licensing of eukaryotic DNA replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 20240-20245.F

F

Findeisen M, El-Denary M, Kapitza T, Graf R, et Strausfeld U. (1999). Cyclin A-dependent kinase activity affects chromatin binding of ORC, Cdc6, and MCM in egg extracts of Xenopus laevis. European Journal of Biochemistry 264: 415–426.

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. J. Biol. Chem. 287, 12195–12203.

Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., and Mattaj, I.W. (1997). CRM1 Is an Export Receptor for Leucine-Rich Nuclear Export Signals. Cell *90*, 1051–1060.

Forsburg SL. (2004). Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 109-131.

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. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 11952–11957.

Fukushima, H., Maeda, R., Suzuki, R., Suzuki, A., Nomoto, M., Toyoda, H., Wu, L.-J., Xu, H., Zhao, M.-G., Ueda, K., et al. (2008). Upregulation of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase IV Improves Memory Formation and Rescues Memory Loss with Aging. Journal of Neuroscience 28, 9910–9919.

Fujiki, R., Hashiba, W., Sekine, H., Yokoyama, A., Chikanishi, T., Ito, S., Imai, Y., Kim, J., He, H.H., Igarashi, K., et al. (2011). GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. Nature 480, 557–560.

G

Gambus A, Jones RC, Sanchez-Diaz A, Kanemaki M, van Deursen F, Edmondson RD, et al. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. Nat. Cell Biol. 8: 358-366.

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. J. Biol. Chem. 276, 9838–9845.

Gaur, U., and Aggarwal, B.B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. Biochemical Pharmacology 66, 1403–1408.

Giaginis, C., Vgenopoulou, S., Vielh, P., and Theocharis, S. (2010). MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. Histol. Histopathol. 25, 351–370.

Gingras AC, Gygi SP, Raught B, Polakiewicz RD, Abraham RT, Hoekstra MF, et al. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. Genes Dev. 13: 1422-1437.

Gloster, T.M., and Vocadlo, D.J. (2012). Developing inhibitors of glycan processing enzymes as tools for enabling glycobiology. Nature Chemical Biology 8, 683–694.

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. Nat. Chem. Biol. 7, 174–181.

Golks, A., Tran, T.-T.T., Goetschy, J.F., and Guerini, D. (2007). Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. EMBO J 26, 4368–4379.

Gordan JD, Thompson CB, et Simon MC. (2007). HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. Cancer Cell 12: 108-113.

Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, et Hay N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. Genes Dev. 15: 1406-1418.

Greenberg, A.S., Coleman, R.A., Kraemer, F.B., McManaman, J.L., Obin, M.S., Puri, V., Yan, Q.-W., Miyoshi, H., and Mashek, D.G. (2011). The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. J. Clin. Invest. 121, 2102–2110.

Griffith, L.S., and Schmitz, B. (1999). O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to pertubations of phosphorylation. Eur. J. Biochem. 262, 824–831.

Gross, B.J., Kraybill, B.C., and Walker, S. (2005). Discovery of O-GlcNAc transferase inhibitors. J. Am. Chem. Soc. 127, 14588–14589.

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 Res. 70, 6344–6351.

Gu, Y., Rosenblatt, J., and Morgan, D.O. (1992). Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. EMBO J. 11, 3995–4005.

Guinez, C., Morelle, W., Michalski, J.-C., and Lefebvre, T. (2005). O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? Int. J. Biochem. Cell Biol. 37, 765–774.

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. FASEB J 22, 2901–2911.

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. Oncol. Rep. 28, 494–500.

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. Anal Bioanal Chem *390*, 2089–2097.

H

Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., and Ronai, Z. (2001a). Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. J. Biol. Chem. *276*, 18090–18095.

Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Ostareck-Lederer, A., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., Hentze, M.W., and Ronai, Z. (2001b). ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. Nat. Cell Biol. 3, 325–330.

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. J. Biol. Chem. 267, 9005–9013.

Han Y-C, Yu YP, Nelson J, Wu C, Wang H, Michalopoulos GK, et al. (2010). Interaction of integrin-linked kinase and miniature chromosome maintenance 7-mediating integrin {alpha}7 induced cell growth suppression. Cancer Res. 70: 4375-4384.

Han, I., and Kudlow, J.E. (1997). Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. Mol Cell Biol 17, 2550–2558.

Han, Y.H., and Park, W.H. (2010). MG132 as a proteasome inhibitor induces cell growth inhibition and cell death in A549 lung cancer cells via influencing reactive oxygen species and GSH level. Hum Exp Toxicol *29*, 607–614.

Hannon GJ, Casso D, et Beach D. (1994). KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 1731-1735.

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. J. Biol. Chem. 262, 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. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 11266–11271.

Hanover, J.A., Krause, M.W., and Love, D.C. (2010). The Hexosamine Signaling Pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. Biochim Biophys Acta 1800, 80.

Hanover, J.A., Lai, Z., Lee, G., Lubas, W.A., and Sato, S.M. (1999). Elevated O-LinkedN-Acetylglucosamine Metabolism in Pancreatic β-Cells. Archives of Biochemistry and Biophysics 362, 38–45.

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. Arch. Biochem. Biophys. 409, 287–297.

Hanover, J.A., Krause, M.W., and Love, D.C. (2012). Bittersweet memories: linking metabolism to epigenetics through O-GlcNAcylation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 13, 312–321.

Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, et Dean DC. (1999). Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. Cell 98: 859-869.

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. J. Biol. Chem. 285, 19205–19218.

Havugimana, P.C., Hart, G.T., Nepusz, T., Yang, H., Turinsky, A.L., Li, Z., Wang, P.I., Boutz, D.R., Fong, V., Phanse, S., et al. (2012). A Census of Human Soluble Protein Complexes. Cell 150, 1068–1081.

Heller RC, Kang S, Lam WM, Chen S, Chan CS, et Bell SP. (2011). Eukaryotic origin-dependent DNA replication in vitro reveals sequential action of DDK and S-CDK kinases. Cell 146: 80-91.

Henley SA, et Dick FA. (2012). The retinoblastoma family of proteins and their regulatory functions in the mammalian cell division cycle. Cell Div 7: 10.

Herrmann J, Lerman LO, et Lerman A. (2007). Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in Protein Regulation. Circulation Research 100: 1276-1291.

Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H.E., and Stamler, J.S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6, 150–166.

Hiromura, M., Choi, C.H., Sabourin, N.A., Jones, H., Bachvarov, D., and Usheva, A. (2003). YY1 is regulated by O-linked N-acetylglucosaminylation (O-glcNAcylation). J. Biol. Chem. 278, 14046–14052.

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. J. Cell Biol. 104, 1157–1164.

Hsu PP, Kang SA, Rameseder J, Zhang Y, Ottina KA, Lim D, et al. (2011). The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. Science 332: 1317-1322.

Hu, Y., Suarez, J., Fricovsky, E., Wang, H., Scott, B.T., Trauger, S.A., Han, W., Hu, Y., 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. J Biol Chem 284, 547–555.

Hurtado-Guerrero, R., Dorfmueller, H.C., and van Aalten, D.M.F. (2008). Molecular mechanisms of O-GlcNAcylation. Curr. Opin. Struct. Biol. 18, 551–557.

Huse M, et Kuriyan J. (2002). The Conformational Plasticity of Protein Kinases. Cell 109: 275-282.

Huttlin EL, Jedrychowski MP, Elias JE, Goswami T, Rad R, Beausoleil SA, et al. (2010). A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. Cell 143: 1174-1189.

I

Illario, M., Giardino-Torchia, M.L., Sankar, U., Ribar, T.J., Galgani, M., Vitiello, L., Masci, A.M., Bertani, F.R., Ciaglia, E., Astone, D., et al. (2008). Calmodulin-dependent kinase IV links Toll-like receptor 4 signaling with survival pathway of activated dendritic cells. Blood 111, 723–731.

Ilves I, Petojevic T, Pesavento JJ, et Botchan MR. (2010). Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. Mol. Cell 37: 247-258.

Ippoliti, R., Ginobbi, P., Lendaro, E., D'Agostino, I., Ombres, D., Benedetti, P.A., Brunori, M., and Citro, G. (1998). The effect of monensin and chloroquine on the endocytosis and toxicity of chimeric toxins. Cell. Mol. Life Sci. *54*, 866–875.

Ishimi Y. (1997). A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. J. Biol. Chem. 272: 24508-24513.

Ishimi Y, Komamura-Kohno Y, You Z, Omori A, et Kitagawa M. (2000). Inhibition of Mcm4,6,7 helicase activity by phosphorylation with cyclin A/Cdk2. J. Biol. Chem. 275: 16235-16241.

Ishimi, Y., and Komamura-Kohno, Y. (2001). Phosphorylation of Mcm4 at specific sites by cyclin-dependent kinase leads to loss of Mcm4,6,7 helicase activity. J. Biol. Chem. *276*, 34428–34433.

Ishimi, Y., Komamura-Kohno, Y., Kwon, H.-J., Yamada, K., and Nakanishi, M. (2003). Identification of MCM4 as a Target of the DNA Replication Block Checkpoint System. J. Biol. Chem. 278, 24644–24650.

Izumi M, Yanagi K, Mizuno T, Yokoi M, Kawasaki Y, Moon K-Y, et al. (2000).(a). The human homolog of Saccharomyces cerevisiae Mcm10 interacts with replication factors and dissociates from nuclease-resistant nuclear structures in G2 phase. Nucleic Acids Res 28: 4769-4777.

J

Jacobsen, S.E., Binkowski, K.A., and Olszewski, N.E. (1996). SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 9292–9296.

James, L.R., Tang, D., Ingram, A., Ly, H., Thai, K., Cai, L., and Scholey, J.W. (2002). Flux through the hexosamine pathway is a determinant of nuclear factor kappaB- dependent promoter activation. Diabetes 51, 1146–1156.

Jeffrey PD, Russo AA, Polyak K, Gibbs E, Hurwitz J, Massagué J, et al. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. Nature 376: 313-320.

Jiang, M.S., and Hart, G.W. (1997). A subpopulation of estrogen receptors are modified by O-linked N-acetylglucosamine. J. Biol. Chem. 272, 2421–2428.

Jinno S, Suto K, Nagata A, Igarashi M, Kanaoka Y, Nojima H, et al. (1994). Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. EMBO J. 13: 1549-1556.

Jinno S, Hung SC, et Okayama H. (1999). Cell cycle start from quiescence controlled by tyrosine phosphorylation of Cdk4. Oncogene 18: 565-571.

Julien, E., and Herr, W. (2004). A switch in mitotic histone H4 lysine 20 methylation status is linked to M phase defects upon loss of HCF-1. Mol. Cell 14, 713–725.

K

Kaleem, A., Hoessli, D.C., Ahmad, I., Walker-Nasir, E., Nasim, A., Shakoori, A.R., and Din, N.- (2008). Immediate-early gene regulation by interplay between different post-translational modifications on human histone H3. Journal of Cellular Biochemistry 103, 835–851.

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. J. Biol. Chem. 277, 19229–19235.

Kamemura, K., and Hart, G.W. (2003). Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 73, 107–136.

Kandel ES, et Hay N. (1999). The Regulation and Activities of the Multifunctional Serine/Threonine Kinase Akt/PKB. Experimental Cell Research 253: 210-229.

Kang, J.G., Park, S.Y., Ji, S., Jang, I., Park, S., Kim, H.S., Kim, S.-M., Yook, J.I., Park, Y.-I., Roth, J., et al. (2009). O-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose deprivation through glycogen degradation. J. Biol. Chem. 284, 34777–34784.

Karin, M., and Delhase, M. (2000). The IκB kinase (IKK) and NF-κB: key elements of proinflammatory signalling. Seminars in Immunology 12, 85–98.

Kastan MB, et Bartek J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. Nature 432: 316-323.

Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K., and Tanaka, N. (2009). Loss of p53 enhances catalytic activity of IKKbeta through O-linked beta-N-acetyl glucosamine modification. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 3431–3436.

Kay, J.E., and Korner, A. (1966). Effect of cycloheximide on protein and ribonucleic acid synthesis in cultured human lymphocytes. Biochem. J. *100*, 815–822.

Kearse, K.P., and Hart, G.W. (1991). Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 1701–1705.

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. J. Cell. Sci. 124, 2851–2860.

Kehlenbach, R.H., Dickmanns, A., Kehlenbach, A., Guan, T., and Gerace, L. (1999). A role for RanBP1 in the release of CRM1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export. J. Cell Biol. 145, 645–657.

Kelly, W.G., and Hart, G.W. (1989). Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in Drosophila chromatin. Cell 57, 243–251.

Kelly, W.G., Dahmus, M.E., and Hart, G.W. (1993). RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. J. Biol. Chem. 268, 10416–10424.

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. Nat. Chem. Biol. 3, 339–348.

Kimura, E., Abe, K., Suzuki, K., and Sorimachi, H. (2003). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K interacts with and is proteolyzed by calpain in vivo. Biosci. Biotechnol. Biochem. *67*, 1786–1796.

Knapp, S., Abdo, M., Ajayi, K., Huhn, R.A., Emge, T.J., Kim, E.J., and Hanover, J.A. (2007). Tautomeric modification of GlcNAc-thiazoline. Org. Lett. 9, 2321–2324.

Koç, A., Wheeler, L.J., Mathews, C.K., and Merrill, G.F. (2004). Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. J. Biol. Chem. *279*, 223–230.

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. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 207–212.

Kozlov, S.V., Graham, M.E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P.J., and Lavin, M.F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. EMBO J. 25, 3504–3514.

Kreppel, L.K., and Hart, G.W. (1999). Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. J. Biol. Chem. 274, 32015–32022.

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. J. Biol. Chem. 272, 9308–9315.

Krueger, K.E., and Srivastava, S. (2006). Posttranslational protein modifications: current implications for cancer detection, prevention, and therapeutics. Mol. Cell Proteomics 5, 1799–1810.

Krzeslak, A., Pomorski, L., and Lipinska, A. (2010). Elevation of nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase) activity in thyroid cancers. Int. J. Mol. Med. 25, 643–648.

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. Ginekol. Pol. 83, 22–26.

Ku, N.-O., and Omary, M.B. (2006a). A disease- and phosphorylation-related nonmechanical function for keratin 8. J. Cell Biol. *174*, 115–125.

Ku, N.O., and Omary, M.B. (1995). Identification and mutational analysis of the glycosylation sites of human keratin 18. J. Biol. Chem. *270*, 11820–11827.

Kwak, T.K., Kim, H., Jung, O., Lee, S.-A., Kang, M., Kim, H.J., Park, J.-M., Kim, S.-H., and Lee, J.W. (2010). Glucosamine treatment-mediated O-GlcNAc modification of paxillin depends on adhesion state of rat insulinoma INS-1 cells. J. Biol. Chem. 285, 36021–36031.

L

Lazarus, B.D., Roos, M.D., and Hanover, J.A. (2005). Mutational analysis of the catalytic domain of O-linked N-acetylglucosaminyl transferase. J. Biol. Chem. 280, 35537–35544.
Lazarus, B.D., Love, D.C., and Hanover, J.A. (2006). Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. Glycobiology 16, 415–421.

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, 564–567.

Lee, J., Kim, K.-Y., Lee, J., and Paik, Y.-K. (2010). Regulation of Dauer Formation by O-GlcNAcylation in Caenorhabditis elegans. J Biol Chem 285, 2930–2939.

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. Biochim. Biophys. Acta 1472, 71–81.

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. Biochim. Biophys. Acta 1800, 67–79.

Lefebvre, T., Drougat, L., Olivier-van Stichelen, S., Michalsk, J.C., et Vercoutter-Edouart, A.S, Antibodies and Activity Measurements for the Detection of O-GlcNAc Transferase and Assay of its Substrate, UDP-GlcNAc. Glycosyltransferases: Methods and Protocols' of Methods in Molecular Biology. *in press*

Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia 51, 216–226.

Li J, Deng M, Wei Q, Liu T, Tong X, et Ye X. (2011). Phosphorylation of MCM3 protein by cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) regulates its function in cell cycle. J. Biol. Chem. 286: 39776-39785.

Li, J., Huang, C., Zhang, L., Lin, L., Li, Z., Zhang, F., and Wang, P. (2010). Isoforms of human O-GlcNAcase show distinct catalytic efficiencies. Biochemistry Mosc. 75, 938–943.

Liang, J., and Slingerland, J.M. (2003). Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. Cell Cycle 2, 339–345.

Liao, J., Lowthert, L.A., Ku, N.O., Fernandez, R., and Omary, M.B. (1995). Dynamics of human keratin 18 phosphorylation: polarized distribution of phosphorylated keratins in simple epithelial tissues. J. Cell Biol. *131*, 1291–1301.

Lidke, D.S., Huang, F., Post, J.N., Rieger, B., Wilsbacher, J., Thomas, J.L., Pouysségur, J., Jovin, T.M., and Lenormand, P. (2010). ERK Nuclear Translocation Is Dimerization-independent but Controlled by the Rate of Phosphorylation♦. J Biol Chem *285*, 3092–3102.

Lim, K., and Chang, H.-I. (2009). O-GlcNAc inhibits interaction between Sp1 and Elf-1 transcription factors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 380, 569–574.

Lim, K., and Chang, H.-I. (2009). O-GlcNAcylation of Sp1 interrupts Sp1 interaction with NF-Y. Biochem. Biophys. Res. Commun. 382, 593–597.

Lim, K., and Chang, H.-I. (2010). O-GlcNAc inhibits interaction between Sp1 and sterol regulatory element binding protein 2. Biochem. Biophys. Res. Commun. 393, 314–318.

Lin DI, Aggarwal P, et Diehl JA. (2008). Phosphorylation of MCM3 on Ser-112 regulates its incorporation into the MCM2-7 complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 8079-8084.

Liu, K., Paterson, A.J., Zhang, F., McAndrew, J., Fukuchi, K.-I., Wyss, J.M., Peng, L., Hu, Y., and Kudlow, J.E. (2004). Accumulation of protein O-GlcNAc modification inhibits proteasomes in the brain and coincides with neuronal apoptosis in brain areas with high O-GlcNAc metabolism. J. Neurochem. 89, 1044–1055.

Lobenhofer, E.K., Huper, G., Iglehart, J.D., and Marks, J.R. (2000). Inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activity in MCF-7 cells prevents estrogen-induced mitogenesis. Cell Growth Differ. *11*, 99–110.

Lolli G, et Johnson LN. (2005). CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? Cell Cycle 4: 572-577.

Losiewicz MD, Carlson BA, Kaur G, Sausville EA, et Worland PJ. (1994). Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. Biochem. Biophys. Res. Commun. 201: 589-595.

Love, D.C., Kochran, J., Cathey, R.L., Shin, S.-H., and Hanover, J.A. (2003). Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. J Cell Sci 116, 647–654.

Love, D.C., and Hanover, J.A. (2005). The Hexosamine Signaling Pathway: Deciphering the "O-GlcNAc Code."Sci. STKE 2005, re13.

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. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 7413–7418.

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. J. Biol. Chem. 272, 9316–9324.

Lukas J, Lukas C, et Bartek J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. DNA Repair (Amst.) 3: 997-1007.

Luo, B., Soesanto, Y., and McClain, D.A. (2008). Protein modification by O-linked GlcNAc reduces angiogenesis by inhibiting AKT activity in endothelial cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 28, 651–657.

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. J. Biol. Chem. 287, 11070–11081.

M

Ma XM, et Blenis J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. Nature Reviews Molecular Cell Biology 10: 307-318.

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. J. Biol. Chem. 280, 25313–25322.

Macauley, M.S., and Vocadlo, D.J. (2009). Enzymatic characterization and inhibition of the nuclear variant of human O-GlcNAcase. Carbohydr. Res. 344, 1079–1084.

Magnuson B, Ekim B, et Fingar DC. (2012). Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. Biochem. J. 441: 1-21.

Maiato H, DeLuca J, Salmon ED, et Earnshaw WC. (2004). The dynamic kinetochore-microtubule interface. J. Cell. Sci. 117: 5461-5477.

Maiorano D, Moreau J, et Méchali M. (2000). XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in Xenopus laevis. Nature 404: 622-625.

Mairesse, J., Vercoutter-Edouart, A.S., Marrocco, J., Zuena, A.R., Giovine, A., Nicoletti, F., Michalski, J.C., Maccari, S., and Morley-Fletcher, S. (2011). Proteomic characterization in the hippocampus of prenatally stressed rats. Journal of Proteomics.

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. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285, E584–591.

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. J. Biol. Chem. 281, 3642–3650.

Malumbres M, et Barbacid M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. Trends Biochem. Sci. 30: 630-641.

Malumbres M, Harlow E, Hunt T, Hunter T, Lahti JM, Manning G, et al. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. Nat. Cell Biol. 11: 1275-1276.

Mandal, M., Vadlamudi, R., Nguyen, D., Wang, R.A., Costa, L., Bagheri-Yarmand, R., Mendelsohn, J., and Kumar, R. (2001). Growth factors regulate heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K expression and function. J. Biol. Chem. *276*, 9699–9704.

Marin, D.P., Bolin, A.P., Macedo, R. de C.S., Sampaio, S.C., and Otton, R. (2011). ROS production in neutrophils from alloxan-induced diabetic rats treated in vivo with astaxanthin. Int. Immunopharmacol. 11, 103–109.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. Biochim. Biophys. Acta 1773: 1263-1284.

Meggio, F., and Pinna, L.A. (2003). One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? FASEB J 17, 349–368.

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. J. Biochem. 151, 439–446.

Meijer L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. Oncologie. 5: 311-326.

Méndez J, et Stillman B. (2003). Perpetuating the double helix: molecular machines at eukaryotic DNA replication origins. Bioessays 25: 1158-1167.

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. Biochim. Biophys. Acta 1812, 514–519.

Michael D, et Oren M. (2003). The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. Semin. Cancer Biol. 13: 49-58.

Miura, Y., Sakurai, Y., and Endo, T. (2012). O-GlcNAc modification affects the ATM-mediated DNA damage response. Biochim. Biophys. Acta 1820, 1678–1685.

Mizuuchi, E., Semba, S., Kodama, Y., and Yokozaki, H. (2009). Down-modulation of keratin 8 phosphorylation levels by PRL-3 contributes to colorectal carcinoma progression. Int. J. Cancer *124*, 1802–1810.

Montagnoli A, Valsasina B, Brotherton D, Troiani S, Rainoldi S, Tenca P, et al. (2006). Identification of Mcm2 phosphorylation sites by S-phase-regulating kinases. J. Biol. Chem. 281: 10281-10290.

Morgan DO. (1995). Principles of CDK regulation. Nature 374: 131-134.

Moses AM, Hériché J-K, et Durbin R. (2007). Clustering of phosphorylation site recognition motifs can be exploited to predict the targets of cyclin-dependent kinase. Genome Biol. 8: R23.

Moyer SE, Lewis PW, et Botchan MR. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103: 10236-10241.

Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, et Dunphy WG. (1995). Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. Science 270: 86-90.

Muise-Helmericks, R.C., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Malstrom, S.E., Tsichlis, P.N., and Rosen, N. (1998). Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. J. Biol. Chem. *273*, 29864–29872.

Müller H, et Helin K. (2000). The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. Biochim. Biophys. Acta 1470: M1-12.

Musacchio A, et Salmon ED. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8: 379-393.

N

Nakayama, K.I., and Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. Nat. Rev. Cancer *6*, 369–381.

Nandi, A., Sprung, R., Barma, D.K., Zhao, Y., Kim, S.C., Falck, J.R., and Zhao, Y. (2006). Global identification of O-GlcNAc-modified proteins. Anal. Chem. *78*, 452–458.

Nigg EA, et Stearns T. (2011). The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. Nat. Cell Biol. 13: 1154-1160.

Nigg EA. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2: 21-32.

Nilsson I, et Hoffmann I. (2000). Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. Prog Cell Cycle Res 4: 107-114.

Nolte, D., and Müller, U. (2002). Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1. Mamm. Genome 13, 62–64.

Noton E, et Diffley JF. (2000). CDK inactivation is the only essential function of the APC/C and the mitotic exit network proteins for origin resetting during mitosis. Mol. Cell 5: 85-95.

O

O'Donnell, N., Zachara, N.E., Hart, G.W., and Marth, J.D. (2004). Ogt-Dependent X-Chromosome-Linked Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability. Mol Cell Biol 24, 1680–1690.

Obici, S., and Rossetti, L. (2003). Minireview: Nutrient Sensing and the Regulation of Insulin Action and Energy Balance. Endocrinology 144, 5172–5178.

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. Nat. Cell Biol. 10, 1224–1231.

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., et al. (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. Sci Signal *3*, ra3.

Olszewski, N.E., West, C.M., Sassi, S.O., and Hartweck, L.M. (2010). O-GlcNAc protein modification in plants: Evolution and function. Biochim. Biophys. Acta 1800, 49–56.

Omary, M.B., and Ku, N.-O. (2006). Cell biology: skin care by keratins. Nature *441*, 296–297.

Osthus RC, Shim H, Kim S, Li Q, Reddy R, Mukherjee M, et al. (2000). Deregulation of Glucose Transporter 1 and Glycolytic Gene Expression by c-Myc. J. Biol. Chem. 275: 21797-21800.

Ostrowski, J., and Bomsztyk, K. (2003). Nuclear shift of hnRNP K protein in neoplasms and other states of enhanced cell proliferation. Br J Cancer *89*, 1493–1501.

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. Mol. Cell Proteomics 11, 467–477.

Özcan, S., Andrali, S.S., and Cantrell, J.E.L. (2010). Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. Biochim Biophys Acta 1799, 353–364.

P

Pardee AB, Li CJ, et Reddy GPV. (2004). Regulation in S phase by E2F. Cell Cycle 3: 1091-1094.

Park, J., Kwon, H., Kang, Y., and Kim, Y. (2007). Proteomic analysis of O-GlcNAc modifications derived from streptozotocin and glucosamine induced beta-cell apoptosis. J. Biochem. Mol. Biol. 40, 1058–1068.

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. Exp. Mol. Med. 37, 220–229.

Parry DH, Hickson GRX, et O'Farrell PH. (2003). Cyclin B destruction triggers changes in kinetochore behavior essential for successful anaphase. Curr. Biol. 13: 647-653.

Pathak, S., Dorfmueller, H.C., Borodkin, V.S., and van Aalten, D.M.F. (2008). Chemical dissection of the link between streptozotocin, O-GlcNAc, and pancreatic cell death. Chem. Biol. 15, 799–807.

Pavletich NP. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. J. Mol. Biol. 287: 821-828.

Perez-Cervera, Y., Harichaux, G., Schmidt, J., Debierre-Grockiego, F., Dehennaut, V., Bieker, U., Meurice, E., Lefebvre, T., and Schwarz, R.T. (2011). Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan Toxoplasma gondii: a biochemical and bioinformatic study. Amino Acids 40, 847–856.

Perou, C.M., Jeffrey, S.S., van de Rijn, M., Rees, C.A., Eisen, M.B., Ross, D.T., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Zhu, S.X., Lee, J.C., et al. (1999). Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 9212–9217.

Peters J-M. (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. Mol. Cell 9: 931-943.

Peters J-M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7: 644-656.

Plas DR, Talapatra S, Edinger AL, Rathmell JC, et Thompson CB. (2001). Akt and Bcl-xL promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology. J. Biol. Chem. 276: 12041-12048.

Poon RY, et Hunter T. (1995). Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. Science 270: 90-93.

Pozarowski, P., and Darzynkiewicz, Z. (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. Methods Mol. Biol. *281*, 301–311.

Q

Quintart, J., Leroy-Houyet, M.A., Trouet, A., and Baudhuin, P. (1979). Endocytosis and chloroquine accumulation during the cell cycle of hepatoma cells in culture. J. Cell Biol. 82, 644–653.

R

Randell JCW, Bowers JL, Rodríguez HK, et Bell SP. (2006). Sequential ATP hydrolysis by Cdc6 and ORC directs loading of the Mcm2-7 helicase. Mol. Cell 21: 29-39.

Raught B, Gingras AC, et Sonenberg N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 7037-7044.

Raught B, Peiretti F, Gingras A-C, Livingstone M, Shahbazian D, Mayeur GL, et al. (2004). Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. EMBO J. 23: 1761-1769.

Raul, U., Sawant, S., Dange, P., Kalraiya, R., Ingle, A., and Vaidya, M. (2004). Implications of cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: induction of transformed phenotype. Int. J. Cancer *111*, 662–668.

Reason, A.J., Morris, H.R., Panico, M., Marais, R., Treisman, R.H., Haltiwanger, R.S., Hart, G.W., Kelly, W.G., and Dell, A. (1992). Localization of O-GlcNAc modification on the serum response transcription factor. J. Biol. Chem. 267, 16911–16921.

Ren S, et Rollins BJ. (2004). Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit. Cell 117: 239-251.

Rexach, J.E., Rogers, C.J., Yu, S.-H., Tao, J., Sun, Y.E., and Hsieh-Wilson, L.C. (2010). Quantification of O-glycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable mass tags. Nat. Chem. Biol. 6, 645–651.

Rexach, J.E., Clark, P.M., Mason, D.E., Neve, R.L., Peters, E.C., and Hsieh-Wilson, L.C. (2012). Dynamic O-GlcNAc Modification Regulates CREB-Mediated Gene Expression and Memory Formation. Nat Chem Biol 8, 253–261.

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. Sci Signal 4, rs3.

Rodier F, Campisi J, et Bhaumik D. (2007). Two faces of p53: aging and tumor suppression. Nucleic Acids Res 35: 7475-7484.

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. Mol. Cell. Biol. 17, 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. Proc. Assoc. Am. Physicians 110, 422–432.

Roux PP, et Blenis J. (2004). ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 320-344.

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. Clin. Lab. 58, 579–583.

Rubinfeld H, et Seger R. (2005). The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. Mol. Biotechnol. 31: 151-174.

Ryu, I.-H., and Do, S.-I. (2011). Denitrosylation of S-nitrosylated OGT is triggered in LPS-stimulated innate immune response. Biochem. Biophys. Res. Commun. 408, 52–57.

S

Sakabe, K., and Hart, G.W. (2010). O-GlcNAc transferase regulates mitotic chromatin dynamics. J. Biol. Chem. *285*, 34460–34468.

Sakabe, K., Wang, Z., and Hart, G.W. (2010). β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 19915–19920.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, et Linn S. (2004). Molecular Mechanisms of Mammalian Dna Repair and the Dna Damage Checkpoints. Annual Review of Biochemistry 73: 39-85.

Sato M, Gotow T, You Z, Komamura-Kohno Y, Uchiyama Y, Yabuta N, et al. (2000). Electron microscopic observation and single-stranded DNA binding activity of the Mcm4,6,7 complex. J. Mol. Biol. 300: 421-431.

Schafer KA. (1998). The cell cycle: a review. Vet. Pathol. 35: 461-478.

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. J. Bacteriol. 186, 6721–6727.

Schlummer, S., Vetter, R., Kuder, N., Henkel, A., Chen, Y.-X., Li, Y.-M., Kuhlmann, J., and Waldmann, H. (2006). Influence of serine O-glycosylation or O-phosphorylation close to the vJun nuclear localisation sequence on nuclear import. Chembiochem 7, 88–97.

Schmelzle T, et Hall MN. (2000). TOR, a central controller of cell growth. Cell 103: 253-262.

Schouppe, D., Ghesquière, B., Menschaert, G., De Vos, W.H., Bourque, S., Trooskens, G., Proost, P., Gevaert, K., and Van Damme, E.J.M. (2011). Interaction of the tobacco lectin with histone proteins. Plant Physiol. 155, 1091–1102.

Schultz, J., and Pils, B. (2002). Prediction of structure and functional residues for O-GlcNAcase, a divergent homologue of acetyltransferases. FEBS Lett. 529, 179–182.

Schwacha A, et Bell SP. (2001). Interactions between two catalytically distinct MCM subgroups are essential for coordinated ATP hydrolysis and DNA replication. Mol. Cell 8: 1093-1104.

Schwartz GK, et Shah MA. (2005). Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. J. Clin. Oncol. 23: 9408-9421.

Semple JW, Da-Silva LF, Jervis EJ, Ah-Kee J, Al-Attar H, Kummer L, et al. (2006). An essential role for Orc6 in DNA replication through maintenance of pre-replicative complexes. EMBO J. 25: 5150-5158.

Senderowicz AM. (1999). Flavopiridol: the first cyclin-dependent kinase inhibitor in human clinical trials. Invest New Drugs 17: 313-320.

Shafi, R., Iyer, S.P.N., 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. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 5735–5739.

Shahbazian D, Roux PP, Mieulet V, Cohen MS, Raught B, Taunton J, et al. (2006). The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. The EMBO Journal 25: 2781-2791.

Sherr CJ, et Roberts JM. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev. 13: 1501-1512.

Shi, Y., Tomic, J., Wen, F., Shaha, S., Bahlo, A., Harrison, R., Dennis, J.W., Williams, R., Gross, B.J., Walker, S., et al. (2010). Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. Leukemia 24, 1588–1598.

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, 885–893.

Simons, A.L., Mattson, D.M., Dornfeld, K., and Spitz, D.R. (2009). Glucose deprivation-induced metabolic oxidative stress and cancer therapy. J Cancer Res Ther 5 Suppl 1, S2–6.

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. Mol. Biol. Cell 19, 4130–4140.

Slawson, C., Pidala, J., and Potter, R. (2001). Increased N-acetyl-β-glucosaminidase activity in primary breast carcinomas corresponds to a decrease in N-acetylglucosamine containing proteins. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 1537, 147–157.

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. J. Biol. Chem. 280, 32944–32956.

Soesanto, Y.A., Luo, B., Jones, D., Taylor, R., Gabrielsen, J.S., Parker, G., and McClain, D.A. (2008). Regulation of AKT signaling by O-GlcNAc in euglycemia. Am J Physiol Endocrinol Metab 295, E974–E980.

Solomon, S.S., Majumdar, G., Martinez-Hernandez, A., and Raghow, R. (2008). A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones. Life Sci. 83, 305–312.

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. Cell. Signal. 20, 94–104.

Speck C, et Stillman B. (2007). Cdc6 ATPase activity regulates ORC x Cdc6 stability and the selection of specific DNA sequences as origins of DNA replication. J. Biol. Chem. 282: 11705-11714.

Spruck CH, et Strohmaier HM. (2002). Seek and destroy: SCF ubiquitin ligases in mammalian cell cycle control. Cell Cycle 1: 250-254.

Srikanth, B., Vaidya, M.M., and Kalraiya, R.D. (2010). O-GlcNAcylation determines the solubility, filament organization, and stability of keratins 8 and 18. J. Biol. Chem. 285, 34062–34071.

Sudakin V, Chan GK, et Yen TJ. (2001).(a). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. J. Cell Biol. 154: 925-936.

Sutherland C, Leighton IA, et Cohen P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. Biochem. J. 296 (Pt 1): 15-19.

T

Tai, H.-C., Khidekel, N., Ficarro, S.B., Peters, E.C., and Hsieh-Wilson, L.C. (2004). Parallel identification of O-GlcNAc-modified proteins from cell lysates. J. Am. Chem. Soc. 126, 10500–10501.

Takisawa H, Mimura S, et Kubota Y. (2000). Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex. Curr. Opin. Cell Biol. 12: 690-696.

Tao, G.-Z., Kirby, C., Whelan, S.A., Rossi, F., Bi, X., MacLaren, M., Gentalen, E., O'Neill, R.A., Hart, G.W., and Omary, M.B. (2006). Reciprocal keratin 18 Ser48 O-GlcNAcylation and Ser52 phosphorylation using peptide analysis. Biochem. Biophys. Res. Commun. *351*, 708–712.

Tarrant, M.K., Rho, H.-S., Xie, Z., Jiang, Y.L., Gross, C., Culhane, J.C., Yan, G., Qian, J., Ichikawa, Y., Matsuoka, T., et al. (2012). Regulation of CK2 by phosphorylation and O-GlcNAcylation revealed by semisynthesis. Nat. Chem. Biol. 8, 262–269.

Taylor, R.P., Parker, G.J., Hazel, M.W., Soesanto, Y., Fuller, W., Yazzie, M.J., and McClain, D.A. (2008). Glucose deprivation stimulates O-GlcNAc modification of proteins through up-regulation of O-linked N-acetylglucosaminyltransferase. J. Biol. Chem. 283, 6050–6057.

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. Nat. Chem. Biol. 6, 338–343.

Toleman, C., Paterson, A.J., Whisenhunt, T.R., and Kudlow, J.E. (2004). Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. J. Biol. Chem. 279, 53665–53673.

Toleman, C., Paterson, A.J., Shin, R., and Kudlow, J.E. (2006). Streptozotocin inhibits O-GlcNAcase via the production of a transition state analog. Biochem. Biophys. Res. Commun. 340, 526–534.

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. J. Biol. Chem. 259, 3308–3317.

Trinidad, J.C., Barkan, D.T., Gulledge, 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. Mol. Cell Proteomics 11, 215–229.

Tsuchiya, A., Tashiro, E., Yoshida, M., and Imoto, M. (2005). Involvement of nuclear accumulation of heat shock protein 27 in leptomycin B-induced apoptosis in HeLa cells. J. Antibiot. *58*, 810–816.

Tsuji, T., Ficarro, S.B., and Jiang, W. (2006). Essential role of phosphorylation of MCM2 by Cdc7/Dbf4 in the initiation of DNA replication in mammalian cells. Mol. Biol. Cell 17, 4459–4472.

Tudzarova, S., Colombo, S.L., Stoeber, K., Carcamo, S., Williams, G.H., and Moncada, S. (2011). Two ubiquitin ligases, APC/C-Cdh1 and SKP1-CUL1-F (SCF)-β-TrCP, sequentially regulate glycolysis during the cell cycle. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 5278–5283.

V

Verhagen, J., Donnelly, M., and Elliott, G. (2006). Characterization of a novel transferable CRM-1-independent nuclear export signal in a herpesvirus tegument protein that shuttles between the nucleus and cytoplasm. J. Virol. *80*, 10021–10035.

Viatour, P., Merville, M.-P., Bours, V., and Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF-kappaB and IkappaB proteins: implications in cancer and inflammation. Trends Biochem. Sci. 30, 43–52.

Villén J, Beausoleil SA, Gerber SA, et Gygi SP. (2007). Large-scale phosphorylation analysis of mouse liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104: 1488-1493.

Vogelstein B, Lane D, et Levine AJ. (2000). Surfing the p53 network. Nature 408: 307-310.

Vosseller, K., Wells, L., Lane, M.D., and Hart, G.W. (2002). Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in AKT activation in 3T3-L1 adipocytes. PNAS 99, 5313–5318.

W

Wang, B., David, M.D., and Schrader, J.W. (2005). Absence of caprin-1 results in defects in cellular proliferation. J. Immunol. *175*, 4274–4282.

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, 91.

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. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 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. Mol. Cell Proteomics 6, 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: potential biomarker(s) for diabetes. Diabetes *58*, 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. Mol. Cell Proteomics 9, 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. Sci Signal 3, ra2.

Wang, S., Huang, X., Sun, D., Xin, X., Pan, Q., Peng, S., Liang, Z., Luo, C., Yang, Y., Jiang, H., et al. (2012). Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates Akt signaling. PLoS ONE 7, e37427.

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 β-N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE, O-GlcNAcase. J. Biol. Chem. 277, 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. J. Biol. Chem. 279, 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, 877–883.

Whelan, S.A., Lane, M.D., and Hart, G.W. (2008). Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. J. Biol. Chem. 283, 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, 551–563.

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., et al. (2002). Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. Mol. Biol. Cell 13, 1977–2000.

Winston, J.T., and Pledger, W.J. (1993). Growth factor regulation of cyclin D1 mRNA expression through protein synthesis-dependent and -independent mechanisms. Mol. Biol. Cell *4*, 1133–1144.

Wojnar, A., Pula, B., Piotrowska, A., Jethon, A., Kujawa, K., Kobierzycki, C., Rys, J., Podhorska-Okolow, M., and Dziegiel, P. (2011). Correlation of intensity of MT-I/II expression with Ki-67 and MCM-2 proteins in invasive ductal breast carcinoma. Anticancer Res. 31, 3027–3033.

Woo RA, et Poon RYC. (2003). Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. Cell Cycle 2: 316-324.

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. Anal. Biochem. 354, 43–53.

Wysocka, J., Myers, M.P., Laherty, C.D., Eisenman, R.N., and Herr, W. (2003). Human Sin3 deacetylase and trithorax-related Set1/Ash2 histone H3-K4 methyltransferase are tethered together selectively by the cell-proliferation factor HCF-1. Genes Dev. 17, 896–911.

X

Xing J, Ginty DD, et Greenberg ME. (1996). Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. Science 273: 959-963.

Xing, D., Gong, K., Feng, W., Nozell, S.E., Chen, Y.-F., Chatham, J.C., and Oparil, S. (2011). O-GlcNAc modification of NFκB p65 inhibits TNF-α-induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells. PLoS ONE 6, e24021.

Xirodimas DP, Stephen CW, et Lane DP. (2001). Cocompartmentalization of p53 and Mdm2 is a major determinant for Mdm2-mediated degradation of p53. Exp. Cell Res. 270: 66-77.

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, e36717.

Y

Yalcin A, Clem BF, Simmons A, Lane A, Nelson K, Clem AL, et al. (2009). Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. J. Biol. Chem. 284: 24223-24232.

Yang J, Cron P, Thompson V, Good VM, Hess D, Hemmings BA, et al. (2002). Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/AKT by hydrophobic motif phosphorylation. Mol. Cell 9: 1227-1240.

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, 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). NFkappaB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 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., et al. (2008). Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. Nature 451, 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, 69–80.

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., et al. (2012). O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. Aging Cell.

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. J. Biol. Chem. 287, 28755–28769.

Yi, W., Clark, P.M., Mason, D.E., Keenan, M.C., Hill, C., Goddard, W.A., 3rd, Peters, E.C., Driggers, E.M., and Hsieh-Wilson, L.C. (2012). Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. Science 337, 975–980.

Yoshida, M., Nishikawa, M., Nishi, K., Abe, K., Horinouchi, S., and Beppu, T. (1990). Effects of leptomycin B on the cell cycle of fibroblasts and fission yeast cells. Exp. Cell Res. *187*, 150–156.

Yu Y, Yoon S-O, Poulogiannis G, Yang Q, Ma XM, Villén J, et al. (2011). Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. Science 332: 1322-1326.

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., et al. (2008). A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. Nat. Chem. Biol. *4*, 483–490.

Z

Zachara, N.E., and Hart, G.W. (2006). Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! Biochim. Biophys. Acta 1761, 599–617.

Zachara, N.E. (2012). The roles of O-linked β-N-acetylglucosamine in cardiovascular physiology and disease. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 302, H1905–1918.

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. J. Biol. Chem. *279*, 30133–30142.

Zacksenhaus, E., Bremner, R., Phillips, R.A., and Gallie, B.L. (1993). A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biological activity. Mol Cell Biol *13*, 4588–4599.

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. Mol Biol Cell 21, 1922–1936.

Zeller, K.I., Zhao, X., Lee, C.W.H., Chiu, K.P., Yao, F., Yustein, J.T., Ooi, H.S., Orlov, Y.L., Shahab, A., Yong, H.C., et al. (2006). Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. Proceedings of the National Academy of Sciences *103*, 17834–17839.

Zetterberg, A., Larsson, O., et Wiman, K.G. (1995). What is the restriction point? Curr. Opin. Cell Biol. 7: 835-842.

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, 715–725.

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. J. Biol. Chem. *286*, 37483–37495.

Zhang, W., Tong, Q., Li, S., Wang, X., and Wang, Q. (2008). MG-132 inhibits telomerase activity, induces apoptosis and G(1) arrest associated with upregulated p27kip1 expression and downregulated survivin expression in gastric carcinoma cells. Cancer Invest. *26*, 1032–1036.

Zhao Y, Bjørbæk C, et Moller DE. (1996). Regulation and Interaction of pp90rsk Isoforms with Mitogen-activated Protein Kinases. J. Biol. Chem. 271: 29773-29779.

Zhao, P., Viner, R., Teo, C.F., Boons, G.-J., Horn, D., and Wells, L. (2011). Combining high-energy C-trap dissociation and electron transfer dissociation for protein O-GlcNAc modification site assignment. J. Proteome Res. 10, 4088–4104.

Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H., and Hung, M.C. (2001). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. Nat. Cell Biol. *3*, 245–252.

Zou, L., et Stillman, B. (2000). Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. Mol. Cell. Biol. 20: 3086-3096.

Zou, L., Zhu-Mauldin, X., Marchase, R.B., Paterson, A.J., Liu, J., Yang, Q., and Chatham, J.C.. (2012) Glucose deprivation induced increase in protein O-GlcNAcylation in cardiomyocytes is calcium dependent. J. Biol. Chem.

ANNEXES

Résumé

Il est connu depuis longtemps que la phosphorylation et l'ubiquitination des protéines jouent un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire. Depuis une dizaine d'années, plusieurs travaux dont ceux de notre équipe, ont montré l'importance d'une autre modification post-traductionnelle pour la progression normale du cycle cellulaire et plus particulièrement de la mitose : la *O*-GlcNAcylation. C'est une *O*-glycosylation atypique car dynamique et réversible, très conservée chez les Eucaryotes. Elle est régulée par l'OGT (*O*-GlcNAc transférase) qui transfère un résidu unique de GlcNAc à partir de l'UDP-GlcNAc sur les sérines ou thréonines de protéines intracellulaires, et l'OGA (O-GlcNAcase) capable d'hydrolyser ce résidu.

L'objectif de mes travaux de thèse était de mieux comprendre comment la balance *O*-GlcNAc participe au contrôle de la prolifération cellulaire en se focalisant sur l'entrée dans le cycle cellulaire et la transition G1/S. Dans un premier temps, grâce à différentes approches expérimentales, nous avons caractérisé la dynamique de *O*-GlcNAcylation au cours des phases précoces du cycle cellulaire. Nous avons mis en évidence dans différentes lignées cellulaires une baisse importante du niveau global de *O*-GlcNAcylation lors de l'entrée des cellules synchronisées en phase S. Nous avons montré dans les cellules MCF7 que cette diminution est corrélée à une augmentation de l'expression et de l'activité de l'OGA endogène. Dans un second temps, en couplant la séparation des protéines par électrophorèse bidimensionnelle, la détection des protéines *O*-GlcNAcylées par western-blot et le séquençage peptidique par spectrométrie de masse en tandem, nous avons identifié une soixantaine de protéines cytosoliques et nucléaires différentiellement *O*-GlcNAcylées entre les phases G0, G1 et S. Ces protéines interviennent dans des processus cellulaires essentiels à la phase G1 tels que la mise en conformation des protéines ou la régulation de la transcription et de la traduction. Par immunoprécipitation, nous avons validé les variations de la *O*-GlcNAcylation de la cytokératine 8, de l'hnRNP K impliquée dans la maturation des ARNm, de la Caprine-1 (cell-cycle associated protein-1) et des protéines MiniChromosome Maintenance MCM3, MCM6 et MCM7 impliquées dans la formation du complexe de pré-réplication.

L'ensemble de ces travaux indique que la progression des cellules dans les phases G1 et S du cycle cellulaire est étroitement liée à la dynamique de *O*-GlcNAcylation, à travers la régulation de l'expression protéique de l'OGT et l'OGA et de l'activité de l'OGA. De plus, les résultats de protéomique apportent pour la première fois une vision globale des protéines différentiellement *O*-GlcNAcylées à la transition G1/S. Ils soulignent un rôle potentiel de la *O*-GlcNAcylation dans les mécanismes intracellulaires contrôlant l'initiation de la synthèse d'ADN et par là même, le maintien de l'intégrité génomique.