

Modulation de la carcinogenèse hépatique par une protéine de l'immunité innée REG3A

Nicolas Geoffre

▶ To cite this version:

Nicolas Geoffre. Modulation de la carcinogenèse hépatique par une protéine de l'immunité innée REG3A. Cancer. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT: 2020UPASQ030. tel-03506275

HAL Id: tel-03506275 https://theses.hal.science/tel-03506275

Submitted on 2 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





Modulation de la carcinogenèse hépatique par une protéine de l'immunité innée REG3A

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Microbiologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Inserm, Physiopathogenèse et traitement

des maladies du foie, 94800, Villejuif, France Référent : Faculté de pharmacie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 21/12/20, par

Nicolas GEOFFRE

Rapporteur & Examinateur

Rapporteur & Examinateur

Composition du Jury

Olivier ROSMORDUC

PU-PH, INSERM U1193, APHP, Université Paris-Saclay

Tarik ISSAD

DR, INSERM U1016-CNRS UMR 8104, Institut Cochin, Université Paris Descartes

Pascal PINEAU

DR, INSERM U993, Institut Pasteur

Sabine COLNOT

DR, INSERM U1138, Centre de recherche des Cordeliers Examinatrice

Président

Jamila FAIVRE

PU-PH, INSERM U1193, APHP, Université Paris-Saclay **Nicolas MONIAUX**

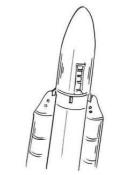
CR, INSERM U1193

Directrice de thèse

Co-Encadrant de thèse

Table des matières

rabie	e des matieres	2
Liste	des figures	6
	des tableaux	
Liste	des Abréviations	10
Avant-	propos	14
Premiè	re partie : Introduction	16
Le carc	inome hépatocellulaire	17
1.1	Physiologie hépatique	17
1.2	Épidémiologie et facteurs de risque du CHC	
1.3	Mécanismes cellulaires et moléculaires	
1.4	Classifications Moléculaires des CHCs	
1.5	Prise en charge médicale	50
La O-G	lcNAcylation des protéines : régulateur de la signalisation cellulaire	
2.1	Généralités	
2.2	Voie de biosynthèse des hexosamines	
2.3	Enzymes régulatrices	
2.4	Interaction phosphorylation/O-GlcNAcylation	
2.5	Rôles de la O-GlcNAcylation	70
La lecti	ne REG3A	82
3.1	Famille Reg	
3.2	REG3A	
3.3	Activités biologiques de REG3A	89
Deuxiè	me partie : Matériel et méthode	99
Modèl	es expérimentaux	100
Analys	e biochimique des échantillons	.103
Troisièi	ne partie : Résultats	.109
1	L'activation de la voie c-Myc est réduite dans les CHCs de souris transgéniques MYC/REC	33A-
TG.	110	
2	REG3A ralentit le développement du carcinome hépatocellulaire chez la souris transgénie	que
Мус-	-REG3A	113
3	Les niveaux nucléaires de c-Myc sont réduits dans les CHCs de souris transgénique	
MYC	/REG3A-TG	
4	Les foies prénéoplasiques et tumoraux de souris MYC/REG3A-TG présentent une réducti	
	O-GlcNAcylation des protéines.	
5	La surexpression hépatique de REG3A retarde le développement de tumeurs du foie et e	
	ciée à une réduction de la O-GlcNAcylation dans le modèle DEN	
6	REG3A réduit la O-GlcNAcylation des protéines.	
7	REG3A n'interagit pas avec l'UDP-GlcNAc ni avec les protéines O-GlcNAcylées	
Quatriè	me partie : Discussion & perspectives	.139
Riblioard	nhie	.145



« Il faut prendre de la hauteur. »

Remerciements

Quel trajet parcouru. Alors que je viens de débuter les études médicales, à la fin d'un cours de BMCP, un professeur propose de faire visiter son labo aux étudiants intéressés et pourquoi pas d'y faire un stage... Quelques jours plus tard je mets le pied pour la première fois au second étage du CHB et débute une aventure qui durera cinq années : une première pour obtenir un financement, les trois suivantes pour obtenir des résultats et une dernière pour les rédiger et les présenter.

Pour m'avoir donné cette opportunité je débute donc ces quelques mots en remerciant le Professeur Jamila Faivre, sans qui je n'aurai peut-être pas même eu l'idée d'entamer un doctorat en biologie. Je remercie ensuite le Docteur Nicolas Moniaux qui a eu la patience de me faire découvrir la paillasse et de répondre à mes questions, même les plus naïves mais dont le « 42 » a toujours su encourager la riqueur dans le travail.

Elle m'a appris de nombreuses techniques et sa participation affleure tout au long de ce mémoire, un grand merci à Alice Deshayes. De même Alexandre Dos Santos, par ailleurs le seul à me comprendre pour LaTeX et les ninjas. Patrick Gonzalez, beaucoup de bon moments et quelques récoltes à l'azote liquide infructueuses, le soir, à 21h, un vendredi.

We began this PhD together and we defended 24h apart, Dear Dr Hala Shalhoub (Congratulations!), Thank you for these years we shared at the lab.

Je remercie aussi Marie-Annick Buendia qui m'a encouragé dès le premier jour, Nassima Benzoubir, Emma Valentino, Slavka Kascakova et Vanessa Bou-Malham pour ces années.

Merci enfin au personnel de l'animalerie, pour son travail essentiel et toujours dispo, que ce soit pour répondre à mes question ou pour faire rentrer d'étranges constructions en carton par le sas. Pour finir, un coucou à toute l'équipe du service d'anapath qui me voyait parfois furtivement passer dans les volutes de xylène.

Liste des figures

Introduction:

Figure 1 - Segmentation et hile hépatique.	17
Figure 2 - Lobule hépatique et triade portale.	18
Figure 3 - Exemple histologique de foie sain.	19
Figure 4 - Zonation métabolique du foie.	20
Figure 5 – Schéma d'un hépatocyte.	20
Figure 6 - Populations cellulaires hépatique.	21
Figure 7 - Incidence globale du CHC.	23
Figure 8 - Prévalence et mortalité des cancers.	23
Figure 9 - Courbe de survie des patients atteints de CHC.	24
Figure 10 - Principales mutations présentes dans les CHCs	32
Figure 11 - Principaux SNP associés aux CHCs.	33
Figure 12 - Voie des MAPK.	36
Figure 13 - Voie Wnt/ β -caténine.	37
Figure 14 - Voie PI3K/AKT/mTOR.	38
Figure 15 - Voie JAK/STAT.	39
Figure 16 – Structure du gène et de la protéine c-Myc.	40
Figure 17 - Classification moléculaire en deux clusters. (Lee et al., 2004).	47
Figure 18 - Classification moléculaire en six groupes. (Calderaro et al., 2017)	48
Figure 19 - Classification 2004 en deux groupes. (Breuhan et al., 2004)	49
Figure 20 - Classification 2010 en trois groupes. (Hoshida et al., 2010)	50
Figure 21 - Algorithme diagnostique du CHC.	52
Figure 22 - Architectures histologiques des CHCs.	53
Figure 23 - Score histo-pronostique d'Edmonson.	54
Figure 24 - Principales modifications post-traductionnelles des protéines et impacts	
biologiques.	57
Figure 25 - Structure du N-Acetylglucosamine.	58
Figure 26 - Voie de biosynthèse des hexosamines.	60
Figure 27 - Structure des isoformes de l'OGT.	62
Figure 28 - Constantes de Michaelis-Menten de l'OGT	64
Figure 29 - Mécanisme de spécificité des OGT	64
Figure 30 - Structure des isoformes de l'OGA	66
Figure 31 - Régulation de c-MYC par la balance phosphorylation/O-GlcNAcylation.	69
Figure 32 - Voie de l'insuline et GlcNAcylation.	76
Figure 33 - Mécanismes tumoraux favorisés par l'hyperGlcNAcylation.	78
Figure 34 - Lectines de type C.	83
Figure 35 - Structure tridimensionnelle de REG3A.	87
Figure 36 - Niveau d'expression d'oncogènes dans des cellules de cancer pancréatique	
stimulées par REG3A	95

Figure 37 - Niveau d'expression de REG3A dans l'adénocarcinome gastrique. Figure 38 - Niveau d'expression de REG3A dans le carcinome hépatocellulaire	96
et mutations dans la voie WNT/ β -caténine	96
Figure 39 - Effet pro-invasif gastrique de REG3A.	97
Figure 40 - Effet anti-invasif gastrique de REG3A.	98
Matériel et Méthode :	
Figure 41 - Modèles expérimentaux murins.	102
Résultats expérimentaux :	
Figure 42 - Analyses d'enrichissement moléculaire de CHCs murins	111
Figure 43 - Enrichissement de voies de signalisation dans des CHCs humains exprimant REG3A	111
Figure 44 - Signature moléculaire associée aux CHCs REG3A positif	112
Figure 45 - Analyse d'enrichissement des voies de signalisation dans les CHCs murins	112
Figure 46 - Évolution temporelle du ratio poids du foie / poids de l'animal	113
Figure 47 - Évolution temporelle du pourcentage d'animaux porteurs d'un CHC	114
Figure 48 - Image macroscopique représentative des CHCs murins.	114
Figure 49 - Évolution du diamètre tumoral au cours de la maladie cancéreuse	115
Figure 50 - Taux de survie de souris transgéniques c-MYC et cMYC/REG3A	115
Figure 51 - Niveau d'expression protéique de régulateurs du cycle cellulaire.	116
Figure 52 - Marqueurs de prolifération, d'apoptose et de dommages à l'ADN dans	
les foies tumoraux	117
Figure 53 - Niveau d'expression de l'ARNm c-Myc dans les foies murins	118
Figure 54 - Niveau d'expression des protéines c-Myc et REG3A dans les foies en	
condition pré-néoplasique.	119
Figure 55 - Niveau d'expression des protéines c-Myc et REG3A dans les foies tumoraux	119
Figure 56 - Ratio nucléo-cytoplasmique de c-Myc dans les foies tumoraux.	120
Figure 57 - Niveau d'expression nucléo-cytoplasmique de c-Myc total et phosphorylé	
dans les foies tumoraux.	120
Figure 58 - Niveau d'expression nucléo-cytoplasmique de c-Myc total et phosphorylé	404
dans les foies pré-néoplasiques.	121
Figure 59 - Niveau d'expression/activation des kinases GSK3 β et ERK.	122
Figure 60 - Niveau global des protéines O-GlcNAcylées dans des foies sains,	122
pré-néoplasiques et tumoraux (modèle génétique).	123
Figure 61 - Niveau global des protéines O-GlcNAcylées nucléocytoplasmiques dans	124
des foies pré-néoplasiques et tumoraux (modèle génétique).	124
Figure 62 - Cinétique du développement des CHCs chimio-induits.	126
Figure 63 - Niveau global des protéines O-GlcNAcylées nucléocytoplasmiques dans des foies tumoraux (modèle chimio-induit).	127
Figure 64 - Immunoblot anti-REG3A dans des cellules HuH7 transfectées.	127
rigare or immunosiot until Neosti duns des cellules Hurit d'alisièctées.	161

Figure 65 - Niveau d'expression de l'ARNm c-Myc dans des cellules HuH7 transfectées.	128
Figure 66 - Niveau d'expression protéique nucléocytoplasmique de c-Myc endogène	
total et phosphorylé dans des cellules HuH7 exprimant REG3A.	129
Figure 67 - Niveau d'expression protéique nucléocytoplasmique de c-Myc exogène	
total et phosphorylé dans des cellules HuH7 exprimant REG3A.	130
Figure 68 - Niveau d'expression protéique de c-Myc total dans des cellules HuH7	
stimulées par une protéine recombinante REG3A.	130
Figure 69 - Niveau d'expression protéique des kinases GSK3 eta et ERK dans des cellules	
HuH7 exprimant REG3A.	131
Figure 70 - Niveau global des protéines O-GlcNAcylées nucléocytoplasmiques dans des	
cellules HuH7 exprimant REG3A	131
Figure 71 - Index de prolifération des cellules HuH7 stimulées par REG3A.	132
Figure 72 - Niveau d'expression de l'ARNm OGT dans des foies tumoraux.	133
Figure 73 - Niveau d'expression protéique de OGT dans des foies pré-néoplasiques et	
tumoraux.	133
Figure 74 - Analyse en slot blot de l'interaction de la protéine REG3A avec des sucres.	134
Figure 75 - Immunoblot anti-REG3A pour l'étude de l'interaction de REG3A avec les	
protéines O-GlcNAcylées cellulaires.	135
Figure 76 - A Immunoblot anti-GlcNAc pour l'étude de l'interaction de REG3A avec les	
protéines O-GlcNAcylées cellulaires.	136
Figure 77 - Mesure de la glycémie murine.	137
Figure 78 - Concentration hépatique en glycogène.	137
Figure 79 - Métabolisme énergétique de cellules HuH7 exprimant REG3A	138

Liste des tableaux

Introduction:

Tableau 1 - Nomenclature des protéines Reg.	82
Tableau 2 - Homologie des protéines REG humaines et murines	82
Tableau 3 - Sites de clivage de REG3A.	86
Tableau 4 - Profil d'expression de REG3A en condition normale et pathologique.	87
Tableau 5 - Publications traitant de REG3A dans le cancer.	92
Matériel et Méthode :	
Tableau 6 - Schémas expérimentaux.	99
Tableau 7 - Liste des anticorps utilisés.	104
Tableau 8 - Liste des oligonucléotides utilisées.	106

Liste des Abréviations

<u>A</u>

AD Maladie d'Alzheimer AFP alpha-fœtoprotéine

APC Adenomatous Polyposis Coli APP Protéine précurseur de l'amyloïde

<u>B</u>

BAGDP benzyl 2-acetamido-2-deoxy- α -D-galactopyranoside

<u>C</u>

CCA Cholangiocarcinome

CCN Cycline

CD Domaine catalytique

CDH Cadhérine

CHC Carcinome hépatocellulaire

ChREBP protéine de liaison des éléments de réponse aux carbohydrates

CIN instabilité chromosomique

CK caséine kinase CMV cytomégalovirus

c-MYC oncogène cellulaire myélocytose

CRD domaine de reconnaissance des carbohydrates

CTL lectines de type C

<u>D</u>

DEN Diéthylnitrosamine
DNMT ADN méthyltransférases

<u>E</u>

EBV Virus d'Epstein-Barr

EGF Facteur de croissance épidermique

eOGT O-linked N-acetyl-glucosaminyltransferase ERK Extracellular signal-regulated kinases <u>G</u>

G6P glucose-6-phosphate

GFAT Glutamine Fructose-6-phosphate Amido Transférase

GlcNAc N-acétylglucosamine
GLUT Transporteur du glucose
GS glutamine synthétase
GSH Glutathion réduit

GSK3 glycogène synthase 3 GSSG Glutathion oxydé

GVHD Maladie du greffon contre l'hôte

<u>H</u>

HAT histone acétyltransférase

HB hépatoblastome

HBP Voie de biosynthèse de l'hexosamine

HCF Facteur de cellule hôte HDAC histone désacétylase

HIFU ultrasons focalisés de haute intensité HIP hépatocarcinome-intestin-pancréas

HSF protéine protectrice facteur de choc thermique hTERT Transcriptase inverse de la télomérase humaine

Ī

IFN Interféron

IGF facteur de croissance similaire à l'insuline

INR ratio normalisé international

IR récepteur de l'insuline

IRE électroporation irréversible

<u>J</u>

JAK kinase Janus

L

LOH perte allélique

LYVE1 récepteur hyaluronique endothélial des vaisseaux lymphatiques

M

M6PR récepteur du mannose-6-phosphate

MAPK protéine kinase activée par la mitose MDA malondialdehyde

MEC matrice extra-cellulaire

MELD modèle de maladie hépatique en phase terminale

MEOS système microsomial d'oxydation de l'alcool

mOGT OGT mitochondriale
MSI instabilité microsatellite

mTOR cible mammifère de la rapamycine MTS séquence d'adressage à la mitochondrie

MurNAc N-acétylmuramique

MWA ablation aux micro-ondes NAC N-acétylcystéine

Ν

NAFLD maladie du foie gras non alcoolique NAPQI N-acetyl-P-benzoquinone-imine

NASH stéatohépatite non alcoolique

NCOAT O-GlcNAcase et acétyltransférase nucléocytoplasmique

ncOGA OGA nucléo-cytoplasmique ncOGT OGT nucléo-cytoplasmique NOD diabète non-obésogène NUP protéines du pore nucléaire

<u>O</u>

OGA N-Acetyl- β -D glucosaminidase

OGT Uridine diphosphate-N-acetylglucosamine : polypeptide-N-acetyl

glucosaminyl-transférase

<u>P</u>

PAP protéine associée à la pancréatite

PBH ponction-biopsie hépatique PI3K phosphoinositide-3-kinase

PIAS protéines inhibitrices de STAT activé PIP3 phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PKA protéine kinase A PKB Protéine kinase B

PP2A protéine phosphatase 2A

PPO domaine de fixation des phosphoinositides

PSP protéine du calcul pancréatique PTEN homologue phosphatase et tensine PTP protéine des fibres pancréatiques <u>R</u>

RB rétinoblastome

RCPG récepteur couplée à une protéine G

REG régénérant dérivé d'îlots RFA ablation par radiofréquence

<u>S</u>

SEAT SErvice des Animaux Transgéniques

SEIVIL Service d'Expérimentation In vivo INSERM Lavoisier

SNP polymorphisme d'un seul nucléotide

SNP système nerveux périphérique SOCS suppresseur de signal cytokinique

sOGA OGA courte sOGT OGT courte

STAT transducteurs de signal et activateurs de transcription

STZ streptozotocine

<u>T</u>

TACE chimio-embolisation trans-artérielle

TAP thoraco-abdomino-pelvien

Tau protéine unité associée à la tubuline

TET protéines déméthylases translocation dix-onze

TGFB facteur de croissance transformant beta

TIPS shunt intra-hépatique par voie transjugulaire TNM tumeur-ganglion-métastase (classification) TPR domaine à répétition tétratricopeptide

<u>U</u>

UDP uridine diphosphate

UICC union internationale pour le contrôle du cancer

UNOS United Network for Organ Sharing

<u>V</u>

VEGF facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VHB Virus de l'hépatite B

W

WGA wheat germ agglutinin

WHV hépatite virale de la marmotte

Avant-propos

La première utilisation de lectines dans la recherche sur le cancer a reposé sur l'utilisation de leur capacité à fixer sélectivement différents composants glucidiques spécifiques de glycoconjugués pour la détection de nouveaux biomarqueurs (Hashim et al., 2017). Un nombre important d'études ont également relevé le rôle de nombreuses lectines dans la carcinogenèse (Gonzalez de Mejia et al., 2005 ; Ghazarian et al., 2011). Par exemple, la concanavaline A, une lectine issue du haricot Canavalia ensiformis, est capable d'initier l'autophagie de cellules cancéreuses dans un modèle murin de CHC en activant la voie de signalisation p73-FoxO1a-BIM (Lei et al., 2009). D'autres lectines déploient des capacités antiprolifératives (Quiroga et al., 2015 ; Jebali et al., 2014) ou interviennent dans le déclenchement de l'apoptose (Liu et al., 2010). Les mécanismes mis en évidence débutent généralement par la fixation de la lectine à la surface de cellules tumorales ou à un récepteur transmembranaire spécifique. L'effet produit dépend de la lectine impliquée : Certaines dérégulent des voies de signalisation intracellulaire, d'autres déclenchent l'apoptose, d'autres encore la nécrose ou l'autophagie (Raz et al., 2008 ; Li et al., 2011 ; Shi et al., 2013 ; Jiang et al., 2014). Enfin, certaines modulent la production de cytokines, leurs fonctionnalités et déclenchent une réponse immunitaire (Gonzalez de Mejia et al., 2005).

Nos travaux ont porté sur le rôle de la lectine humaine REG3A dans la carcinogenèse hépatique et les mécanismes moléculaires sous-jacents, ce rôle est controversé. Le caractère versatile « pro-» ou « anti-oncogène » de REG3A varie d'une situation expérimentale à une autre et en fonction des cellules ou de l'organe étudiés. Il y a également souvent confusion entre l'existence de niveaux parfois très importants d'expression tumorale de REG3A (notamment dans les sous-classes inflammatoires de cancer) et son supposé impact biologique davantage « pro-» qu'« anti-oncogène ». Cette erreur d'interprétation peut aussi évidemment s'appliquer pour nombre de gènes identifiés dans les analyses transcriptomiques parce qu'ils font partie des Top10, Top50... dans les signatures moléculaires. Comme l'ensemble des protéines REG, REG3A déploie des activités biologiques anti-inflammatoires, anti-oxydantes et de facteur de survie qui facilitent la régénération et la réparation de nombreux tissus endommagés. Dans un contexte tumoral ces effets pourraient cependant stimuler la croissance de cellules cancéreuses et leur dissémination métastatique. Au niveau hépatique, il existe quelques études d'expression et peu d'études fonctionnelles. Parmi ces dernières, les travaux de Cavard et al. ont montré que la surexpression de REG3A dans un sous-groupe de CHCs et d'hépatoblastome humains était associée à la présence de mutations du gène CTNNB1 codant la β-caténine.

Nos objectifs de thèse ont été les suivants : 1) étudier le phénotype tumoral induit par REG3A dans deux modèles différents de carcinogenèse du foie, l'un chimique (diéthylnitrosamine), l'autre génétique (transgène c-MYC) chez la souris. Une première étude de l'équipe d'accueil avait montré des résultats encourageants en révélant une réduction tumorale significative dans un modèle de souris transgénique exprimant REG3A. 2) Etudier les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont à l'œuvre.

Première partie : Introduction

Le carcinome hépatocellulaire

1.1 Physiologie hépatique

1.1.1 Présentation anatomique

Le foie est le plus gros organe solide de l'abdomen, pesant en moyenne 1,5 kg chez l'Homme. Il se situe dans la partie supérieure de la cavité abdominale, au niveau de l'hypochondre droit, sous la coupole diaphragmatique. Il présente une face diaphragmatique et une face viscérale et est au contact des autres organes abdominaux : à gauche se situe l'estomac, en dessous le duodénum et en arrière la surrénale et le rein droit. Enfin la vésicule biliaire est insérée en arrière du parenchyme.

Il est formé de deux sous-ensembles asymétriques, les lobes droit et gauche, séparés anatomiquement par l'insertion du ligament falciforme (Figure 1). Il peut aussi être divisé en deux parties appelées foies droit et gauche à partir de critères structurels internes distincts. Il est fractionné en 8 segments chirurgicaux, chacun correspondant à une unité structurelle distincte de l'arbre vasculaire interne. Le foie droit est composé des segments V, VI, VII et VIII, le lobe droit comprenant en plus le segment IV. Le foie gauche comprend les segments II, III et IV, le lobe gauche ne comportant donc que les segments II et III. Le segment I est aussi appelé lobe caudé et la moitié inférieure du segment IV le lobe carré.

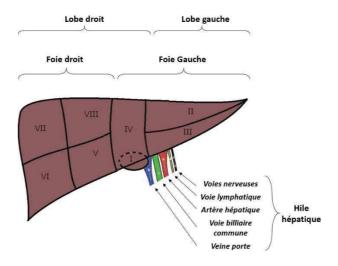


Figure 1 - Segmentation et hile hépatique.

Le foie est recouvert d'une couche de tissu conjonctif appelée capsule de Glisson. Lors de douleurs siégeant au niveau hépatique, c'est en réalité celle-ci qui est en cause car le parenchyme hépatique ne comporte pas de fibres nerveuses sensitives.

Cet organe a la particularité d'être irrigué par le sang artériel venant de la circulation systémique et par le sang veineux en provenance du système digestif via le système porte. Ces vaisseaux sanguins, associés au canal biliaire commun, aux voies nerveuses et aux vaisseaux lymphatiques hépatiques forment le hile hépatique (Figure 1). Le sang rejoint la circulation veineuse systémique par l'intermédiaire des trois veines sus-hépatiques. Elles sont situées à la face diaphragmatique du foie où elles s'anastomosent pour se jeter dans la veine cave inférieure.

L'unité structurale fondamentale du foie est le lobule hépatique (Figure 2 et Figure 3). De forme approximativement hexagonale, il est formé de travées hépatocytaires unicellulaires, séparées par des capillaires sanguins confluant au milieu du lobule pour former la veine centro-lobulaire. A chaque extrémité de l'hexagone se trouve une triade portale composée d'une branche de la veine porte, d'une branche de l'artère hépatique et d'un canal biliaire. Le sang qui irrigue le lobule depuis la veine porte et l'artère hépatique circule à travers un réseau de capillaires fenêtrés où il peut échanger avec les hépatocytes jusqu'à rejoindre la veine centro-lobulaire puis la circulation veineuse systémique. La bile un trajet opposé : produite par les hépatocytes et excrétée dans les canalicules biliaires, elle se dirige vers la triade portale puis transite par le canal hépatique commun puis le canal cystique jusqu'à la vésicule biliaire où elle est stockée.

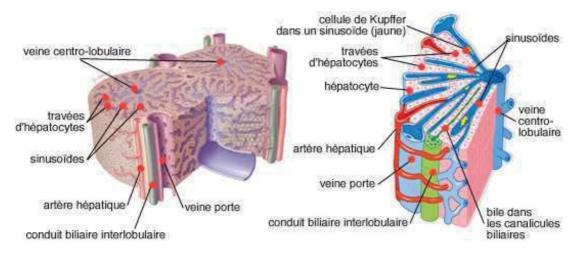


Figure 2 - Lobule hépatique et triade portale. (Netter, 2011)

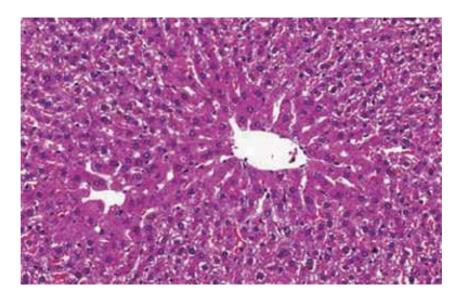


Figure 3 - Exemple histologique de foie sain, image centré sur la veine centrolobulaire.

L'activité métabolique des hépatocytes varie suivant leur localisation au sein du lobule en fonction des gradients d'oxygène, de nutriments et d'hormones qui y sont présents. Ceci définit la zonation métabolique du lobule (Jungermann et Keitzmann, 1996) (Figure 4).

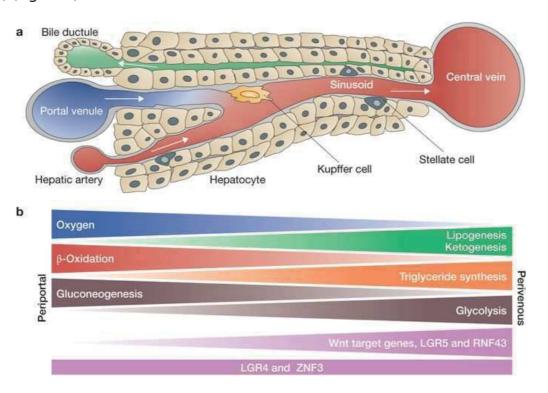


Figure 4 – A) Illustration d'une travée hépatocytaire, reliant la triade portale à la veine centro-lobulaire. B) Représentation schématique de l'évolution de la concentration en oxygène et de l'activité métabolique hépatocytaire entre la zone péri-portale et la zone péri-veineuse (Birchmeier, 2016).

Le foie est composé à 70% d'hépatocytes (Si-Tayeb *et al.*, 2010) (Figure 5). Ce sont des cellules qui exercent une intense activité métabolique. Environ 30 à 40 % des hépatocytes dans le foie adulte humain sont polyploïdes (4n à 8n). Dans le tissu sain, les hépatocytes polyploïdes sont majoritairement binucléés. De forme cubique et organisés en travées hépatocytaires de Remak, ils présentent une polarité complexe avec des pôles basolatéraux et apicaux. Entre le pôle basolatéral des hépatocytes et l'endothélium vasculaire se situe l'espace de Disse. Il s'agit d'un interstice qui doit être franchi par les molécules échangées entre les hépatocytes et la circulation sanguine. Afin de maximiser ces échanges, les hépatocytes présentent de nombreuses microvillosités à ce pôle. De l'autre côté, les membranes plasmiques apicales de deux hépatocytes adjacents forment le canalicule biliaire. Il n'y a pas de cholangiocytes à ce niveau.

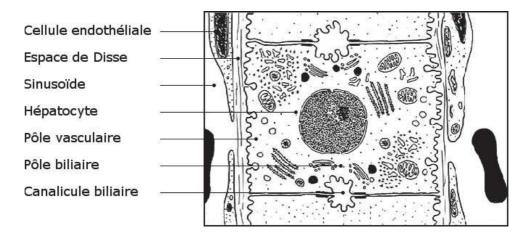


Figure 5 – Représentation schématique d'un hépatocyte.

D'autres cellules sont présentes dans le foie, dans des proportions moindres (Figure 6). Le foie est un des rares organes à posséder une population de macrophages résidents appelés cellules de Küpffer. Ces dernières assurent la phagocytose des microbes et des déchets présents localement et arrivant de l'intestin. Ils sont localisés dans l'espace de Disse. Le parenchyme hépatique héberge également des lymphocytes hépatocytaires (Bogdanos *et al.*, 2013) et des cellules stellaires, aussi appelées cellules de Ito, qui ont pour fonction physiologique principale de stocker la vitamine A. Les cholangiocytes et les cellules endothéliales forment la paroi des canaux biliaires et des vaisseaux sanguins, respectivement.

Des fibroblastes portaux, normalement quiescents mais capables de synthétiser des composants de matrice extra-cellulaire (MEC) en situation de stress inflammatoire, métabolique ou génotoxique, se trouvent en périphérie des lobules (Lepreux et Desmouliere, 2015). Enfin le foie contient un petit contingent de cellules progénitrices bipotentes également appelées cellules ovales (Ji *et al.*, 2016).

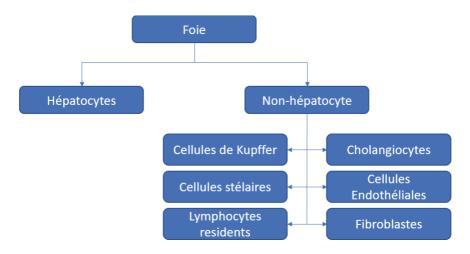


Figure 6 - Populations cellulaires hépatiques.

1.1.1 Fonctions hépatiques

Selon les auteurs, le foie assure jusqu'à 500 fonctions essentielles différentes (Zakim et Boyer, 2003), en particulier des fonctions endocrines et exocrines. Ces fonctions peuvent être regroupées en quatre grandes familles :

- Activité de détoxification des xénobiotiques : notamment, élimination des toxiques et médicaments en provenance du système digestif, conversion de l'ammoniac en urée et conjugaison de la bilirubine pour permettre son élimination rénale.
- Activité de stockage : notamment stockage du glycogène, de vitamines
 (A, D, E, K, B12), du fer et du cuivre.
- Activité de synthèse : notamment synthèse et distribution de nutriments, synthèse de l'albumine, des facteurs de la coagulation I, III, V, VII IX, XI et de la bile à partir du cholestérol.
- Activité nutritionnelle : métabolisme des acides aminés, régulation de l'homéostasie glucidique via la néoglucogenèse (formation de glucose à partir de précurseurs non glucidiques), la glycogénolyse (libération de glucose par le foie) et la glycogénogenèse (synthèse de glycogène à partir du glucose), régulation des lipides via la synthèse du cholestérol, des triglycérides et des lipoprotéines.

1.1.2 Régénération et réparation

Le foie possède la capacité de maintenir sa masse fonctionnelle totale non seulement en condition physiologique mais aussi à la suite d'une résection chirurgicale partielle ou d'une agression (toxique, médicamenteuse, virale, auto-immune, etc.). Les hépatocytes ont une durée de vie de 200 à 300 jours (Duncan *et al.*, 2009) et leur

mécanisme de renouvellement physiologique reste discuté. Des compartiments hépatocytaires (périportaux et/ou périveineux) seraient à l'origine de ce renouvellement du lobule hépatique, essentiellement sous le contrôle du statut métabolique de l'organisme. Dans un foie sain, après une hépatectomie des deux tiers ou une agression modérée, le parenchyme restaure sa masse tissulaire fonctionnelle en cinq à sept jours chez le rongeur (rat et souris) et en huit à quinze jours chez l'homme (Michalopoulos, 2007). Dans un foie sain cette croissance nécessite dans un premier temps une hyperplasie et une hypertrophie des hépatocytes, puis dans un second temps la prolifération des autres types cellulaires du foie.

Au décours d'une pathologique chronique ou de lésions hépatocytaires massives comme l'hépatite fulminante, les mécanismes cellulaires et moléculaires favorisant la régénération restent discutés. Pendant longtemps, le dogme établi à stipulé que la régénération était directement reliée à la prolifération et à la différentiation des cellules progénitrices hépatiques bipotentes (Duncan *et al.*, 2009). Or les spécialistes du sujet ont depuis remis ce dogme en question (Gilgenkrantz, 2015). Ce processus régénératif est contrôlé par un ensemble de médiateurs chimiques, en particulier le TNFα et l'IL-6 (Ji *et al.*, 2016), qui participent à un réseau d'interactions cellulaires regroupant l'ensemble des types cellulaires du foie ainsi que le reste de l'organisme. Les hépatopathies chroniques étant caractérisées par l'action conjointe de processus inflammatoires, fibrotiques et par la diminution des capacités de régénération tissulaire, l'étude des mécanismes pro-régénératifs apparaît essentielle à la compréhension de la physiopathologie hépatique et au traitement des maladies du foie.

1.2 Épidémiologie et facteurs de risque du CHC

1.2.1 Prévalence & Mortalité

Le carcinome hépatocellulaire est le principal cancer primitif du foie et le sixième cancer le plus fréquent dans le monde avec un total de 841 080 cas nouvellement déclarés en 2018 (Figure 8). Sa prévalence est particulièrement élevée en Afrique de l'Ouest et dans le sud-est asiatique (Figure 7). La prise en charge thérapeutique difficile et souvent tardive de ce cancer en fait le second cancer le plus mortel avec 781 631 décès (Figure 8), derrière le cancer du poumon comptabilisant 1,6 million de morts par an.

Le CHC représente entre 85 et 90% des tumeurs primitives du foie. Il se caractérise par une incidence mondiale en augmentation constante et une surreprésentation masculine : le ratio homme/femme s'échelonne entre 1 dans les pays à faible prévalence et 4 dans ceux à forte prévalence. En France, il est de 4,8 malgré une prévalence relativement peu élevée (Nordenstedt *et al.*, 2010). L'incidence et la

mortalité annuelle du CHC sont très proches, caractéristique commune aux cancers les plus agressifs et de mauvais pronostic : la survie globale médiane des patients est courte, de 11 mois. Les taux de survie à 3 et 5 ans sont de 19% et 8%, respectivement (Figure 9).

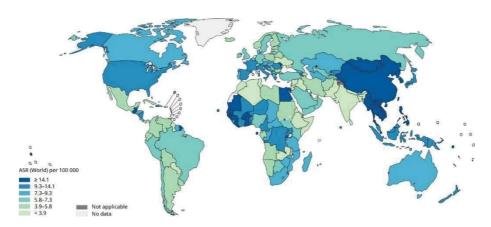


Figure 7 - Incidence globale du CHC chez les individus mâles. (Globocan, 2019)

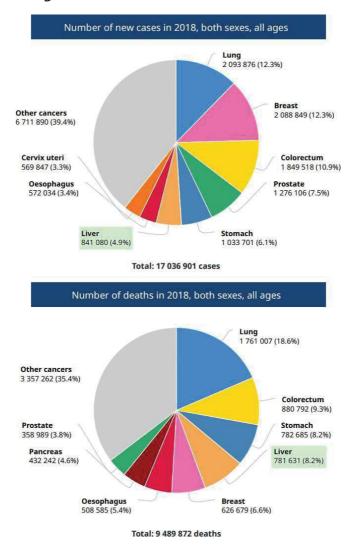


Figure 8 - Prévalence et mortalité des cancers. (Globocan, 2019)

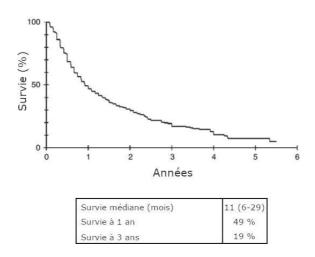


Figure 9 - Courbe de survie des patients atteints de CHC.

1.2.2 Causes

Le carcinome hépatocellulaire se développe dans 75 à 80% des cas sur un foie cirrhotique. Il apparait plus rarement au décours d'une hépatopathie chronique non cirrhotique et exceptionnellement (<5%) sur un foie sain. C'est pourquoi les causes du CHC recoupent celles de la cirrhose avec principalement la consommation éthylique chronique, le syndrome métabolique et les hépatite virales B et C (Bralet *et al.*, 2000). D'autres causes moins fréquentes sont aussi décrites : des causes génétiques comme le déficit en α -1 antitrypsine, les maladies de surcharge en fer, en cuivre ou en glycogène et des causes auto-immunes comme les hépatites auto-immunes de type 1 et 2.

Hépatites virales

Il existe 5 virus hépatotropes à l'origines des hépatites A, B, C, D et E. Chez les patients non-immunodéprimés, seules les hépatites B et C sont à risque de se chroniciser et de provoquer la formation d'un CHC. Ces deux hépatites se transmettent par voie sanguine : materno-fœtale, lors de rapports sexuels à risque, de transfusions ou d'un accident d'exposition au sang. La répartition géographique du VHB et du VHC est très différente. Schématiquement, l'hépatite C est davantage présente dans les pays occidentaux alors que l'hépatite B est surreprésenté dans les autres pays. Des traitements sont disponibles pour ces deux infections.

Au cours de l'hépatite chronique, ce n'est pas l'infection en tant que telle qui est responsable de la destruction des hépatocytes. L'hépatolyse est principalement provoquée par le système immunitaire qui tente d'éliminer l'infection en détruisant les hépatocytes infectés. Il agit via l'activation de lymphocytes T cytotoxiques (CD-8) et d'autres médiateurs de l'immunité innée et adaptative. Il provoque ainsi l'inflammation puis à terme la fibrose de l'organe.

Hépatites toxiques

Le foie possède un rôle majeur dans l'élimination des xénobiotiques et des produits toxiques ingérés. Placé entre la circulation veineuse entérique et la circulation sanguine systémique, il est confronté à une très grande variété de produits potentiellement toxiques à métaboliser, en provenance du tube digestif : alcool, médicaments (paracétamol), toxines (aflatoxine B1), etc. Ceux-ci sont à l'origine d'un important stress cellulaire et peuvent provoquer inflammation et stress oxydatif élevé au niveau du parenchyme.

L'alcool est l'une des principales causes de cirrhose dans le monde et près de 80% des décès liés à l'alcool sont dues à une complication hépatique (Testino *et al.*, 2014). L'éthanol est dégradé par le parenchyme hépatique suivant trois mécanismes distincts. L'alcool déshydrogénase est la principale enzyme utilisée, elle catalyse la transformation de l'éthanol en acétaldéhyde (i.e. éthanal). Le système microsomial d'oxydation de l'alcool (MEOS/CYP2E1) et la catalase sont deux voies secondaires menant aussi à la production d'acétaldéhyde. Faiblement active chez les personnes en bonne santé, ces deux voies sont activées lors d'épisodes d'alcoolisation massive ou au décours de maladies hépatiques. L'acétaldéhyde déshydrogénase transforme ensuite l'acétaldéhyde en acétyl-CoA. Si le mécanisme exact par lequel l'éthanol porte atteinte au foie n'est pas encore complètement élucidé, le rôle des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites au cours du métabolisme de l'éthanol et plus particulièrement celui de l'acétaldéhyde dans l'altération de l'ADN a été relevé (Dali-Youcef et Schlienger, 2012).

L'aflatoxine B1 est une mycotoxine produite par certains champignons, en particulier *Aspergillus flavus*. Ce dernier colonise de nombreux aliments végétaux (maïs, cacahuète, blé, amandes, noix, cacao, etc.) lorsque ceux-ci sont stockés dans une atmosphère inadaptée, chaude et humide. Après ingestion, l'aflatoxine B1 est transformée en AFB1-exo-8,9-epoxide par les hépatocytes (El-Serag et Rudolph, 2007). L'intoxication aiguë est à l'origine d'une hépatite pouvant conduire dans les cas les plus graves au décès du patient. Consommée de façon répétée, cette toxine a la capacité de se fixer à l'ADN et de provoquer des mutations génétiques pouvant être responsables de cancers. Elle est en particulier associée à une mutation du gène suppresseur de tumeur TP53, la mutation p53-249(ser) (Stern *et al.*, 2001).

Surcharge en métaux

L'hémochromatose et la maladie de Wilson sont des maladies génétiques de surcharge en fer et en cuivre, respectivement. Une absorption intestinale trop élevée de ces métaux amène ceux-ci à se concentrer dans différents organes dont le foie, augmentant son volume et détériorant son fonctionnement. A terme, le patient développe une fibrose hépatique pouvant s'aggraver en cancer. Le risque de

développer un CHC est par exemple multiplié par trois chez les patients atteints d'hémochromatose. (Hellerbrand *et al.*, 2003).

Surcharge en lipides

La stéatose hépatique est définie par l'accumulation de lipides, en particulier des triglycérides, dans les hépatocytes. Normalement présent à l'état de traces, les lipides peuvent aller jusqu'à occuper la quasi-totalité du volume cellulaire. Deux formes cytologiques de stéatose sont décrites, une forme micro- et une forme macro-vésiculaire, correspondant à différentes étiologies. Dans le cas de la stéatose micro-vésiculaire il s'agit principalement de la stéatose aiguë gravidique et du syndrome de Reye. Dans le cas macro-vésiculaire il s'agit de l'obésité, du diabète et de l'alcool. Les deux causes majeures de stéatose restent la consommation d'alcool et l'insulino-résistance (Chao-Hung *et al.*, 2010 ; Donadon *et al.*, 2009). Dans ce dernier cas, elle a été nommée NAFLD « maladie non alcoolique du foie gras ». Elle peut régresser spontanément en cas de disparition du facteur déclenchant.

La NAFLD est aujourd'hui considérée comme la manifestation hépatique du syndrome métabolique. Ce syndrome consiste en une association de symptômes lié à un trouble du métabolisme, en particulier celui des lipides, et corrélé à un risque accru de pathologies cardio-vasculaires. La NAFLD regroupe un large éventail d'atteintes histologiques allant de la stéatose isolée (simple accumulation cytoplasmique de lipides dans plus de 5-10% des hépatocytes) à l'apparition de signes inflammatoires et de souffrance hépatocytaire (hépatite) avec ou sans fibrose, stade appelé « stéatohépatite non alcoolique » (NASH) (Brunt *et al.*, 1999). Associée au mode de vie sédentaire, la NAFLD touche aujourd'hui entre 20% et 30% de la population avec une forte disparité nord-sud et entre populations urbaines et rurales (Loomba et Sanyal, 2013). L'accumulation d'acides gras libres en excès et le dysfonctionnement des mitochondries incapables d'assurer leur dégradation par β-oxydation provoquent entre autres une augmentation de métabolites toxiques tels que le diacylglycérol et les céramides menant à l'accumulation de ROS (Saponaro *et al.*, 2015).

Le stress oxydatif ainsi que l'augmentation de la sécrétion de cytokines proinflammatoires (IL-6, TNF α) contribuent au développement de la fibrose du parenchyme hépatique (Park *et al.*, 2010). A ce stade chronique, les deux syndromes que sont la NASH et la stéatose alcoolique convergent vers un même état cirrhotique du foie. Seule une rémission partielle est possible et, sans une prise en charge thérapeutique, l'histoire naturelle de la maladie peut mener à la formation du carcinome hépatocellulaire.

1.3 Mécanismes cellulaires et moléculaires

1.3.1 Mécanismes inflammatoires et fibrotiques

Inflammation

Le développement du carcinome hépatocellulaire est un processus séquentiel et près de 80% des carcinomes hépatocellulaires apparaissent dans un foie cirrhotique dans les pays développés. Différents facteurs de nature génétique et environnementale sont à l'origine d'un état inflammatoire chronique mis particulièrement en évidence par l'expression de nombreuses cytokines et chimiokines, parmi lesquels TNF α , IL-1 et TGF β (Tarhuni et al, 2014 ; Wang et al, 2003 ; Migita et al, 2005). Ceci est associé à des cycles de destruction, cicatrisation puis remodelage du tissu hépatique avec formation de nodules de régénération inclus dans une matrice extracellulaire fibrotique d'extension et de gravité croissantes. L'accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques au cours de ce processus provoque l'émergence de nodules dysplasiques de bas grade évoluant vers un statut de haut grade jusqu'à formation de nodules carcinomateux (Zucman-Rossi et al, 2015).

Du fait de sa situation anatomique, le foie est par ailleurs exposé à de fortes concentrations de produits provenant du système porte tels que les MAMP (microbeassociated molecular patterns). Sa vulnérabilité est accrue lorsqu'il souffre de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), de stéato-hépatite (NASH) ou de cirrhose. Des niveaux élevés de lipopolysaccharides (LPS), le MAMP majoritaire de l'axe intestin-foie, sont présents chez les patients atteints de cirrhose en raison d'une augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale et de la translocation bactérienne. Les LPS sont connus pour activer la voie NF- κ B, la production de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL1- β et IL6) et entraîner des lésions hépatiques inflammatoires et oxydatives. De nombreuses preuves expérimentales indiquent que le microbiote intestinal et la voie LPS-TLR4 jouent un rôle important dans la carcinogenèse du foie dans un contexte de lésions chroniques du foie, mais ne s'accordent pas sur la nature exacte du rôle (initiation ou promotion) joué par les LPS (Yu *et al.*, 2010; Dapito *et al.*, 2012).

Fibrose hépatique

De nombreuses études ont souligné le rôle central du système immunitaire dans l'instauration et la régression de la fibrose hépatique (Seki et al, 2015; Schuppan et al, 2013). Les macrophages sont l'une des cellules les plus étudiées dans ce contexte qu'ils soient résidents (cellule de Kupffer) ou issus de la différentiation de monocytes circulants (Ramachandran *et al.*, 2012). Ils se situent principalement dans les zones de

tissus cicatriciels, à proximité des myofibroblastes activés (Liu et al, 2010). Une importante étude a montré que l'élimination des macrophages au cours d'une fibrose établie permettait de réduire le nombre de myofibroblastes et le degré de fibrose dans un modèle de souris transgénique, alors que leur élimination au cours d'une phase de réparation du foie endommagé entrainait un échec de la dégradation de la matrice (Duffield et al.. 2005). Ceci démontre l'existence de sous-populations fonctionnellement distinctes de macrophages dans le foie et indiquent que ces macrophages jouent un rôle essentiel dans les phases lésionnelles et de récupération des cicatrices inflammatoires. Les cellules de Küpffer participent à la réponse initiale aux lésions par la production de chimiokines pro-inflammatoires comme CCL2 et CCL5 (Tacke et al, 2014); leur nombre cependant diminue avec l'évolution de la maladie chronique du foie; elles sont alors remplacées par des macrophages dérivés des monocytes (Karlmark et al., 2009). Le rôle pro-fibrogène des macrophages a été révélé dans d'autres organes que le foie, c'est le cas du cœur (Hayashidani et al., 2003), des reins (Lin et al., 2009), de la peau (Lucas et al., 2010) et des poumons (Gibbons et al., 2011). Certains mécanismes spécifiques ont été identifiés selon le type d'hépatite : l'infection virale chronique se caractérise par l'activation précoce des cellules immunitaires Natural Killer (NK) productrices notamment de cytokines proinflammatoires (IFNγ, TNFa) conduisant au recrutement et à l'activation de lymphocytes T CD4+/CD8+ (Rehermann, 2015; Heim et al, 2014).

La matrice extra-cellulaire représente 0,5% du poids du foie en condition physiologique (Rojkind et al., 1979). Elle est composée principalement de collagènes, de glycoprotéines, d'élastine, d'acide hyaluronique et de protéoglycanes (Frizell et al., 1995; Kawashima et al., 1999; Schuppan, 1990). La fibrose hépatique avec production d'une matrice pathologique survient après dégradation de la matrice physiologique. Les métalloprotéases matricielles (MMP) sont les principaux acteurs de cette dégradation, leur activité est régulée par les inhibiteurs tissulaires des MMP (TIMP). Plusieurs populations cellulaires hépatiques ont été identifiées comme ayant la capacité de produire les MMP et les TIMP : hépatocytes, cellules de Küpffer, cellules stellaires et myofibroblastes (Arthur et al., 1989; Knittel et al., 1999). En particulier, l'activation et la prolifération des cellules stellaires participent de façon majeure à la production d'une fibrose. Cette dernière est principalement liée à l'action du facteur de croissance plaquettaire PDGF et d'autres médiateurs paracrines produits par les cellules de Kupffer (Heymann et al., 2009; Wang et al., 2009). Elles participent à la dégradation du collagène de type IV physiologique en produisant les MMP-2, 9 et 13 (Arthur et al., 1992; Han et al., 2007; Milani et al., 1994; Vyas et al., 1995) et à son remplacement en synthétisant en excès le collagène de type I sous l'action du TGFβ (Fabregat, 2019). Ces cellules expriment un grand nombre de chimiokines comme CXCL2, CCL2, CCL5 et CCL21 participant à l'infiltration intra-parenchymateuse de cellules immunitaires (Sprenger et al., 1999; Ohata et al., 1997; Bonacchi et al., 2003). L'état cirrhotique du foie persistera de nombreuses années avec un risque estimé de développer un CHC de l'ordre de 5% par an.

Inflammation non fibrotique

Dans de rares cas, le CHC se développe sur foie sain, non cirrhotique, à partir d'un adénome hépatocellulaire (AHC). Le principal facteur de risque de cette pathologie est l'administration prolongée de contraceptifs oraux (Bioulac-Sage et al, 2010). Environs 50% des AHC présentent une caractéristique inflammatoire (Nault et al, 2013). L'analyse transcriptomique de ces adénomes montre une activation importante de la voie JAK/STAT sous l'action de l'IL-6 (Rebouissou et al, 2009), résultant de l'activation et de la translocation nucléaire de STAT3. Ceci favorise l'expression des gènes codant la protéine C-réactive et la protéine amyloïde sérique A ainsi que l'inhibition de l'apoptose, la prolifération et l'invasion cellulaires (Rebe et al, 2013 ; Teng et al, 2014).

1.3.2 Altérations génétiques et épigénétiques

La formation du CHC repose sur une accumulation d'altérations génétiques (instabilité chromosomique et mutations) et épigénétiques successives dérégulant de nombreuses voies de signalisation conduisant les hépatocytes sains vers un état transformé.

Instabilité chromosomique

Les instabilités chromosomiques (CIN) sont un ensemble d'altérations de l'ADN se traduisant par des modifications quantitatives et qualitatives du caryotype. Elles sont le fait d'erreurs d'agrégation chromosomique au cours de la mitose. Ces modifications correspondent aux gains, aux pertes ou aux réarrangements de fragments de chromosomes voir de chromosomes entiers, à l'origine de l'aneuploïdie fréquemment observée dans le CHC. Elles coïncident avec de nombreuses modifications comme les translocations réciproques et conduisent à des inversions, des amplifications géniques, de la chromothripsie (éclatement de quelques segments chromosomiques et réassemblage aléatoire des fragments générés), des pertes d'hétérozygotie (LOH) la formation de gènes de fusion ou encore une instabilité microsatellite. Les CIN peuvent être associées à d'autres facteurs pro-oncogéniques. Les travaux de Pineau et al. montrent une instabilité chromosomique plus élevée chez les patients exposés à l'aflatoxine B1. Cet écart est particulièrement important dans les tumeurs présentant une mutation de TP53 (Pineau et al., 2008). Les CIN sont des modifications très fréquentes qui participent à la tumorigenèse, la progression tumorale, la dissémination métastatique et au développement des résistances médicamenteuses (Bastians, 2015).

Dans le CHC, un gain sur le bras 1q est par exemple décrit dans 58% à 86% des cas (Jia *et al.*, 2011) et la perte complète du bras 13q est observée dans 30% des cas (Laurent-Puig *et al.*, 2001). Plus globalement, certains remaniements de bras chromosomiques sont régulièrement associés au CHC avec des gains récurrents sur les

chromosomes 1q, 5p, 6p, 7q, 8q, 17q et 20q et des pertes sur 1p, 4q, 6q, 8p, 9p, 13q, 14q,16p-q, 17p, 21p-q et 22q (Kan *et al.*, 2013; Nishida *et al.*, 2013; Roessler *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Homayounfar *et al.*, 2013; Fernandez-Banet *et al.*, 2014). Ces régions chromosomiques contiennent de très nombreux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs tels que la cycline A2 (CCNA2) (4q), le récepteur du mannose-6-phosphate (IGFRII/M6PR) (6q), l'oncogène cellulaire myélocytose (c-MYC) (8q), l'inhibiteur de CDK p16 Ink4A (9p), l'homologue phosphatase et tensine (PTEN) (10q), la cycline D1 (CCND1) (11q), le gène du rétinoblastome 1 (RB1) (13q), la protéine AXIN1 (16p), la E-cadhérine (CDH1) (16q), le gène SOCS (suppressor of cytokine signalling) (16p) ou encore le gène suppresseur de tumeur TP53 (17p).

La perte d'un des deux allèles d'un même gène (LOH) est également très fréquemment décrite dans les CHC. Par exemple, une LOH sur le bras 4q est fortement corrélée à l'augmentation du taux d'AFP (Xia, 2009), une dédifférenciation plus importante et une étiologie VHB (Moinzadeh *et al.*, 2005). Une LOH sur le bras 8p est associée à la présence de nodules de haut grade de malignité (Tornillo *et al.*, 2002). Selon les travaux de Marchio *et al.*, la présence de LOH dans un cancer peut être déduite de la présence de mutations par insertion/délétion spécifiques (Marchio *et al.*, 2012).

Les régions microsatellites sont des séquences répétées, entre 5 et 100 fois, d'un motif d'ADN de 2 à 6 nucléotides, généralement localisées dans des régions non codantes de l'ADN et hautement polymorphes chez les individus sains. Dans les cancers présentant une déficience du système MMR de réparation des erreurs de réplication de l'ADN, la forte instabilité microsatellite (MSI) observée dans les séquences codantes de certains gènes a des conséquences fonctionnelles dans la transformation cellulaire et la progression tumorale. Déjà présente dans le tissu hépatique de patients atteints d'hépatite chronique ou de cirrhose (Kondo, 2000), les MSI ont été mises en évidence dans le CHC dès 1999 (Salvucci *et al.*, 1999). Cependant, leur impact sur la carcinogénèse reste encore débattu dans la littérature (Goumard *et al.*, 2017 ; Togni *et al.*, 2009).

Mutations

Un grand nombre de mutations génétiques ont été mises en évidence dans les CHCs, ce qui modifie l'activité de plusieurs voies de signalisation (Figure 10). Celles-ci peuvent provoquer des gains ou des pertes de fonction des protéines, modifier leur stabilité ou encore empêcher leur traduction. Des mutations localisées dans des séquences régulatrices ou des promoteurs peuvent aussi influencer le niveau d'expression des protéines.

La protéine humaine hTERT (transcriptase inverse de la télomérase) joue un rôle majeur dans l'immortalisation des cellules tumorales. Elle limite le raccourcissement

des télomères à l'origine du phénomène de sénescence. Le gène hTERT est muté dans 90% des tumeurs humaines tout organes et étiologies confondus, il participe ainsi à l'immortalisation des cellules tumorales (Bell *et al.*, 2015). Une mutation récurrente du promoteur du gène hTERT a été retrouvée dans 60% des CHCs analysés (Nault *et al.*, 2013). L'expression de la protéine hTERT a par ailleurs été fortement corrélée à l'incidence et à la progression du CHC (Zhou *et al.*, 2015).

Le gène suppresseur de tumeur TP53 code la protéine p53, l'un des principaux régulateurs du cycle cellulaire et de l'apoptose (Prives et Manfredi, 1993). Une mutation inactivatrice du gène TP53 est très fréquente dans les CHCs. Elle a été décrite dès 1991 (Hollstein *et al.*, 1991) et est retrouvée dans environ 30% des CHCs (Giaccia et Kastan, 1998). Les mutations du gène TP53 présentent une variabilité géographique en lien avec les différentes étiologies de la maladie (Lerardi *et al.*, 2010). Enfin, deux méta-analyses ont permis de conclure comme nous pouvions s'y attendre que les mutations de TP53 étaient associées à un mauvais pronostic en termes de survie globale et de survie sans aggravation (Liu *et al.*, 2012 ; Zhan *et al.*, 2013). L'inactivation de p53 lève l'inhibition du cycle cellulaire, favorise la prolifération cellulaire et la croissance tumorale.

D'autres mutations sont fréquemment détectées dans les CHCs comme celles du gène RB (Azechi *et al.*, 2001), des gènes AXIN1 et AXIN2 (Ishizaki *et al.*, 2004) ou encore celles du gène CTNNB1 codant la β -caténine et conduisant à son activation constitutive (Monga, 2015).

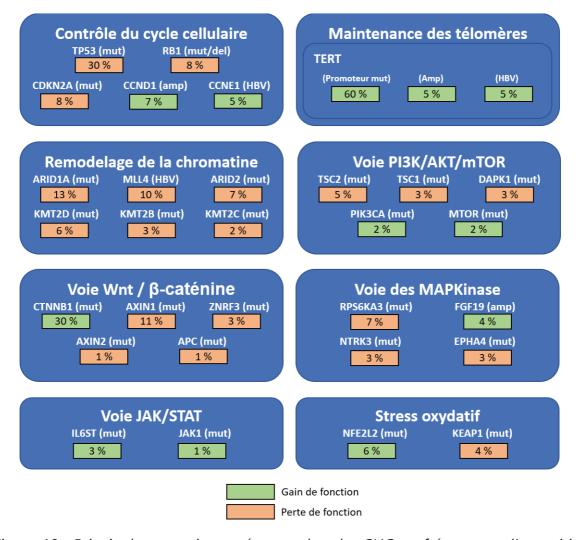
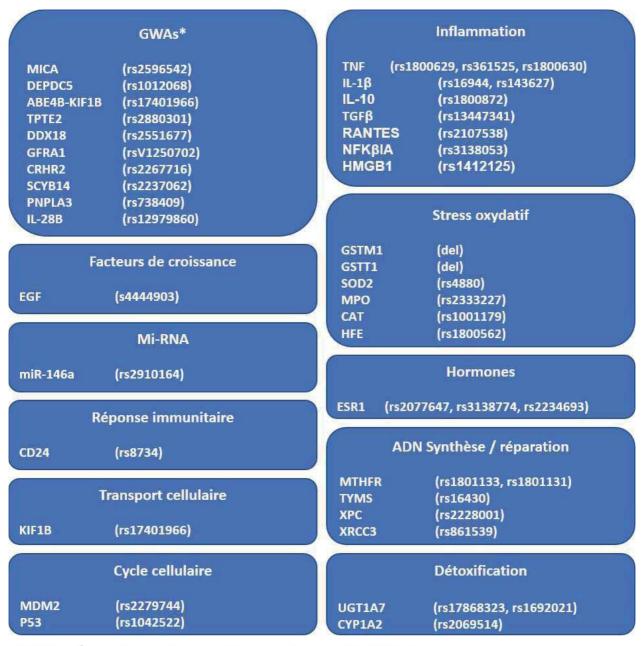


Figure 10 - Principales mutations présentes dans les CHCs et fréquences d'apparition.

Un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) correspond à une variation génétique d'une seule paire de bases entre individus. Cette variation doit apparaître dans une proportion supérieure à 1% de la population et être toujours située à une même localisation au sein du génome pour être caractérisée comme SNP. Très fréquents, ils concernent en moyenne une paire de base sur mille (Figure 11). Plusieurs SNP sont associés aux CHC comme celui de HMGB1 (Wang et al., 2016). Rebbani et al. rapportent que le polymorphisme R72P de TP53 modifie la méthylation de l'ADN dans le CHC (Rebbani et al., 2015). D'autres SNP montrent des résultats contradictoires suivant les études comme par exemple KIF1B (kinesin family member 1B) impliqué dans le transporteur intracellulaire. Certaines études associent un SNP de KIF1B à un risque accru de CHC au décours d'une infection par VHB (Zhang et al., 2010), d'autres le décrivent en association avec une consommation éthylique importante (Chen et al., 2016) et d'autres encore réfutent l'ensemble de ces résultats (Qu et al., 2015). De fait, si de très nombreux SNP ont été identifiés (Nahon et Zucman-Rossi, 2012), la petite taille des cohortes étudiées rend difficile l'obtention de résultats fiables et reproductibles et il ne sera pas possible d'approfondir cet axe de recherche sans études regroupant un nombre plus élevé de patients.



*GWAs = Étude d'association pangénomique (regions identifiées)

Figure 11 - Principaux SNP associés aux CHCs.

Altérations épigénétiques

Plusieurs mécanismes de régulation épigénétique sont altérés au cours de la carcinogenèse hépatique. Cela concerne notamment les micro-ARNs, la méthylation de l'ADN et les modifications des histones.

Les microARN, communément appelés miRNA, sont des petites séquences d'ARN non codantes faisant en moyenne 23 nucléotides capables de réguler négativement l'expression de nombreux gènes cibles (Bartel, 2009). Leur importance dans la physiopathologie humaine notamment dans les cancers a été très largement rapportée (Kusenda *et al.*, 2006). Dans le cas du CHC, des miRNAs comme mir-122

(Jopling *et al.*, 2005), let7 (Lan *et al.*, 2010), mir-101 (Su *et al.*, 2009) ou mir-221/222 (Dai *et al.*, 2010) présentent des profils d'expression altérés, certains étant régulés positivement, d'autres négativement en fonction de leur activité pro ou anti-oncogène. Ils sont considérés comme étant des cibles thérapeutiques prometteuses bien que le développement clinique de tels traitements soit encore à venir.

La méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyl sur des îlots CpG par l'une des quatre ADN méthyltransférases humaines (DNMT1, 2, 3A, 3B). L'hyper-méthylation de l'ADN, l'augmentation du nombre d'îlots CpG méthylés dans le tissu pathologique comparé à celles du tissu sain adjacent, est l'une des modifications épigénétiques les plus fréquentes au cours de la carcinogenèse (Nili *et al.*, 2008). La méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs et à proximité des sites d'initiation de la transcription est associée à une répression de l'expression génique en modifiant le recrutement de complexes de transcription et de protéines régulatrices (Kulis et Esteller, 2010). De fait, elle est particulièrement présente dans les CHCs au niveau de gènes suppresseurs de tumeur comme CDKN2, qui code les protéines inhibitrices de CDK p14 et p16 (Nishida et Goel, 2011), ou encore RB, favorisant ainsi la croissance tumorale (Roncalli, 2002). L'hyper-méthylation résulte d'une surexpression des méthyltransférases (Saito, 2001); cette surexpression est associée à un mauvais pronostic clinique (Saito *et al.*, 2003).

Les histones peuvent être soumises à différentes modifications post-traductionnelles au niveau de leurs extrémités N-terminales comme la méthylation, l'acétylation et l'ubiquitination (Toh *et al.*, 2019). Cela affecte la transcription de nombreux gènes incluant les gènes suppresseurs de tumeur comme p16 (Bachman *et al.*, 2003). L'acétylation est la modification la plus étudiée dans le cadre du CHC, elle est régulée par deux groupes d'enzymes qui interviennent dans le remodelage de la chromatine : les histones acétyltransférases (HAT) qui ajoutent un groupement acétyle aux résidus lysine et les histones désacétylases (HDAC) qui catalysent la réaction inverse. La présence de ce groupement induit une perte d'affinité entre l'histone et l'ADN provoquant une hausse de la transcription des gènes situés à cet endroit (Ropero et Esteller, 2007). La dérégulation de l'acétylation des histones dans le CHC a été rapportée dans plusieurs études, la surexpression de HDAC3 a par exemple été proposée comme biomarqueur dans les CHCs associés au VHB (Wu *et al.*, 2010). La surexpression de HDAC1 et HDAC2 a aussi été corrélée à une hausse de la mortalité dans une cohorte de patients atteints de CHC (Ler *et al.*, 2015).

1.3.3 Dérégulation des voies de signalisation

Plusieurs voies de signalisation sont altérées au cours de la carcinogénèse hépatique et chaque tumeur est le produit d'une combinaison unique de mutations survenant dans l'ensemble du génome, codant et non codant (Zucman-Rossi *et al.*, 2015). Entre 35 à 80 mutations sont retrouvées dans les régions codantes du génome

tumoral et concernent à la fois des gènes « inducteurs », qui ont une action directe dans la carcinogénèse hépatique mais aussi des gènes « passagers » qui ne possèdent pas de rôle identifié dans la carcinogénèse et sont la conséquence d'une mutagénèse aléatoire (McDermott *et al.*, 2011 ; Stratton *et al.*, 2009). En particulier, ces altérations génétiques inductrices se concentrent sur un nombre restreint de voies signalétiques. En particulier les voies MAPKinases, WNT/β-caténine, PI3K/AKT, JAK/STAT et c-Myc. Nous présentons ces voies et les mécanismes de dérégulation actuellement identifiés, en particulier au cours du CHC. Nous détaillons en particulier le cas de l'oncogène c-Myc qui occupe une place centrale dans nos travaux.

Voie MAPKinases

La voie des MAPK (Figure 12), participe à la prolifération cellulaire, la différentiation, au développement embryonnaire et intervient dans l'apoptose (Zhang et Liu, 2002). Il s'agit d'une cascade de signalisation débutant par l'activation d'un récepteur extracellulaire de type récepteur couplé à une protéine G (RCPG) ou de type tyrosine/kinase. Trois différentes cascades d'activation peuvent alors avoir lieu, toutes se font par l'activation de protéines MAP3K (RAF, ASK1/TAK1 et MUK) puis de MAP2K (MEK, MKK 3/6, MKK 4/7) spécifiques et se termine par l'activation d'une MAPK : Extracellular signal-regulated kinases (ERK), c-Jun N-terminal kinases (JNK) ou p38 mitogen-activated protein kinases (p38). Les MAPK agissent ensuite sur de nombreux facteurs de transcription tels que NF-κB, CREB, c-JUN, c-Myc, p53, Elk1, Sap1a. Ils modulent ainsi l'expression de nombreux gènes cibles.

L'activation de cette voie dans le CHC est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CHC associé au VHC (Schmitz *et al.*, 2008). Elle provoque l'inhibition de l'apoptose et favorise la prolifération cellulaire (Lavoie *et al.*, 2015). Elle pourrait par ailleurs être impliquée dans le développement de résistance au sorafenib (un inhibiteur de plusieurs kinases de la voie MAPK) et au 5-Fluorouracile (5-FU) comme cela a été montré *in vitro* dans une lignée cellulaire dérivée de CHC (McCubrey *et al.*, 2007). Enfin l'inhibition de cette voie par ARN interférents anti-MAP2K stoppe la croissance de lignées tumorales dérivées de CHC *in vitro* (Gailhouste *et al.*, 2009).

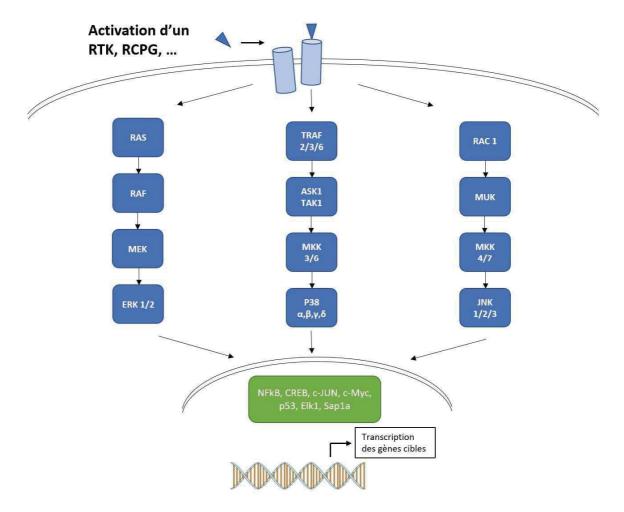


Figure 12 - Voie des MAPK (mitogen activated protein kinases).

Voie WNT/β-caténine

La voie WNT/ β -caténine (Figure 13) participe à la morphogénèse, la zonation hépatique, l'homéostasie, la prolifération, la différentiation et la motilité cellulaires ainsi qu'à l'apoptose (Nelson, 2004 ; Clever *et al.*, 2012 ; Decaens *et al.*, 2008). A l'état basal, la β -caténine est localisée majoritairement au niveau des jonctions cellulaires et l'excès de β -caténine produite est constamment dégradé. La voie Wnt/ β -caténine n'est active qu'après liaison du ligand Wnt avec le récepteur Frizzled avec pour conséquence le recrutement de la protéine Dishevelled, l'inhibition de la phosphorylation de la β -caténine par la kinase glycogène synthase 3 β (GSK3 β), son accumulation dans le cytosol puis sa translocation au noyau. Dans le cas contraire, la β -caténine phosphorylée est adressée au protéasome par un complexe comprenant l'axine, la protéine APC (adenomatous polyposis coli), la protéine phosphatase 2A (PP2A), la kinase GSK3b et la caséine kinase 1 α (CK1 α) (Minde *et al.*, 2011).

Cette voie est fréquemment dérégulée dans le cancer, en particulier dans le CHC (20-40%) où elle est généralement mutée (Yang *et al.*, 2008 ; Coste *et al.*, 1998 ; Guichard *et al.*, 2012), il peut s'agir d'une mutation activatrice du gène la β-caténin, *CTNNB1* (Coste *et al.*, 1998) ou d'une mutation inhibitrice de APC (Takigawa et Brown,

2008). Ces deux mécanismes entrainent l'accumulation et la translocation nucléaire non contrôlée de la β-caténine où elle interagit avec des facteurs de transcription de la famille LEF/TCF et stimule la transcription de ses gènes cibles (Pez *et al.*, 2013). Il en résulte une aggravation de la dédifférenciation tumorale, du potentiel métastatique et de l'angiogenèse via notamment l'expression fonctionnelle des métalloprotéases matricielles 2 et 9 et du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Herencia *et al.*, 2012 ; Qu *et al.*, 2014). La mutation isolée de la β-caténine ne suffit pas à initier la tumorigenèse : un modèle murin présentant uniquement une mutation activatrice de la β-caténine au niveau hépatique développe une hépatomégalie non tumorale (Cadoret *et al.*, 2001). La coexpression d'une mutation activatrice de l'oncogène HRAS et de la β-caténine provoque, elle, la formation de CHCs (Harada *et al.*, 2004). L'inhibition de APC au niveau hépatique initie aussi l'émergence du cancer (Colnot *et al.*, 2004) mais les mutations de ce gène restent plus rares et ne concernent que 1 à 2% des CHC (Guichard *et al.*, 2012).

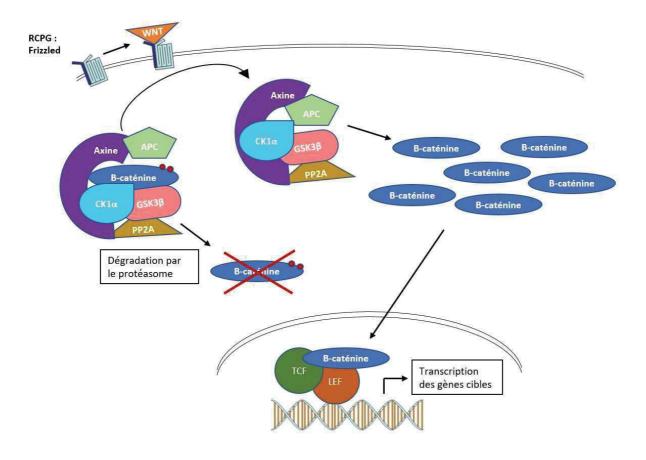


Figure 13 - Voie Wnt/β-caténine.

Voie PI3K/AKT

La voie PI3K/AKT/mTOR (Figure 14) joue un rôle majeur dans la régulation de l'apoptose, la croissance, le cycle cellulaire ainsi que l'angiogenèse (Dreyer *et al.*, 2009). Cette voie est initiée par l'activation de récepteurs à tyrosine kinase tels que VEGFR,

EGFR, PDGFR ou encore IGFR après fixation à leur ligand spécifique. Le récepteur se dimérise alors, effectue une trans-phosphorylation intracellulaire et recrute le phosphoinositide-3-kinase (PI3K) composé de deux sous-unités catalytique p110 et régulatrice p85. Le PI3K est à l'origine de la production de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) dont le principal répresseur est PTEN qui est à ce titre classé comme suppresseur de tumeur. Le PIP3 recrute le phosphatidylinositol 3-dependent kinase 1 (PDK1) qui active AKT par phosphorylation. Enfin AKT inhibe TSC1 et TSC2 (tuberous sclerosis protein 1 and 2) ce qui lève l'inhibition de Rheb (Ras homolog enriched in brain) et active la kinase mTOR (mammalian target of rapamycin). Elle agit au sein du complexe mTORC1 composé de mTOR, Raptor, Deptor, MLST8 et PRAS40. Ses deux principales cibles sont S6k1 et eIF4E, via la levée de l'inhibition de 4E-BPI. Ces deux protéines sont impliquées dans la régulation de la croissance, du cycle cellulaire et de l'apoptose.

L'activation de cette voie a été relevée dans plus de 40% des CHC (Sieghart *et al.*, 2007) mais le taux de mutation de cette voie dans le CHC est relativement faible autour des 5% (Guichard *et al.*, 2012) et son activation résulte plus fréquemment de la fixation constitutive d'un ligand sur l'un des récepteurs activateur de cette voie (Matter *et al.*, 2014). La suractivation de cette voie est associée à un mauvais pronostic pour les patients (Zhou *et al.*, 2009). La mutation la plus fréquemment retrouvée dans les CHCs est celle de RPS6KA3, une serine / thréonine kinase impliquée dans la régulation de PI3K/RAS (Guichard *et al.*, 2012). Une mutation inhibitrice de PTEN a aussi été rapportée chez 1 à 3% des patients présentant CHC (Villanueva *et al.*, 2008).

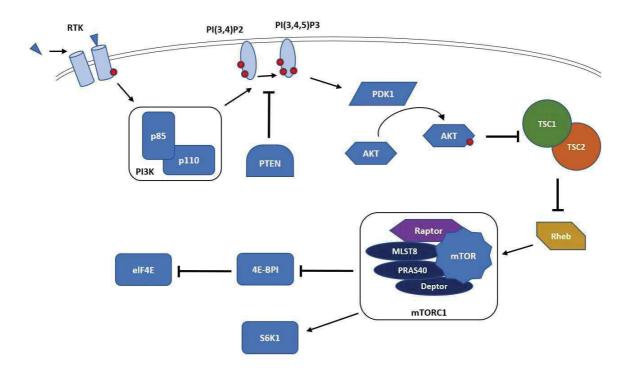


Figure 14 - Voie PI3K/AKT/mTOR.

Voie JAK/STAT

La voie JAK / STAT (Janus kinases / Signal transducers and activators of transcription) (Figure 15) est impliquée dans la transduction d'une multitude de signaux extracellulaires en réponse à de nombreux facteurs de croissance et cytokines. Son activation induit des effets biologiques pléiotropes incluant le contrôle de la prolifération et la migration cellulaire, la différentiation, l'apoptose, la réponse immunitaire. Après fixation d'un ligand spécifique à son récepteur, celui-ci se dimérise ce qui induit la phosphorylation des protéines JAK suivie de l'activation des protéines STAT. Ils forment des homo/hétérodimères via leurs domaines SH2. C'est sous cette forme que les protéines STAT migrent dans le noyau et induisent la transcription de gènes cibles. Trois familles de protéines inhibitrices de cette voie ont été identifiées : les protéines inhibitrices de STAT activé (PIAS) à l'origine de la SUMOylation de p-STAT et de sa dégradation, les protéine phosphatases à domaine SH2 (SHP) déphosphorylant STAT et les suppresseurs de signalisation de cytokines (SOCS) à l'origine de la polyubiquitinylation et de la dégradation de STAT. En conditions physiologiques ces 3 mécanismes régulent très étroitement les signaux prolifératifs et anti-apoptotiques de Ras et de JAK/STAT. Par conséquent, la dérégulation des inhibiteurs de Ras et JAK/STAT joue un rôle crucial dans le cancer et l'inactivation de RASSF1A et SOCS1 a été fréquemment trouvée dans diverses tumeurs malignes, y compris le CHC (Nagai et al., J Hepatol 2001; Okochi et al., Clin Cancer Res 2003).

Les mutations de JAK1 sont rares ; une seule mutation a été retrouvée dans un panel de 84 CHCs (Xie *et al.*, 2009). Lorsque cette mutation est présente, l'activation de la voie JAK/STAT est bien corrélée à l'oncogenèse (Calvisi *et al.*, 2006). Cela serait dû à l'inactivation d'inhibiteurs, comme SOCS-1, inactivé par méthylation dans 65% des CHCs étudiés (Yoshikawa *et al.*, 2001).

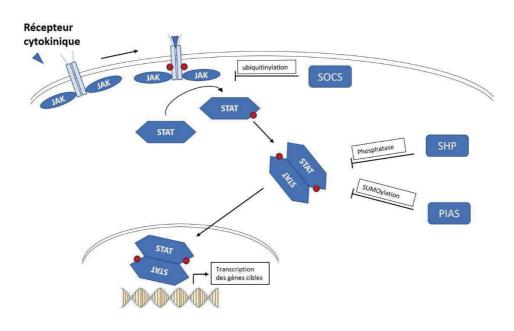


Figure 15 - Voie JAK/STAT.

1.3.4 Le facteur de transcription c-Myc

Généralités

MYC est une famille de facteurs de transcriptions comportant 3 gènes : c-Myc, I-Myc et n-Myc dont le nom provient du virus de la myélocytomatose aviaire aussi appelé « v-Myc » avec lequel ils partagent une forte homologie. Leur rôle est de coordonner l'expression transcriptionnelle de milliers d'autres gènes. Les proto-oncogènes MYC coordonnent normalement le cycle cellulaire, la croissance cellulaire, l'auto-renouvellement, la survie, le métabolisme, la synthèse des protéines et la différenciation. C-Myc est le premier à avoir été décrit, en 1982 (Vennstrom et al., 1982). Nous présentons plus particulièrement cet oncogène, au cœur de nos travaux expérimentaux.

Le gène *c-Myc* se situe chez l'Homme sur le chromosome 8, il est constitué de 2 introns et 3 exons mais seuls les exons 2 et 3 codent la protéine c-Myc. Quatre promoteurs, numérotés P0 à P3, ont été identifiés. P0 se situe dans la région 5'UTR, P1 et P2 dans le premier exon et P3 dans le premier intron (Figure 16). 75 à 90% de l'ARNm cytoplasmique détecté sont issus du promoteur P2 et 10 à 25% de P1. Les promoteurs P0 et P3 ne contribuent que d'environ 5% seulement (Ryan et Birnie, 1996).

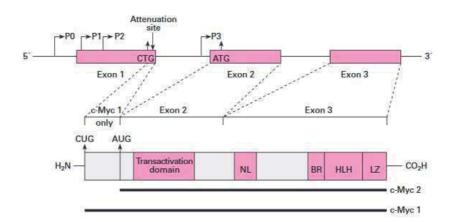


Figure 16 - Représentation schématique du gène et de la protéine c-Myc. NL = localisateur nucléaire BR = région basique, HLH = hélice-boucle-hélice, LZ = glissière à leucine (Ryan et Birnie, 1996).

La fixation d'un grand nombre de facteurs de transcriptions au promoteur de *c-Myc* a été largement décrite, par exemple NF-κB, STAT3 ou AP-1 (Wierstra et Alves, 2008). C-Myc peut aussi être inhibé par la fixation de répresseurs transcriptionnels comme OVOL1 (Takamichi *et al.*, 2017).

Structurellement, la protéine c-Myc est constituée d'un domaine de liaison à l'ADN de type hélice-boucle-hélice (HBH) lui permettant de se lier à l'ADN cible ainsi

que d'une glissière à leucine (LZ) qui permet la dimérisation avec son partenaire Max (Myc associated factor X), un autre facteur de transcription HBH (Blackwood et Eisenman, 1991). La protéine c-Myc est essentielle, sa suppression est létale pour l'embryon et altère grandement la survie, la croissance et la différenciation des cellules matures.

Régulation transcriptionnelle

L'expression de *c-Myc* est régulée par un grand nombre de voies de signalisation. Elle peut être initiée par des hormones (testostérone, leptine) des facteurs de croissance (CSF1, PDGF) ou encore des cytokines (IL-6, IFN-γ, TGF-β). Ces ligands sont à l'origine de l'activation de facteurs de transcription venant se fixer sur les promoteurs de c-Myc et réguler sa transcription. Par exemple, les facteurs HOXB4, BMAL1 et p53 régulent négativement l'expression de c-Myc alors que les protéines STAT3 ou CSL sont des régulateurs positifs. Le rôle des protéines de la famille NF-κB est plus complexe, en présentant des effets positifs et négatifs sur la transcription de *c-Myc* en fonction des sous-unités impliquées. Les dimères RelB/p52 et RelA/p50 activent le promoteur c-Myc, alors que l'homodimère p50/p50 l'inactive (Wierstra et Alves, 2008).

La protéine c-Myc est aussi capable d'agir comme son propre répresseur transcriptionnel en agissant sur l'élément initiateur (Inr) de son promoteur P2. La littérature rapporte que la protéine p107 est essentielle à ce mécanisme, sa mutation provoquant une levée de l'inhibition de c-Myc par lui-même. Or, p107 est capable de se lier à c-Myc et à E2F, c'est pourquoi un modèle de répression impliquant ces trois protéines a été proposé. Dans l'ensemble, ce mécanisme d'auto-régulation globale semble jouer un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération cellulaire et son dysfonctionnement dans les cellules contribue à leur transformation maligne (Luo *et al.*, 2004).

L'étude *in vitro* de la lignée érythro-leucémique SCL traitée par le DMSO a montré que l'hyperméthylation induite du gène *c-Myc* provoque l'extinction du gène (Scarpa *et al.*, 2001). Alors que l'hypométhylation du gène *c-Myc* dans les carcinomes hépatocellulaires et gastriques est à l'origine d'une surexpression du gène et participe à la transformation des cellules (Tsujiuchi *et al.*, 1999).

Régulation post-transcriptionnelle

La protéine c-Myc est constitutivement active et sa demi-vie est d'environ 30 minutes. Elle est régulée par plusieurs modifications post-traductionnelles agissant sur sa stabilisation et sa dégradation comme la phosphorylation, la O-GlcNAcylation, l'acétylation et l'ubiquitinylation.

C-Myc peut être phosphorylé sur quatorze sérines et thréonines : Thr58, Ser62, Ser71, Ser81 à l'extrémité N-terminale, sur les 5 résidus Thr247, Thr248, Ser249, Ser250 et Ser252, et sur les Ser293, Thr343, Ser344, Ser347 et Ser348 à l'extrémité C-terminale. Parmi ces sites, seul Thr58 et Ser62 et Ser71 présentent une signification fonctionnelle identifiée. La phosphorylation de c-Myc en Ser62 par la kinase ERK permet une seconde phosphorylation de c-Myc en Thr58 par la kinase GSK3β. Cette phosphorylation provoque le recrutement de l'isomérase peptidyl-prolyl cis/trans (Pin1) qui rend le résidu Ser62 accessible à la déphosphorylation par la protéine phosphatase 2A (PP2A) par un changement de conformation (Arnold et Sears, 2008). Cela permet ensuite au suppresseur de tumeur FBW7 (WD repeat domain-containing 7) de se lier et de recruter le complexe Skp1–Cullin-1–FBW7. Ce complexe est à l'origine de l'ubiquitination de c-Myc et de sa dégradation par le protéasome (Meyer et Penn, 2008).

L'oncogène c-Myc possède plusieurs cofacteurs transcriptionnels HAT (CBP/p300, GCN5 et TIP60) permettant de réguler l'acétylation des histones. Il a été montré que c-Myc lui-même pouvait être acétylé par ces enzymes et 6 sites ont été identifiés: K143, K157, K275, K317, K323 et K371. Le rôle biologique de ces modifications post-traductionnelles, étant issues d'études *in vitro*, reste cependant à déterminer. C-Myc peut aussi être la cible de la déacétylase SIRT1. (Farrell et Sears, 2014).

Enfin, c-Myc peut être O-GlcNacylée sur le résidu Thr58, Cette glycosylation empêche la phosphorylation et la dégradation de c-Myc (Itkonen *et al.*, 2013). Nous reviendrons sur le rôle de la O-GlcNAcylation sur l'activité de c-Myc dans une partie dédiée.

Activité transcriptionnelle

La protéine c-Myc régule l'expression de gènes par l'activation ou l'inhibition directe de la transcription des gènes, l'amplification transcriptionnelle, l'induction de régulateurs chromatiniens et de micro-ARNs et la régulation globale de la biogenèse de l'ARN et des protéines.

L'association hétérodimérique de c-Myc et de Max est capable d'activer divers groupes de gènes en fixant une séquence spécifique d'ADN, E-Box, possédant la séquence CANNTG (Blackwell *et al.*, 1990). C-Myc peut agir comme activateur ou répresseur de la transcription.

Son activité activatrice est principalement liée au recrutement de protéines histones acétyltransférases (HAT), comme CBP (CREB-binding protein), à l'origine d'une modification de la structure de la chromatine. Pour interagir avec certaines HAT, comme TIP60 (Tat Interacting Protein 60 kDa) ou GCN5 (General Control Nonderepressible 5), c-Myc requiert la présence de la protéine d'échafaudage TRRAP

(Transformation/transcription domain-associated protein). Il peut aussi recruter d'autres facteurs comme P-TEFb (facteur positif d'élongation de la transcription) qui phosphoryle le domaine carboxy-terminal de l'ARN polymérase II. D'autres cofacteurs régulateurs ont été identifiés, sans que leurs mécanismes d'activation n'aient été identifiés comme Bin1, p107, et la nucleophosmine (Hann, 2020).

L'activité répressive de c-Myc peut se déployer via son interaction directe avec la région promotrice de gènes cibles ou par son interaction avec d'autres facteurs de transcription. C'est par exemple le cas de HDAC3 avec lequel c-Myc interagit pour réprimer des cibles spécifiques. (Chi Van Dang, 2010)

Rôles biologiques de c-Myc

Prolifération et croissance

C-Myc est étroitement lié à la prolifération cellulaire. La progression de la phase G0/G1 à la phase S est contrôlée par l'activité des complexes cycline D/CDK4 et cycline E/CDK2. Or c-Myc initie, entre autres, l'expression de la cycline D2 et de la kinase CDK4, et permet aux complexes cycline D2/CDK4 de séquestrer l'inhibiteur de CDK p27. C-Myc induit l'expression du complexe SCF (Skp-Cullin-F-box containing), qui participe à la dégradation de p27. La levée de l'inhibition du complexe cycline E/CDK2 par p27 permet le passage en phase S. De plus, les inhibiteurs du cycle cellulaire p15 et p21 sont inactivés par l'interaction décrite précédemment entre l'hétérodimère c-Myc/Max et MIZ1 (Bretones *et al.*, 2015).

c-Myc est aussi capable de réguler l'augmentation des cellules en taille et en masse en favorisant la biogénèse ribosomale. Pour cela c-Myc agit sur le contrôle transcriptionnel de l'ARN ribosomal et sur les composants protéiques des ribosomes (Riggelen *et al.*, 2010).

Apoptose

En plus de son rôle dans la prolifération, c-Myc est un important inducteur de l'apoptose. De nombreux travaux ont décrit cette activité de c-Myc. Par exemple, l'étude de la lignée cellulaire murine 32D, qui dépend de l'IL-3 pour assurer sa croissance, montre que la privation en IL-3 provoque la diminution de l'expression de c-Myc, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 et l'apoptose des cellules. *A contrario*, la surexpression de c-Myc dans ces cellules déprivées en IL-3 favorise et accélère l'apoptose. De même, l'expression constitutive de c-Myc par des fibroblastes initie leur apoptose (McMahon, 2014).

L'initiation de l'apoptose par c-Myc repose sur différentes voies de signalisation : la voie dépendante de p53, la voie mitochondriale ou encore celle des

récepteurs de mort cellulaire. La voie dépendante de p53 débute par l'activation de p14ARF/CDKN2A. Il peut alors bloquer hMdm2, un inhibiteur de p53. P53 provoque ensuite l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Zindy *et al.*, 1998). La voie mitochondriale repose sur la répression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL et l'activation des protéines pro-apoptotiques Bak, Bax et PUMA. Elles induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome C dans le cytosol, aboutissant à l'activation des caspases. C-Myc peut enfin déclencher l'apoptose en altérant les voies signalétiques de récepteurs de mort comme DISC, Fas ou TRAIL (Hoffman et Liebermann, 2008)

<u>Métabolisme</u>

C-Myc participe aussi à l'équilibre métabolique des cellules. Parmi les premières cibles identifiées de c-Myc se trouvent la lactate deshydrogénase A et l'ornithine decarboxylase, deux enzymes impliquées respectivement dans la conversion du pyruvate en lactate et dans la synthèse des polyamines. Depuis il a été montré qu'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, en particulier la glycolyse et la glutaminolyse, possèdent un site consensus E-box de haute affinité pour c-Myc. Cela permet à la cellule d'adapter ses ressources énergétiques à l'accroissement des besoins au cours de la prolifération. C-Myc augmente l'activité du transporteur de glucose GLUT1 (Osthus *et al.*, 2000), de plusieurs enzymes de la glycolyse dont HK2, PFK, ENO1 et PKM2 (Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2004; Osthus *et al.*, 2000). Par ailleurs, il a été montré chez le rat que la privation de glucose induit une diminution de la concentration hépatique de c-Myc (Corcos *et al.*, 1987). Cela pourrait signifier un autoentretien de la signalisation c-Myc par la concentration en glucose.

La hausse de la glycolyse provoque la concentration de ROS et d'acide lactique. Or c-Myc favorise la production des enzymes de la voie des pentoses phosphates, génératrice de NADPH et permet de limiter le stress oxydatif induit. L'acide lactique est éliminé par le transporteur MCT1, une autre cible de c-Myc. D'autres travaux montrent que c-Myc promeut la synthèse des lipides, nécessaire à la production de la membrane, et de nucléotides. Deux éléments clefs de la prolifération cellulaire. (Stine *et al.*, 2015).

<u>Immunité</u>

La réponse immunitaire adaptative repose sur la prolifération rapide de lymphocytes B et T en réponse à leur stimulation par un antigène spécifique. L'activation des récepteurs des cellules B et T (BCR et TCR) provoque l'expression de c-Myc (Murn *et al.*, 2009 ; Lindsten *et al.*, 1988). C-Myc enclenche alors la prolifération lymphocytaire via Pi3K/NF-κB dans le lymphocyte B et pkc/nfat/NF-κB dans le lymphocyte T (Grumont *et al.*, 2002 ; Grumont *et al.*, 2004).

La stimulation des macrophages par le CSF-1 provoque l'expression de c-Myc

et favorise leur survie, prolifération, et maturation (Hamilton *et al.*, 1997). La suppression de c-Myc dans ces cellules bloque l'expression du VEGF, de la MMP9, de HIF- 1α et du TGF- β réduisant l'angiogenèse tumorale (Pello *et al.*, 2012 ; Baudino *et al.*, 2002).

C-Myc et cancers

<u>Tumorigénèse</u>

C-Myc est exprimé de façon aberrante dans environs 50% des cancers, en particulier des CHC (Beroukhim *et al.*, 2010 ; Dang *et al.*, 2012). Son rôle dans la carcinogénèse a été identifié pour la première fois dans le lymphome de Burkitt où il subit une translocation activatrice (Taub et al., 1982). Il a depuis été montré qu'il pouvait aussi être amplifié, muté ou simplement surexprimé au cours de la carcinogénèse (Beroukhim *et al.*, 2010 ; He, 1998 ; Shou *et al.*, 2000). L'extinction de c-Myc provoque la régression de plusieurs modèles tumoraux, il est aujourd'hui étudié comme une cible pharmacologique importante (Gabay *et al.*, 2014 ; Chanvorachote *et al.*, 2020).

C-Myc participe à l'invasion métastatique. Il favorise l'activation du complexe protéique polycombe Bmi-1 et promeut la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) (Song *et al.*, 2009). Son expression inhibe celle de la E-cadherine au cours de l'EMT via l'expression de miR-9 qui cible l'ARN messager de la E-Cadherine (Ma *et al.*, 2010).

Métabolisme

L'action protumorale de c-Myc ne se limite pas à son activité en faveur de la prolifération cellulaire. Il est aussi impliqué dans les modifications métaboliques des cellules tumorales, il participe directement à l'initiation de l'effet Warburg (Goetzman et Prochownik, 2018 ; Hu *et al.*, 2011).

La glutaminolyse est fortement accrue par la carcinogénèse (Deberardinis *et al.*, 2008). Or, les cellules tumorales dépendent de cet acide aminé pour leur croissance et leur prolifération, c'est particulièrement le cas des tumeurs exprimant c-Myc (Reitzer *et al.*, 1979; Wise *et al.*, 2008; Dang, 2010; Kaadige *et al.*, 2010). Plusieurs études montrent que c-Myc participe à la régulation de la glutaminolyse tumorale (Dang, 2013; Miller *et al.*, 2012; Goetzman et Prochownik, 2018). Il permet d'augmenter l'absorption de glutamine en induisant l'expression des transporteurs dédiés: SLC7A1 et SLC5A1 (Gao *et al.*, 2009). La suppression de l'accès à la glutamine (par déprivation ou par inhibition de la GLS) dans les cellules tumorales hépatique exprimant c-Myc suffit à provoquer leur apoptose (Klimberg et McClellan, 1996; Yuneva *et al.*, 2012).

Réparation de l'ADN

Au cours de la carcinogénèse, la forte production de c-Myc associée à la prolifération tumorale est à l'origine d'une importante instabilité génétique : amplification génique, mutagénèse insertionnelle ou encore translocations (Taub *et al.*, 1982 ; Shen-Ong 1982 ; Pear *et al.*, 1988). Or, paradoxalement, la concentration tumorale en c-Myc est fortement corrélée à la résistance aux chimiothérapies endommageant l'ADN, en particulier dans le CHC. L'inhibition de c-Myc par le 0058-F4 rétablit la sensibilité cellulaire aux chimiothérapies (Lin *et al.*, 2007). Une étude a montré dans une lignée cellulaire de rhabdomyosarcome que c-Myc protège de l'apoptose induite par des dommages génétiques radio-induits, et favorise leur réparation (Gravina *et al.*, 2016).

Expliquant ce rôle de c-Myc, il a été montré que ce facteur de transcription est capable de fixer les régions promotrices de plusieurs gènes impliqués dans la réparation des cassures de l'ADN double brins : NBS1, Ku70, Rad51, BRCA2, Rad50 (Chiang *et al.*, 2003 ; Li *et al.*, 2003 ; Luoto *et al.*, 2010). Par ailleurs c-Myc agit sur la prolifération de concert avec d'autres facteurs de transcription en particulier E2F1, aussi impliqué dans la formation du complexe MRN (Mre11, Rad50 et Nbs1) de réparation de l'ADN (Frame *et al.*, 2006). Une collaboration entre ces deux facteurs de transcription permettant d'expliquer les effets protecteurs de c-Myc a été proposée (Kumari *et al.*, 2017).

1.4 Classifications moléculaires des CHCs

Les CHCs forment un ensemble très hétérogène de cancers. Cette hétérogénéité tumorale est liée à la grande variété des facteurs de risque et des mécanismes sousjacents de carcinogenèse. A cette variété interindividuelle s'ajoute une variété intraindividuelle caractérisée par la présence d'altérations génétiques et épigénétiques différentes retrouvées au sein des nodules d'un même CHC, d'un unique patient, et parfois au sein d'un seul nodule (Bruix *et al.*, 2014). L'évolution clinique des patients est également variable (Llovet *et al.*, 1999). Il est devenu important de proposer des critères biologiques de stratification des tumeurs à des fins pronostiques et thérapeutiques, le seul classement par étiologie étant insuffisant. Les mutations « driver » peuvent être des caractéristiques de l'origine ethnique ou de l'héritage ancestral (Totoki *et al.*, 2014).

Un grand nombre de classifications moléculaires ont été proposées décrivant des sous-groupes de CHC basés sur des critères épidémiologiques, génétiques, génomiques, histologiques et cliniques. Nous avons pris le parti dans ce mémoire de ne présenter que quelques études pionnières basées sur des données transcriptomiques.

1.4.1 Classification 2004 en deux clusters (Lee et al.)

En 2004, Lee *et al.* ont proposé une méthode de classification des CHCs en deux groupes sur la base de leur profil d'expression génique (Lee *et al.*, 2004) (Figure 17). Après analyse de 91 tumeurs de CHC par puces à ADN et corrélation des résultats transcriptomiques avec l'évolution clinique, les auteurs sont parvenus à extraire un ensemble de gènes permettant de stratifier les patients en fonction de la survie : les patients du cluster A (44% des patients) présentent une survie de $30,3\pm8,02$ mois et les patients du cluster B (56% des patients) une survie de $83,7\pm10,3$ mois.

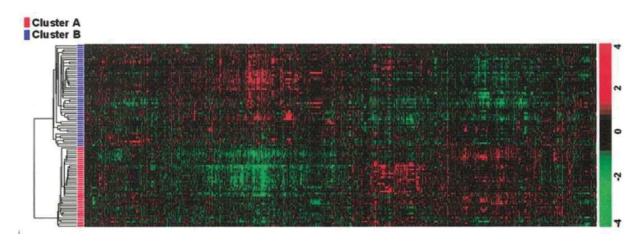


Figure 17 - Classification moléculaire en deux clusters. (Lee et al., 2004).

1.4.2 Classification 2007 en 6 groupes (Boyault et al.)

Cette classification a été construite en trois étapes successives à partir d'analyses réalisées sur un total de 537 échantillons de CHC (Laurent-Puig *et al.*, 2001 ; Boyault *et al.*, 2007 ; Calderaro *et al.*, 2017).

Les auteurs ont proposé de répartir les tumeurs analysées en deux clusters suivant leur degré de stabilité génétique. Cette classification associe au cluster I à forte instabilité des mutations de l'AXIN1 et de TP53 ainsi qu'une faible différentiation tumorale, une forte expression de l'AFP et une étiologie virale (VHB). Le cluster II faiblement instable sur le plan génétique est associé à des mutations du gène de la β-caténine (CTNNB1), des tumeurs plus volumineuses et non virales avec un meilleur pronostic des patients. Ce dernier cluster contient l'ensemble des tumeurs exprimant la lectine REG3A. Les auteurs rapportent également que les mutations de TP53 et de CTNNB1 sont mutuellement exclusives et permettent, si l'une est présente, de sélectionner un cluster.

Les clusters I et II ont été divisés en 3 groupes (Cluster I : G1-G2-G3 ; Cluster II : G4-G5-G6) comprenant pour Cluster I 9%, 9%, 12% des patients, et pour Cluster II 39%,

19%, 12% des patients, respectivement. Les CHCs ont été répartis en fonction des mutations détectées ainsi que des caractéristiques histologiques et cliniques dont disposaient les auteurs : hausse des marqueurs KRT19 et EpCAM (G1), invasion macrovasculaire et expression de phospho-S6 (G3), hausse de la CRP (G4), production biliaire cholestatique (G5-G6) (Figure 18).

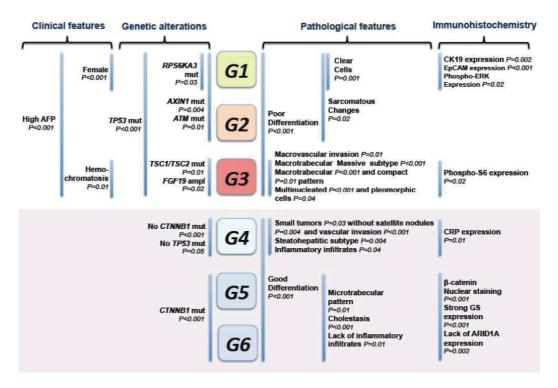


Figure 18 - Classification moléculaire en six groupes. (Calderaro et al., 2017)

1.4.3 Classification 2004 en deux groupes (Breuhahn et al.)

Breuhahn *et al.* ont proposé de classer les CHCs en deux catégories A et B (Breuhahn *et al.*, 2004) (Figure 19). Les auteurs proposent également une classification moléculaire basée sur l'analyse du profil d'expression génique par puces à ADN de 43 échantillons tumoraux et de trois lignées cellulaires. Les auteurs réunissent dans le groupe A (65% des patients) les CHCs présentant une surexpression des gènes de la voie de l'interféron (IFN) et dans le groupe B (35% des patients) les CHCs dans lesquels la voie de l'IFN est régulée négativement. Le groupe B est divisé en deux sous-groupes B1 et B2, le sous-groupe B1 regroupant les tumeurs dans lesquelles la voie du facteur de croissance similaire à l'insuline II (IGF-II) est régulée positivement, et le sous-groupe B2 celles dans lesquelles cette voie est régulée négativement. Aucune analyse de corrélation de cette classification aux données cliniques (progression/récidive, survie, efficacité thérapeutique) n'a été réalisée dans cette étude.

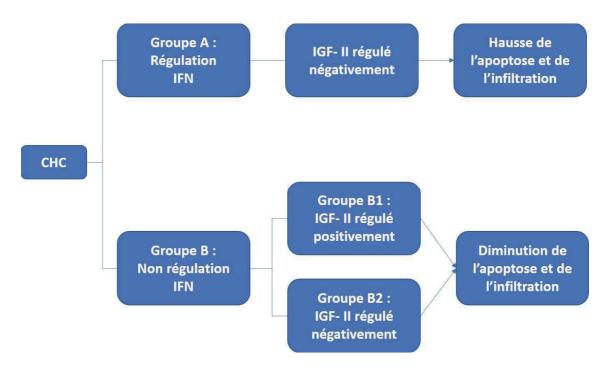


Figure 19 - Classification 2004 en deux groupes. (Breuhan et al., 2004)

1.4.4 Classification 2010 en trois groupes (Hoshida et al.)

Cette autre classification, que nous utiliserons par la suite, a proposé de répartir les CHCs en 3 groupes sur la base d'une méta-analyse de données transcriptomiques (Hoshida *et al.*, 2010) (Figure 20). Les deux premiers groupes, S1 (30% des patients) et S2 (25% des patients), sont caractérisés par une forte agressivité tumorale avec une taille tumorale et une dédifférenciation importantes associées à une activation du facteur de croissance épidermique 1 (EGF1) et une inactivation de TP53. S1 et S2 sont apparentés au Cluster I de la classification de Boyault *et al.* Le groupe S1 est de plus associé à une activation de la voie du TGF-β (facteur de croissance transformant beta) alors que le groupe S2 est associé à une activation du facteur de transcription c-MYC et de la protéine kinase B (PKB / AKT) ainsi qu'à de fort taux d'AFP. Le groupe S3 (45% des patients) comprend des tumeurs relativement moins agressives et bien différenciées avec maintien d'une activité hépatocytaire et activation de la voie β-caténine. Le groupe S3 est associé au Cluster II de la classification de Boyault *et al.* et contient une nouvelle fois les CHCs exprimant REG3A.

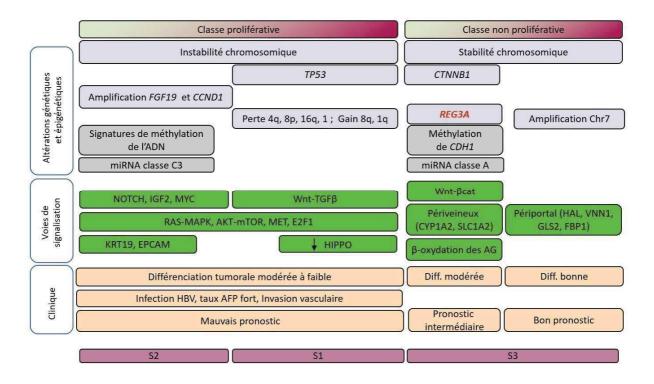


Figure 20 - Classification 2010 en trois groupes. (Hoshida *et al.*, 2010), figure adaptée de Dos Santos, 2019.

Une version révisée de cette classification intégrant les caractéristiques histologiques de chaque groupe a été rapportée (Tan *et al.*, 2015). Le groupe S1 inclut les échantillons avec stéatohépatite et infiltrat immunitaire ainsi qu'un marquage positif de la survivine. Le groupe S2 est associé à une infiltration vasculaire importante, un profil macro-trabéculaire et un marquage positif au glypican 3 (GPC3). Le groupe S3 présente une apparence pseudo-parenchymateuse, un profil micro-trabéculaire et exprime les marqueurs LYVE1 (récepteur 1 de l'hyaluronane endothélial du vaisseau lymphatique) et glutamine synthétase (GS).

1.5 Prise en charge médicale

1.5.1 Diagnostic & pronostic

Plusieurs modalités d'examen sont disponibles pour assurer le diagnostic et le suivi des patients avec CHC. Il s'agit de l'imagerie (échographie, scanner, IRM), de l'examen sanguin et de la biopsie.

L'échographie est l'examen de première intention utilisé pour le suivi de patients cirrhotiques à risque de développer un CHC. Elle permet de mettre en évidence la formation de nodules intra-parenchymateux et d'évaluer la faisabilité ultérieure d'une biopsie. En cas d'apparition d'un nodule suspect, le premier examen réalisé est le scanner injecté thoraco-abdomino-pelvien (scan TAP) aux trois temps de distribution

du produit de contraste dans l'organisme : artériel, portal et tardif. Le caractère tumoral du nodule est mis en évidence par une hyper-vascularisation au temps artériel et un phénomène de « lavage nodulaire » au temps portal et/ou tardif, c'est-à-dire une hypodensité dans le nodule suspect comparativement au reste du parenchyme. Cet examen permet aussi d'évaluer l'extension de la maladie au sein d'autres organes en particulier des ganglions régionaux. Sauf contre-indication, l'IRM est ensuite systématique et permet de confirmer la prise de contraste et le lavage nodulaire et de mieux caractériser les lésions.

L'alpha-fœtoprotéine (AFP) est le seul marqueur tumoral sérique utilisé en cancérologie hépatique. Anormal au-dessus de 20 ng/ml, il est un indice diagnostique du CHC lors qu'il dépasse les 400 ng/ml mais ne peut suffire seul à établir le diagnostic (Balogh *et al.*, 2016). Il reste négatif dans 30% des CHC et peut être positif dans d'autres pathologies malignes ou non malignes digestives, pulmonaires ou testiculaires (Li *et al.*, 2001). La ponction-biopsie hépatique (PBH) participe au diagnostic en confirmant la malignité du nodule et au pronostic en permettant la gradation histologique de la lésion. Effectuée sous contrôle échographique, elle doit contenir des tissus sain et pathologique. Une biopsie négative n'élimine pas la possibilité d'une tumeur maligne et nécessite de maintenir la surveillance du nodule incriminé.

Consécutivement à la découverte d'un nodule suspect chez un patient, l'algorithme de prise en charge diagnostique recommande, lorsque celui-ci mesure moins d'un centimètre, de maintenir un contrôle échographique tous les trois mois. En cas de modification de taille ou d'aspect ou si le nodule présente d'emblée un diamètre supérieur à 1 centimètre, un scanner ou une IRM devra être effectué pour rechercher une hyper-vascularisation et un phénomène de lavage nodulaire. En son absence, une autre méthode d'imagerie pourra être utilisé ou une PBH devra être effectuée. En cas de mise en évidence du lavage nodulaire ou si les critères histologiques sont retenus sur la biopsie, le diagnostic de CHC doit être retenu (Figure 21).

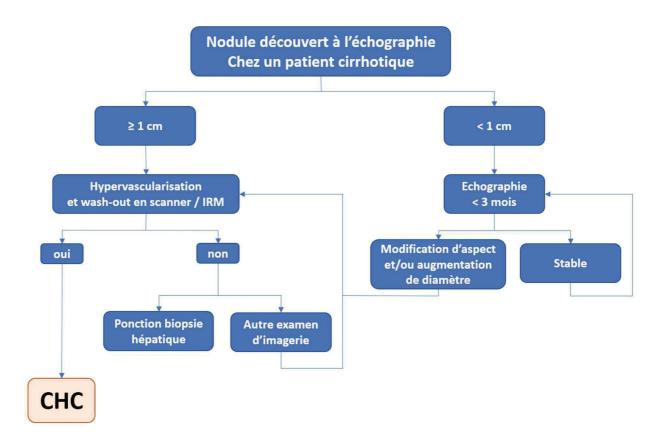


Figure 21 - Algorithme diagnostique du CHC.

Deux scores sont employés dans le suivi de patients cirrhotiques à risque de développer un CHC : les scores de MELD (modèle de maladie hépatique en phase terminale) et de Child-Pugh.

Le CHC se développe presque toujours aux dépens d'un foie cirrhotique constitué de nodules de régénération facilement identifiables en histologie. C'est au sein d'un de ces nodules qu'apparaît le carcinome. Encore bien différencié, celui-ci va croître et s'entourer d'une capsule fibreuse, jusqu'à sortir du nodule. Il va ensuite se dédifférencier d'abord de façon modérée puis jusqu'à atteindre un niveau élevé d'anaplasie (Kojiro *et al.*, 1996). Dans les stades les plus avancés, la tumeur développe autour d'elle des petits nodules de tissu tumoral dit « nodules satellites » jusqu'à former une structure multifocale dans l'ensemble du parenchyme. Dans le cas rare où le CHC se développe sur un foie non-cirrhotique, la présence de la capsule fibreuse est beaucoup moins fréquente, la tumeur a tendance à prendre un aspect spiculé et à envahir le tissu sain adjacent.

Sur le plan vasculaire, l'invasion micro- et macro-vasculaire est un phénomène régulièrement mis en évidence d'abord sur le versant portal. Cela participe à la dissémination intra- et extra-hépatique de la maladie.

Sur le plan architectural, si les cellules cancéreuses ont d'abord tendance à conserver leur organisation originelle en travées, ; elles perdent rapidement leur organisation à l'échelle lobulaire. Avec la perte de différenciation, c'est l'ensemble de la structure hépatique qui finit par disparaître pour être remplacée par une autre architecture, pathologique. La littérature en décrit quatre (Figure 22) : microtrabéculaire, pseudo-glandulaire, macro-trabéculaire et compacte (Schlageter *et al.*, 2014).

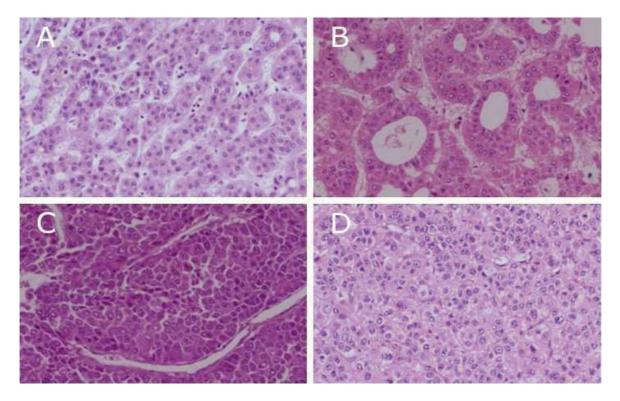


Figure 22 - Architectures histologiques des CHCs. (A) Micro-trabéculaire (B) Pseudoglandulaire (C) Macro-trabéculaire (D) Compact. (Rastogi et al., 2018)

Plusieurs classifications ont été proposées définissant des grades de tumeur en fonction de caractéristiques histologiques. Les deux classifications les plus couramment utilisées sont « OMS » et « Edmonson ».

La classification OMS décrit trois grades aux définitions succinctes :

- OMS 1 : Tumeur bien différenciée
- OMS 2 : Tumeur moyennement différenciée
- OMS 3 : Tumeur peu différenciée

La classification d'Edmonson décrit quatre grades (Figure 23) :

- Le grade I correspond à de petites cellules tumorales trabéculaires avec un cytoplasme abondant et peu d'irrégularités nucléaires. Elles ne sont pas ou peu différenciables des hépatocytes sains.
- Le grade II présente de volumineux nucléoles, un hyper-chromatisme et un niveau plus important d'irrégularités nucléaires.
- Le grade III montre une hétérogénéité plus importante de taille et de forme ainsi que des noyaux anguleux.
- Le grade IV possède une hétérogénéité massive associée à des cellules géantes anaplasiques.

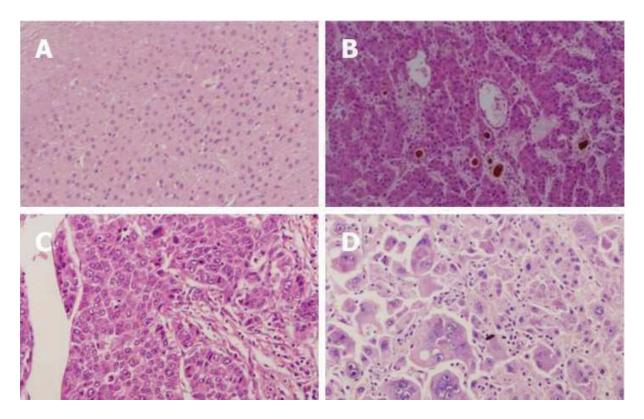


Figure 23 - Score histo-pronostique d'Edmonson. (A) Grade I (B) Grade II (C) Grade III (D) Grade IV. (Rastogi et al., 2018)

1.5.2 Traitements

Chirurgie

A l'heure actuelle, le CHC concerne environ un tiers des patients en attente de transplantation hépatique. Du fait de la pénurie de greffon et des risques importants de récidive tumorale après chirurgie, des critères d'éligibilité à la transplantation ont été établies sous l'appellation « critères de Milan ». Ces derniers autorisent la transplantation hépatique chez des patients présentant un nodule tumoral unique de diamètre inférieur à 5 cm ou 2 à 3 lésions de moins de 3 cm, en l'absence d'invasion thrombotique portale ou hépatique. Cette sélection des patients a permis d'atteindre aujourd'hui une survie à 5 ans de 75% après transplantation (Sapisochin *et al.*, 2016). Cependant, de façon à traiter un plus grand nombre de patients, des critères plus souples sont expérimentées dans plusieurs centres et sous différentes dénominations comme le « critère de San Francisco » ou le « critère jusqu'à sept » (Decaens *et al.*, 2009 ; Mazzaferro *et al.*, 2009). Enfin, l'usage en France du « Score AFP » présente des résultats prometteurs (Duvoux *et al.*, 2012).

La résection partielle présente l'avantage d'éviter au patient la longue attente d'un greffon disponible et le risque d'aggravation subséquent, ainsi que les traitements anti-rejet nécessaire par la suite. Néanmoins, celle-ci ne peut être proposée que chez des patients ayant une fonction hépatique suffisamment préservée et sans hypertension portale. Un minimum de 40% de parenchyme hépatique doit être conservé (Vauthey *et al.*, 2010). La survie à 5 ans peut alors atteindre 72% (Cherqui *et al.*, 2009).

De nombreux patients ne sont pas éligibles à la transplantation ou à la résection. Dans ces cas, plusieurs procédures ont été développées pour ralentir la progression et réduire la taille des nodules tumoraux. Il s'agit d'interventions locorégionales permettant au patient de devenir éligible aux chirurgies mentionnées précédemment ou à visée palliative. Ces méthodes incluent l'ablation par radiofréquence (RFA), la chimio-embolisation trans-artérielle (TACE), la radio-embolisation au Yttrium-90 (Y-90), l'ablation aux micro-ondes (MWA), les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) et l'électroporation irréversible (IRE) (Lurie *et al.*, 2019).

Thérapie ciblée

Le sorafenib est le seul médicament de première ligne ayant obtenu une AMM dans le traitement du CHC après avoir fait preuve de son efficacité relative au cours de l'essai SHARP (Llovet *et al.*, 2008). Il est aussi employé contre les carcinomes rénaux et thyroïdiens. Il s'agit d'un inhibiteur de kinase réduisant la prolifération cellulaire en ciblant la protéine RAF. Il possède une fonction anti-VEGF (Wilhelm *et al.*, 2008). Son

efficacité thérapeutique reste cependant limitée avec une survie médiane des patients faiblement augmentée. Celle-ci passe de 7,9 mois dans le groupe contrôle à 10,7 mois dans le groupe traité (Wilhelm *et al.*, 2008). D'autres médicaments, ont reçu un avis favorable de la HAS en seconde ligne : le regorafenib et le cabozantinib. D'autres traitements comme le lenvatinib sont en développement et toujours en attente d'autorisations (Kudo *et al.*, 2018).

Chimio et radiothérapies

Le CHC est considéré comme étant un cancer chimio-résistant. Les chimiothérapies classiques ont été largement utilisées sans résultat significatif, seules certaines sont prescrites à titre palliatif afin d'améliorer le confort des patients. C'est le cas de la doxorubicine, du 5-FU et du cisplatine administrés seuls ou en combinaison (Brito et al., 2012). La radiothérapie conventionnelle n'a pas non plus démontré d'effet sur la progression de la pathologie et sur la survie des patients. Elle reste employée là aussi uniquement à titre palliatif. La radiothérapie stéréotaxique délivre une dose de rayonnement très élevée dans une volume restreint de façon plus précise que la radiothérapie conventionnelle. Elle semble avoir un effet positif pour les patients non-résécables (Wahl et al., 2016) mais reste difficile d'accès du fait du faible nombre d'hôpitaux équipés.

La O-GlcNAcylation des protéines : régulateur de la signalisation cellulaire

2.1 Généralités

2.1.1 Présentation

De nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) des protéines ont été décrites dans la littérature (Figure 24): changement de structure (clivage, pont disulfure, ...), ajout ou retrait d'un groupe fonctionnel (phosphorylation, méthylation, acétylation, nitrosylation, palmitoylation, farnésylation, hydroxylation, oxydation, ...) ou d'un polypeptide (sumoylation, ubiquitinylation, ...). Elles peuvent avoir de nombreuses conséquences et modifier la stabilité des protéines, leur activité, leur localisation, les interactions entre protéines au sein d'assemblages moléculaires, etc. Des modifications post-traductionnelles différentes peuvent avoir un effet similaire sur une protéine, alors qu'une même modification peut avoir des effets différents, parfois opposés, en fonction de la protéine cible.

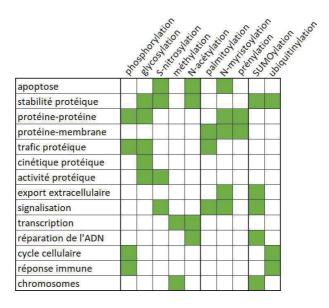


Figure 24 - Principales modifications post-traductionnelles des protéines et impacts biologiques.

La O-N-acétylglucosaminylation, abrégée en O-GlcNAcylation, est une MPT consistant en l'ajout d'un résidu unique de N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le groupement hydroxyle d'acides aminés sérine ou thréonine (Figure 25). Il s'agit d'une MPT dynamique et réversible agissant comme un senseur métabolique du glucose c'est-à-dire dont les niveaux dépendent de la disponibilité cellulaire en glucose. Elle peut affecter des protéines cytosoliques, nucléaires ou mitochondriales comme des facteurs de transcription, des histones, des phosphatases et kinases, des enzymes métaboliques, des protéines de signalisation, des nucléoporines, des composants du cytosquelette, etc. A ce jour plus de 4000 protéines OGlcNAcylées ont été décrites (Baldini *et al.*, 2016).

Figure 25 - Structure du N-Acetylglucosamine.

Cette MPT a été décrite pour la première fois en 1984 par G.W. Hart et C.R. Torres (Torres et Hart, 1984). Elle a depuis été identifiée dans l'ensemble des 7 règnes du vivant :

- Archébactérie : Pyrococcus furiosus (Mizanur *et al.*, 2005)
- Bactérie : Listeria monocytogenes (Schirm *et al.*, 2004)
- Protozoaire : Giardia intestinalis (Banerjee *et al.*, 2008)
- Chromiste: Toxoplasma gondii (Perez-Cervera *et al.*, 2010)
- Fungi: Aspergillus niger (Woosley *et al.*, 2006)
- Plantes: A. thaliana, N. Tabacum (Olszewski *et al.*, 2010; Schouppe *et al.*, 2011)
- Animaux : C. Elegans, D. Melanogaster (Lubas *et al.*, 1997 ; Kelly et Hart, 1989)

Elle est aussi retrouvée dans plusieurs virus tels que le cytomégalovirus (GlcNAc-CMV) et le virus simien 40 (SV40) (Medina *et al.*, 1998).

Il existe une autre forme de O-GlcNAcylation ayant lieu dans la lumière du réticulum endoplasmique. Elle consiste en l'ajout d'un résidu GlcNAc sur le domaine extracellulaire de protéines possédant un domaine EGF, en particulier les récepteurs Notch et leurs ligands Delta et Serrate (Matsuura *et al.*, 2008). Cette MPT est médiée par une forme spécifique d'enzyme transférase de O-GlcNAc dite eOGT (EGF domainspecific O-linked N-acetylglucosamine transferase). Elle ne présente aucun rapport avec l'OGT intracellulaire que nous présenterons plus loin (Sakaidani *et al.*, 2011). Un lien entre des mutations du gène codant eOGT et le syndrome de Adams-Oliver, une maladie congénitale caractérisée par des malformations des membres, cardiovasculaires, cérébrales et des anomalies vasculaires, a été établi en 2014 (Ogawa *et al.*, 2014). L'eOGT est fortement exprimée dans les cellules endothéliales où elle régule le développement et l'intégrité de l'axe vasculaire via la voie de signalisation Notch. Aujourd'hui, onze protéines extracellulaires modifiées par la eOGT ont été identifiées (Ogawa et Okajima, 2019).

2.1.2 Sites consensus

Le O-GlcNAc peut être ajouté sur un très grand nombre de sérine/thréonine, mais aucune séquence peptidique consensus n'a été identifiée. Néanmoins, une séquence de type « P/V P/V V gS/T S/T » est présente dans plus de 50% des sites de O-GlcNAcylation identifiés (Wang *et al.*, 2010) et les séquences « P X gT X A » et « P V gS » ont aussi été associées à cette MPT (« g » indique ici le résidu O-GlcNAcylé) (Alfaro *et al.*, 2012).

2.2 Voie de biosynthèse des hexosamines

Le résidu GlcNAc fixé au cours de la O-GlcNAcylation provient d'une molécule d'uridine diphosphate N-acétylglucosamine, abrégé en UDP-GlcNAc. La synthèse de l'UDP-GlcNAc est effectuée par la voie de biosynthèse de l'hexosamine (HBP) (Figure 26).

Une fois entré dans la cellule par les transporteurs GLUT (GLUT1 et GLUT2 au niveau hépatique), le glucose est immédiatement phosphorylé par une hexokinase en glucose-6-phosphate (G6P). Trois voies métaboliques sont alors accessibles : celle du glycogène permettant le stockage des glucides, celle des pentoses-phosphates menant à la production de NADPH et de ribose-5-P et celle de la glycolyse. Cette dernière débute par la transformation du G6P en fructose-6-phosphate (F6P) par l'action d'une isomérase et se poursuit jusqu'à la formation de pyruvate, nécessaire à la production d'ATP via le cycle de Krebs ou via la fermentation lactique. Entre 2 et 5% du F6P échappe à cette voie pour rejoindre celle de l'HBP (Akella *et al.*, 2019).

L'amorçage de l'HBP se fait sous l'action de la Glutamine Fructose-6-phosphate Amido Transférase (GFAT) sur le F6P pour le convertir en glucosamine-6-phosphate (GlcNH2-6-P). Le GlcNH2-6-P est lui-même acétylé en N-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6-P) par la Glucosamine-6-phosphate Acétyltransférase à l'aide d'Acétyl-CoA. Le GlcNAc-6-P est ensuite converti en N-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P) par l'acétylglucosamine phosphomutase. Enfin le GlcNAc-1-P est transformé par l'UDP-N-acetylhexosamine pyrophosphorylase en Uridine-diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc). Le N-acétylglucosamine issu de l'hydrolyse d'une protéine par l'OGA peut ré-entrer la voie des hexosamines sous forme de O-GlcNAc-6-phosphate après avoir été phosphorylé par la O-GlcNAc-kinase.

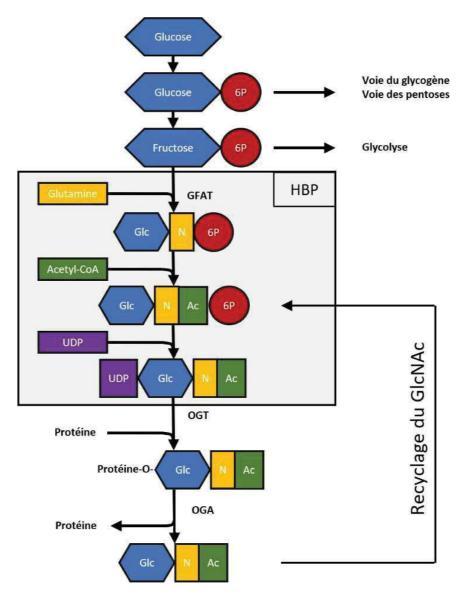


Figure 26 - Voie de biosynthèse des hexosamines.

L'enzyme GFAT est le principal régulateur de l'HBP. Directement régulée par le taux d'UDP-GlcNAc, il se forme une boucle de rétroaction négative permettant d'en contrôler la concentration cellulaire (Broschat *et al.*, 2002). Cependant, un apport en glucosamine permet de passer outre la GFAT et d'augmenter le taux d'UDP-GlcNAc présent.

2.3 Enzymes régulatrices

2.3.1 OGT

Généralités

Contrairement à d'autres MPT qui font appel à une grande variété d'enzymes, en particulier pour assurer la phosphorylation/déphosphorylation, L'ajout et le retrait du O-GlcNAc est effectué par un seul couple d'enzymes O-GlcNAc transférase (OGT) et O-GlcNAcase (OGA). L'OGT a été identifiée en 1990 par l'équipe de Hart *et al.* à partir de réticulocytes de lapin et de foies de rat (Haltiwanger *et al.*, 1990, 1992). Sur le plan structural, l'OGT fixe d'abord l'UDP-GlcNAc puis la protéine cible (Lazarus *et al.*, 2011; Schimpl *et al.*, 2012).

Gène et structure protéique

Le gène codant l'OGT est globalement bien conservé entre espèces avec une homologie de séquence de 80% entre l'Homme et le rat (Hanover *et al.*, 2003) et de 68% entre l'Homme et C. Elegans (Lubas *et al.*, 1997). Son activité est essentielle au développement fœtal, l'invalidation de l'homologue murin étant létale chez la souris dès le 4ème jour de développement embryonnaire (Shafi *et al.*, 2000). Elle est aussi essentielle au bon fonctionnement de nombreux processus cellulaires, l'invalidation conditionnelle du gène codant l'OGT dans les thymocytes, les fibroblastes ou les neurones provoque l'apoptose des lymphocytes T thymiques, l'arrêt de croissance des fibroblastes et des modifications majeures de la signalisation neuronale (O-Donnell *et al.*, 2004).

Chez les mammifères, le gène de l'OGT se situe sur le chromosome X au locus q13.1 (Nolte et Muller, 2002). Cette région proche du centromère est réputée fragile et est associée à des pathologies du système nerveux comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Shafi *et al.*, 2000 ; Haberhausen *et al.*, 1995 ; Kulshrestha *et al.*, 2017). Il contient 23 exons et 21 introns dont la transcription est sous la dépendance de deux promoteurs alternatifs P1 et P2 (Hanover *et al.*, 2003). Trois différents transcrits sont issus du gène résultant en trois isoformes protéiques (Figure 27) :

- ncOGT, 110 kDa. Forme nucléocytoplasmique, issu du promoteur P1. Elle est la forme la plus abondante et est retrouvée à des niveaux variables d'expression dans tous les types cellulaires.
- mOGT, 103 kDa. Forme mitochondriale, issue du promoteur P1.
- sOGT, 78 kDa. Forme courte, issue du promoteur P2. Elle a aussi une localisation nucléocytoplasmique et est exprimée de façon ubiquitaire.

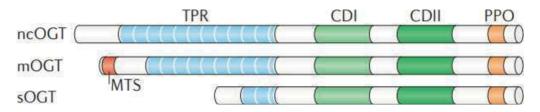


Figure 27 - Structure des isoformes de l'OGT. (Yang et Qian, 2017)

La protéine OGT est divisée en 4 domaines : du côté C-terminal, les domaines catalytiques I et II (CDI et CDII) et le domaine de fixation des phosphoinositides (PPO) et, du côté N-terminal, les domaines de répétition de tricopeptides (TPRs) auxquels s'ajoute la séquence d'adressage à la mitochondrie (MTS) dans le cas particulier de la mOGT.

Le mécanisme par lequel l'OGT reconnait ses substrats est encore largement inconnu. L'hypothèse actuelle propose qu'elle interagisse avec ses cibles à l'aide de ses TPRs. En effet, différentes isoformes d'OGT avec des longueurs différentes dans les TPRs présentent des spécificités de substrats différentes. Une autre hypothèse propose que l'OGT forme des holoenzymes dynamiques avec divers partenaires protéiques qui facilitent la reconnaissance des substrats (Butkinaree *et al.*, 2010 ; Chikanishi *et al.*, 2010). Par exemple, l'interaction entre OGT et p38-MAPK active la O-GlcNAcylation du neurofilament H (Cheung et Hart, 2008). Un mécanisme de régulation par des protéines adaptatrices a aussi été proposé (cf. infra).

A l'exception du MTS, seul le nombre de domaines TPRs diffère en fonction des isoformes. Ils sont au nombre de 12, 9 et 3 dans ncOGT, mOGT et sOGT, respectivement. Codés par les exons 1-4 et 7-13, il s'agit de motifs de 34 acides aminés qui interviennent dans les interactions protéine-protéine et dans l'assemblage de complexes macromoléculaires. Ces domaines permettent la multimérisation de l'OGT et sa liaison aux différentes cibles. Leurs délétions ne diminuent pas l'activité enzymatique de l'OGT mais modifie le profil général de O-GlcNAcylation des protéines (Iyer et Hart, 2003).

L'extrémité C-terminale de l'OGT gouverne les fonctions catalytiques de l'enzyme. Il a été proposé que le CDI fixe l'UDP-GlcNAc et que le CDII soit un motif assimilé aux lectines par homologie avec d'autres glycosyltransférases (Roos and Hanover, 2000). Le domaine de liaison aux phosphoinositides permet à l'OGT d'être recruté à la membrane par le PIP3 (Issad, 2010).

Modifications post-traductionnelles

Quatre différentes MPT de l'OGT ont été décrites, certaines de leurs fonctions restent encore débattues. Il s'agit de la phosphorylation, la O-GlcNAcylation, la S-Nitrosylation et l'ubiquitinylation.

- Phosphorylation: L'OGT est la cible de plusieurs kinases dont les calmodulines II et IV et la protéine kinase A (PKA) (Song *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2010). Plusieurs sites de phosphorylation ont été décrits au niveau des domaines TPRs sur la thréonine 325 et sur les sérines 3, 4, 10, 11, 15 et 20 (Olsen *et al.*, 2010) ainsi que sur la tyrosine 979 (Kreppel *et al.*, 1997). La phosphorylation de l'OGT pourrait entraîner une hausse de son activité enzymatique (Whelan *et al.*, 2008). En particulier, cela a été montré concernant la phosphorylation de la sérine 3/4 par la GSK3β (Kaasik *et al.*, 2013).
- GlcNAcylation : l'OGT peut elle-même être O-GlcNAcylée, deux sites ont été identifiés chez le rat (Kreppel et al., 1997). Ce même phénomène d'auto-GlcNAcylation a été mis en évidence pour l'OGT humaine en 2010 (Lubas et Hanover, 2000) et une étude sur des cellules d'insecte Sf9 a identifié deux sites supplémentaires entre les résidus 390 et 406 et les résidus 1037 à 1046 (Tai et al., 2004). Une autre étude sur des cellules Sf9 a montré que les formes ncOGT et sOGT étaient glycosylées à 3,3% et 39,7%, respectivement (Rexach et al., 2010). A ce jour aucun rôle n'a pu être attribué à cette modification de l'OGT.
- S-Nitrosylation : A l'état basal, l'OGT de macrophages murins est S-Nitrosylé, cela réduit leur activité de 80%. La dénitrosylation peut être provoquée par une stimulation aux lipopolysaccharides (LPS) ce qui laisse penser aux auteurs que l'OGT aurait un rôle dans la réponse immunitaire (Ryu et Do, 2011).
- Ubiquitinylation : une étude a montré que la surexpression combinée de l'OGT et de l'ubiquitine provoque l'ubiquitinylation de l'OGT et augmente sa dégradation par le protéasome (Park *et al.*, 2014).

Autres mécanismes de régulation

En premier lieu il est intéressant de noter que la concentration en UDP-GlcNAc a un impact direct sur l'activité de l'OGT. En effet, la constante de Michaelis (Km) de l'enzyme présente trois valeurs croissantes (6, 35, 217 μ M) lorsque la concentration en UDP-GlcNAc augmente (Kreppel et Hart, 1999) (Figure 28). Cela permet à l'OGT de conserver une activité dose-dépendante à des niveaux de concentration d'UDP-GlcNAc extrêmement variables.

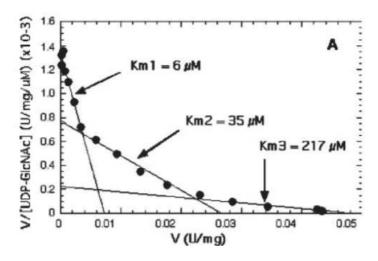


Figure 28 - Détermination des constantes de Michaelis-Menten de l'OGT. (Kreppel et Hart, 1999)

Plusieurs études indiquent que l'activité enzymatique de l'OGT dépend de l'intervention d'autres protéines dites adaptatrices (Figure 29). L'usage de ces protéines partenaires permet à l'OGT de présenter une certaine sélectivité (Laarse *et al.*, 2018). Parmi ces adaptateurs se trouvent : mSin3A (Yang *et al.*, 2002), OIP-106 et GRIF1 (Iyer et Hart, 2003), la phosphatase PP1 (Wells *et al.*, 2004), l'ataxine-10 (Andrali *et al.*, 2005) et plus récemment décrit le Mi2β (Zhang *et al.*, 2016) et UAP1L1 (Lai *et al.*, 2018).

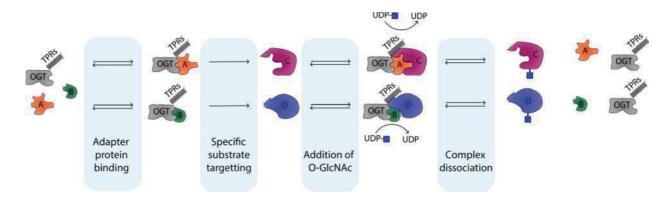


Figure 29 - Mécanisme de spécificité des OGT via la formation de complexes avec des protéines adaptatrices. (Laarse et al., 2018)

Inhibiteurs d'origine synthétique

Trois catégories d'inhibiteurs de l'OGT ont été décrites : les analogues de l'UDP-GlcNAc, les molécules inhibitrices bi-substrats et les composés identifiés par criblage haut débit. Le premier analogue de l'UDP-GlcNAc a été découvert en 2002 (Konrad et al., 2002). Il s'agit d'un analogue de l'uracile, l'alloxane. De nombreux effets secondaires lui sont associés en particulier l'accumulation de ROS (Marin et al., 2011). Pour y remédier, de nouveaux analogues ont été développés : L'UDP-S-GlcNAc, l'UDP-C-GlcNAc, le C-UDP et l'UDM-5S-GlcNAc (Dorfmueller et al., 2010 ; Gloster et al., 2011). Le benzyl 2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyranoside (BAGDP) peut être ajouté à cette liste. Il s'agit d'un analogue du N-GalNAc à l'origine d'une inhibition faiblement spécifique. Une seconde catégorie d'inhibiteurs bi-substrats regroupe les goblines 1 et 2 (Trapannone et al., 2016). Ces molécules ne passent pas la membrane cellulaire, ce qui limite leur étude hors du domaine de la chimie. En passant en revue un ensemble de 64 416 composés pharmacologiques, le criblage haut débit a mis en évidence 19 molécules candidates présentant une fonction inhibitrice de l'OGT tel que la protéine BZX (Gross et al., 2005). Une autre étude a aussi identifié la protéine OSMI-1 (Ortiz-Meoz et al., 2015).

2.3.2 OGA

Généralités

Le N-Acetyl-β-D glucosaminidase ou O-GlcNAcase, (OGA) est l'enzyme qui catalyse la réaction inverse de l'OGT : elle hydrolyse le résidu O-GlcNAc fixé sur les protéines. Découverte en 1994 chez le rat (Dong et Hart, 1994) et purifiée chez l'Homme en 2001 (Gao *et al.*, 2001), elle correspond aux protéines déjà décrites sous les noms de hexosaminidase C (Braidman *et al.*, 1974) et MGEA5 (Heckel *et al.*, 1998). Il est aujourd'hui démontré que ces trois noms se rapportent à la même protéine. Bien qu'ubiquitaire, l'OGA est particulièrement exprimée dans le pancréas, le cerveau et le thymus (Hart *et al.*, 2011).

Gène et structure protéique

Le gène codant l'OGA est bien conservé au sein du règne vivant avec une homologie de séquence supérieure à 80% au sein du taxon mammifère. Une homologie de 97,8% est retrouvée entre l'Homme et la souris. Cette homologie reste présente même entre espèces phylogénétiquement éloignées avec par exemple une homologie de 43% entre l'Homme et C. Elegans (Gao *et al.*, 2001). La délétion de l'homologue murin de l'OGA est généralement létale *in utero* et toujours avant le 2ème jour post-natal (Yang *et al.*, 2012 ; Keembiyehetty *et al.*, 2015).

Le gène codant l'OGA est situé sur le chromosome 10 au locus 10q24. Ce locus est impliqué dans certaines prédispositions à des maladies du système nerveux en particulier la maladie d'Alzheimer (Myers, 2000) et au diabète de type 2 chez certaines populations mexicano-américaines (Lehman *et al.*, 2005). Le gène OGA possède 16 exons et 15 introns (Comtesse *et al.*, 2001). Il est traduit en deux isoformes ncOGA et sOGA par un épissage alternatif au niveau de l'intron 11 provoquant l'apparition d'un codon STOP précoce (Comtesse *et al.*, 2001) (Figure 30) :

- ncOGA, 130 kDa. Forme largement majoritaire, principalement présente dans le cytoplasme et dans une moindre mesure dans le noyau.
- sOGA, 75 kDa. Forme peu présente dans le cytoplasme et surtout retrouvée dans le noyau et à la surface des gouttelettes lipidiques (Keembiyehetty *et al.*, 2011).

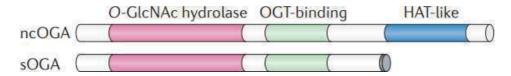


Figure 30 - Structure des isoformes de l'OGA. (Yang et Qian, 2017)

La protéine OGA est organisée en 3 domaines. Du côté N-terminal se retrouve le domaine hydrolase qui a pour rôle de détacher le O-GlcNAc. Au centre, un site de fixation capable de se lier aux 6 premiers domaines TPR de l'OGT et former ce que Whisenhunt *et al.* ont appelé le O-GlcNAczyme, capable d'ajouter et de retirer les résidus GlcNAc de façon dynamique (Whisenhunt *et al.*, 2006). Dans la forme longue (ncOGA), un domaine similaire à une histone acétyltransférase (HAT-like) est décrit du côté C-terminal (Toleman, 2006). L'activité de ce domaine n'a été démontré qu' *in vitro* (Toleman *et al.*, 2004). Pour cette raison l'OGA est parfois appelée « O-GlcNAcase et acétyltransférase nucléo-cytoplasmiques » (NCOAT). Il a été établi par cristallographie que l'OGA peut se dimériser, ce qui modifierait sa capacité à fixer ses différents substrats. (Elsen *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Roth *et al.*, 2017).

Modification post-traductionnelles

Bien moins étudié que l'OGT, plusieurs MPT de l'OGA ont néanmoins été mises en évidence. Ici encore le rôle de ces modifications n'a pas été élucidé à ce jour.

 Phosphorylation: Chez l'Homme comme chez le rat, les sérines 364, 859, 867 et 873 peuvent être phosphorylées (Olsen *et al.*, 2010). En particulier, la Ser364 est la cible de la caséine kinase II (Rigbolt *et al.*, 2011).

- O-GlcNAcylation: l'OGA peut être O-GlcNAcylé sur la sérine 405. Cette dernière se situant dans le domaine OGT-binding, il a été proposé que cette modification jouerait un rôle dans la formation de complexes O-GlcNAczyme (Khidekel *et al.*, 2007).
- Acétylation, sumoylation et ubiquitinylation : Un ensemble d'études du protéome humain ont retrouvées ce type de modifications de l'OGA (Wagner *et al.*, 2011 ; Mertins *et al.*, 2013, 2016 ; Kim *et al.*, 2011 ; Rigbolt *et al.*, 2011 ; Lumpkin *et al.*, 2017)

Autres mécanismes de régulation

L'OGA peut être clivée par la caspase 3 sans que cela ne modifie l'activité enzymatique des fragments hydrolase et HAT-like (Wells *et al.*, 2001). Ceci pourrait indiquer un rôle de l'OGA dans l'apoptose et la régulation des protéines proapoptotiques.

Comme pour l'OGT, un certain nombre de protéines partenaires ont été identifiés tels que des protéines de choc thermique Hsp110 et Hsp70, des transducteurs de signaux intracellulaires comme la calcineurine, des protéines intervenant dans l'ubiquitinylation comme la culline ou encore l'amphiphysine qui intervient dans le positionnement nucléaire et DRP-2 dans la myélinisation axonale (Wells *et al.*, 2001). Leurs rôles n'ont pas été identifiés.

Inhibiteurs de synthèse

Les premiers inhibiteurs pharmacologiques à avoir été utilisés en laboratoire sont essentiellement le PUGNAc (Dong et Hart, 1994) et la streptozotocine (STZ) (Toleman *et al.*, 2006). Cependant, le PUGNAc n'est pas spécifique et inhibe aussi bien les hexosaminidases lysosomales et la STZ est faiblement efficace mais fortement toxique (Hurtado-Guerrero *et al.*, 2008). Cela a conduit au développement de nouveaux inhibiteurs de l'OGA. Les dérivés thiazoline du O-GlcNAc comme le ThiametG (Soulié *et al.*, 2019) et le NButGT (Ferron *et al.*, 2018) sont désormais les plus utilisés en recherche. Enfin, la famille des O-GlcNAcstatines proposée en 2006 (Dorfmueller *et al.*, 2006) présente une excellente sélectivité et inhibe 900 000 fois plus l'OGA que les hexosaminidases lysosomales (Dorfmueller *et al.*, 2010).

2.4 Interaction phosphorylation/O-GlcNAcylation

2.4.1 Compétition pour les sites et conséquences sur la transduction du signal

Certains sites ciblés par la O-GlcNAcylation peuvent aussi être modifiés par la phosphorylation. Ces deux MPT peuvent avoir lieu sur un même acide aminé ou sur des acides aminés voisins à l'origine d'un encombrement allostérique. De ce constat a été développé le modèle du « yin-yang » qui propose que la compétition entre ces deux types de modifications post-traductionnelles soit un mécanisme de régulation de l'activité de nombreux acteurs des voies de signalisation (Hart *et al.*, 1995).

L'oncogène c-Myc est un exemple particulièrement étudié de balance O-GlcNAcylation/phosphorylation. La balance entre stabilisation et dégradation de la protéine c-Myc est régulée par ces deux MPT sur des résidus Ser et Thr (Figure 31) : la Thr58 peut être phosphorylée ou O-GlcNAcylée et la Ser62 ne peut être que phosphorylée. La phosphorylation réversible de Ser62 par la kinase ERK entraine la phosphorylation irréversible de Thr58 par la GSK3β. Le phosphate en position Ser62 est alors retiré par la phosphatase PP2A, entrainant la poly-ubiquitinylation de c-Myc et son adressage/dégradation par le protéasome. La O-GlcNAcylation de la Thr58 par l'OGT empêche sa dégradation ce qui stabilise c-Myc et maintient son activité transcriptionnelle tant que l'OGA ne libère pas le résidu Thr58. L'activité mitogène et pro-oncogénique de c-Myc est donc potentialisée par celle de l'OGT. L'inhibition de l'OGT dans une lignée de cellules de cancer de prostate réduit la O-GlcNAcylation de c-Myc, provoque une baisse de la concentration en protéines et ralentit la croissance cellulaire (Itkonen *et al.*, 2013).

D'autres équipes ont étudié l'interaction entre la phosphorylation et la O-GlcNAcylation et son influence sur un large panel de protéines. Ces études montrent que l'inhibition d'une des deux MPT favorise l'autre. Par exemple, l'activation dans une population de neurones des protéines kinases A ou C réduit la O-GlcNAcylation des protéines du cytosquelette, tandis que l'inhibition de ces deux kinases entraîne une hausse de la O-GlcNAcylation des mêmes protéines du cytosquelette (Griffith et Schmitz, 1999). Une balance similaire a été décrite au sujet de la séquence PEST du récepteur murin β aux œstrogènes (Cheng et Hart, 2001). La O-GlcNAcylation de la protéine p53 sur la Ser149 est associée à une diminution de la phosphorylation de la Thr155, ce qui stabilise p53 en limitant son ubiquitinylation (Yang *et al.*, 2006). Enfin, l'inhibition de la GSK3β provoque une perturbation globale de la O-GlcNAcylation des protéines (Wang *et al.*, 2007).

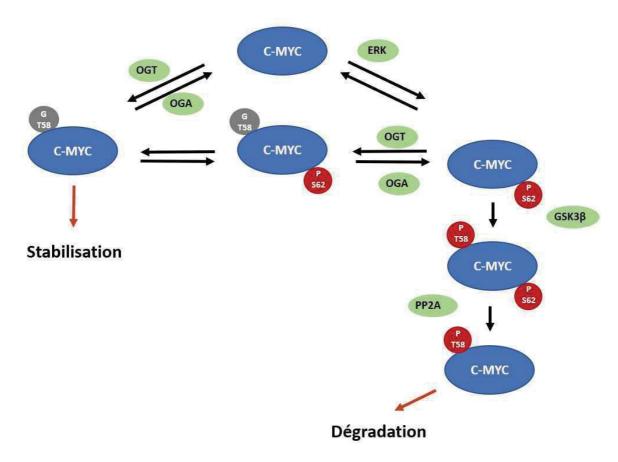


Figure 31 - Balance phosphorylation/O-GlcNAcylation régulant l'expression fonctionnelle de la protéine c-Myc.

2.4.2 Nouveaux paradigmes

Le postulat précédent a été complété par plusieurs analyses, plus globales, du profil de O-GlcNAcylation et de phosphorylation des protéines (Trinidad et al., 2012; Zhong et al., 2015). Elles montrent que la balance dynamique qui lie ces deux MPT joue un rôle crucial dans la régulation de nombreux processus cellulaires parmi lesquels la transmission synaptique, la division cellulaire et la réparation de l'ADN. L'étude du synaptosome murin menée par Trinidad et al. a permis d'identifier 1750 sites de O-GlcNAcylation et 16500 sites de phosphorylation. Cependant, ces études montrent aussi que l'interaction entre ces deux MPT est plus complexe que précédemment publié: Dans l'étude de Trinidad et al., seuls 135 sites (7%) sont à la fois des cibles de la O-GlcNAcylation et de la phosphorylation (Trinidad et al., 2012). Zhong et al. montrent dans une lignée de fibroblastes immortalisés que sur 5529 sites de phosphorylation identifiés, 232 étaient régulés positivement et 133 régulés négativement après délétion de l'OGT. Ces résultats indiquent que l'interaction entre O-GlcNAcylation et phosphorylation ne concerne qu'une fraction des sites ciblés par ces MPT et qu'elle ne se traduit pas toujours par un mécanisme compétitif. Le modèle du « Yin-Yang » ne suffit pas à représenter la complexité de ces interactions entre MPT.

2.5 Rôles de la O-GlcNAcylation

La O-GlcNAcylation des protéines est un outil cellulaire majeur agissant en premier lieu comme senseur métabolique du glucose. Elle participe à la régulation des protéines en affectant leurs transcriptions, leurs activités, leurs localisations, leurs interactions et leurs dégradations. Les protéines ciblées sont elles-mêmes impliquées dans différents processus biologiques comme la réponse aux stress, le trafic vésiculaire, le cycle circadien, le cycle cellulaire, ou encore la régulation épigénétique. Des altérations de la O-GlcNAcylation ont été retrouvées dans différentes maladies. C'est par exemple le cas du diabète de type II, de l'obésité, de certaines maladies neurodégénératives et des cancers.

2.5.1 Senseur métabolique

L'activité de l'OGT est directement dépendante de la concentration cellulaire en UDP-GlcNAc qui résulte elle-même de la quantité de glucose entrant dans la voie de l'HBP. La production d'UDP-GlcNAc est aussi régulée par la disponibilité cellulaire en glutamine, en ATP et en acétyl-CoA qui peut être produit par le cycle de l'acide citrique ou par la β -oxydation des acides-gras. La disponibilité en UDP-GlcNAc est donc liée à l'environnement nutritionnel cellulaire dans son ensemble. C'est pourquoi l'OGT est considérée comme un « senseur métabolique cellulaire » dont l'activité est le reflet de l'état nutritionnel de la cellule.

2.5.2 Régulation des protéines

Transcription

La O-GlcNAcylation agit sur le domaine CTD (carboxy terminal domain) de l'ARN Polymérase II (Kelly *et al.*, 1993). Elle entraîne un changement de conformation de l'enzyme empêchant sa phosphorylation et conduisant à la formation du complexe d'initiation nécessaire au démarrage de la transcription. Le résidu GlcNAc est ensuite clivé et l'ARN Polymérase II est phosphorylée sur ce même domaine CTD permettant le démarrage de la phase d'élongation (Comer et Hart, 2001).

La O-GlcNAcylation agit aussi sur de nombreux facteurs de transcription. Outre c-Myc que nous avons précédemment évoqué, d'autres facteurs de transcription sont O-GlcNAcylés :

— La O-GlcNAcylation de la β-caténine augmente rapidement au cours de la transition G0/G1 du cycle cellulaire dans des cellules HeLa et l'inhibition de l'OGT bloque cette transition (Stichelen *et al.*, 2012).

- La phosphorylation de STAT5 et son activité pro-oncogénique est favorisée par la O-GlcNAcylation. Dans ce cas, ces deux modifications agissent en synergie (Freund et al., 2017).
- La O-GlcNAcylation de sites de la cAMP response element binding protein (CREB) observée dans des adipocytes 3T3-L1 et dans des souris nourries avec un régime à haute teneur en fer est diminuée, réduisant de 50% la fixation du facteur de transcription sur le promoteur de la leptine (Liu et al., 2018).
- La O-GlcNAcylation de NF-κB au niveau de la Thr352 de la sous-unité p65 augmente l'activité transcriptionnelle de NF-κB et est associée à des effets anti-apoptotiques dans l'adénocarcinome canalaire du pancréas (Ma *et al.*, 2013). Elle favorise également la libération de NF-κB de son répresseur IκB ce qui augmente son activité transcriptionnelle dans des conditions d'hyperglycémie (Yang *et al.*, 2008).
- La carbohydrate response element binding protein (ChREBP) est un facteur de transcription régulant plusieurs enzymes de la glycolyse et de la lipogenèse au niveau hépatique. La O-GlcNAcylation de ChREBP inhibe sa dégradation par le protéasome et est associée à une augmentation de la résistance à l'insuline et de la stéatose hépatique dans le modèle murin d'obésité db/db (Guinez et al., 2011).

De nombreux autres facteurs de transcription sont modifiés par O-GlcNAcylation tels que Sp1 (Zhang *et al.*, 2017), p53 (de Queiroz *et al.*, 2016), YY1 (Zhu *et al.*, 2019), Elf-1 (Machacek *et al.*, 2018), pRb (Wells *et al.*, 2010), OCT4 (Constable *et al.*, 2017), etc.

D'autres mécanismes permettent à la O-GlcNAcylation d'avoir un impact sur la transcription de gènes. L'OGT peut modifier les histones H2A, H2B, H3 et H4 de façon dynamique et en fonction des phases du cycle cellulaire. Cette modification post-traductionnelle a un important impact sur le remodelage de la chromatine et la transcription des gènes du cycle cellulaire (Sakabe *et al.*, 2010 ; Fong *et al.*, 2012 ; Sakabe and Hart, 2010).

La O-GlcNAcylation affecte les modifications épigénétiques via la régulation des protéines HDAC, elle agit en synergie avec le répresseur de transcription mSin3A (Yang et al., 2002). D'autres études montrent que l'OGT interagit directement avec les enzymes de la famille Ten-Eleven-Translocation (TET) : les TETs dirigent l'OGT vers le facteur HCF1, un composant du complexe SET1/COMPASS de la méthyltransférase H3K4 (Deplus et al., 2013) et l'activité des protéines TET phosphorylées est inhibée par la O-GlcNAcylation (Bauer et al., 2015).

Localisation subcellulaire

La O-GlcNAcylation des composants protéiques du complexe de pores nucléaires (NPC - nuclear pore complex) a été évoquée à la fin des années 1980 (Davis and Blobel, 1987; Hanover *et al.*, 1987). La moitié des trente types de protéines formant le NPC sont O-GlcNAcylés (Ruba et Yang, 2016). Cela participe à l'intégrité du pore et au passage sélectif des molécules. Plusieurs nucléoporines comme NUP62 et NUP98 sont O-GlcNAcylés au niveau de leur domaine phénylalanine-glycine (Starr, 1990), ceci est nécessaire au passage vers le noyau des complexes cargorécepteurs de transport nucléaire (RTN) (Labokha *et al.*, 2012).

La O-GlcNAcylation d'une protéine peut aussi directement influencer sa localisation subcellulaire. C'est le cas par exemple des protéines PAX6, STAT5 ou NeuroD1 qui entrent dans le noyau après avoir été O-GlcNAcylées (Lefebvre *et al.*, 2002 ; Nanashima *et al.*, 2005 ; Andrali *et al.*, 2007 ; Nagaraj *et al.*, 2017). A l'inverse la β-caténine O-GlcNAcylée se concentre dans le compartiment cytoplasmique (Ha *et al.*, 2014). D'autres types de localisation subcellulaire sont régulées par O-GlcNAcylation comme la localisation synaptique de la synapsine 1 (Skorobogatko *et al.*, 2013).

Interactions protéine-protéine

De nombreuses interactions protéine-protéine sont régulées par la O-GlcNAcylation. Selon les cas ces interactions peuvent être inhibées ou favorisées (Tarbet *et al.*, 2017). Nous avons déjà évoqué le cas de NF-κB dont la O-GlcNAcylation lui permet de se libérer de son répresseur IκB (Yang *et al.*, 2008). Dans des hépatocytes stimulés par hyperglycémie, le CREB regulated transcription coactivator 2 (CRTC2) migre vers le noyau une fois O-GlcNAcylé sur les sérines 70 et 171 alors qu'il est maintenu séquestré dans le cytoplasme par les protéines 14-3-3 dans sa forme phosphorylée (Dentin *et al.*, 2008). Seule la forme O-GlcNAcylée de STAT5 est capable d'interagir avec le co-activateur de transcription CBP, une interaction essentielle à la transcription des gènes cibles de STAT5 (Gewinner *et al.*, 2003). Enfin, La O-GlcNAcylation et la phosphorylation du suppresseur de tumeur RB, au cours de la phase G1 du cycle cellulaire, contribuent à la régulation du facteur de transcription E2F-1 et au contrôle de l'entrée des cellules en phase S (Wells *et al.*, 2010).

Dégradation protéolytique

La O-GlcNAcylation régule la dégradation des protéines en modulant leur ubiquitinylation et le protéasome. L'augmentation des niveaux de O-GlcNAc par l'ajout de glucosamine ou de PUGNAc renforce l'ubiquitinylation des protéines. Inversement, lorsque les niveaux de O-GlcNAc sont réduits par la forskoline ou par une privation de glucose, l'ubiquitinylation diminue (Guinez *et al.*, 2008). Ce type de régulation globale

peut aussi cibler certaines protéines spécifiquement. Nous avons déjà présenté le cas de c-Myc, dont la dégradation est limitée par la O-GlcNAcylation de son résidu Thr58. De même p53 ne peut être poly-ubiquitinylée qu'après avoir été O-GlcNAcylée en Ser149 (Yang *et al.*, 2006). L'OGT régule l'activité de neurones GABAergiques en interagissant avec l'ubiquitine ligase HUWE1, cette activité est indispensable à l'activité des neurones GABAergiques. (Giles *et al.*, 2019). L'OGT peut aussi agir via le recrutement d'une déubiquitinylase comme la BRCA1-associated protein 1 (BAP1) dont le recrutement est facilité par le complexe OGT-HCF-1 (Ruan *et al.*, 2012).

La O-GlcNAcylation des protéines est aussi l'une des nombreuses MPT ayant pour cible le protéasome, ce qui illustre son couplage avec le métabolisme (Zhang *et al.*, 2003 ; Kors *et al.*, 2019). L'étude du protéasome 26S de Drosophila melanogaster a montré que les sous-unités régulatrice 19S et catalytique 20S étaient largement O-GlcNAcylées (Sümegi *et al.*, 2003). La O-GlcNAcylation de l'ATPase Rpt2 du protéasome 19S de mammifère inhibe le fonctionnement du protéasome (Liu *et al.*, 2014).

2.5.3 Régulation des processus cellulaires

Réponse au stress

L'étude de cellules HeLa et Cos-7 montre que la O-GlcNAcylation des protéines augmente rapidement dans de nombreuses situations de stress (choc thermique, éthanol, UV, hypoxie, stress oxydo-réducteur et osmotique) (Zachara *et al.*, 2004). Dans ces lignées, la délétion de l'OGT sensibilise les cellules aux stress, tandis que l'inhibition de l'OGA ou la surexpression de l'OGT augmentent leur résistance.

Depuis cette étude pionnière, de nouvelles publications ont renforcées l'hypothèse selon laquelle les modifications de la O-GlcNAcylation participent à la transduction des signaux de stress : Lors d'un choc thermique, la protéine facteur de choc thermique 1 (HSF1) est activée en réaction à la O-GlcNAcylation de GSK3β (Kazemi *et al.*, 2010). En cas de stress hypoxique, Liu *et al.* montrent que l'inflammation est médiée par une diminution de la O-GlcNAcylation des protéines (Liu *et al.*, 2014) et, en cas stress oxydatif, la O-GlcNAcylation des protéines augmentent fortement (Chen *et al.*, 2018).

Cycle circadien

Plusieurs études montrent que la O-GlcNAcylation est impliquée dans le contrôle du cycle circadien. Kaasik *et al.* montrent que l'OGT et la GSK3β agissent ensemble de façon cyclique pour rythmer la phosphorylation de certains de leurs substrats suivant le modèle du Yin-Yang. C'est par exemple le cas de la protéine de l'horloge centrale (PER) qui participe chez l'Homme à la régulation des phases de

sommeil. Les auteurs montrent que la modulation des niveaux de O-GlcNAcylation de PER modifie la durée de la période circadienne chez la souris et la drosophile (Kaasik *et al.*, 2013). La O-GlcNAcylation en position Ser942 de PER, réduit les interactions entre PER et CLOCK et modifie l'expression de gènes circadiens (Li *et al.*, 2019).

Au niveau hépatique la O-GlcNAcylation de BMAL1 et CLOCK, deux protéines aussi impliquées dans le rythme circadien, stabilise ces protéines en inhibant leur ubiquitinylation (Li *et al.*, 2013). Des souris génétiquement modifiées présentant une réduction de l'expression hépatique de l'OGT présentent une altération des rythmes circadiens de l'homéostasie du glucose.

Cycle cellulaire

La O-GlcNAcylation des protéines participe à la régulation du cycle cellulaire. Sa perturbation affecte la progression du cycle et la division cellulaire (Liu et Li, 2018). Les auteurs rapportent que OGT et OGA se localisent et s'expriment de manière différentielle dans les cellules au fur et à mesure que celles-ci progressent dans les différentes étapes du cycle cellulaire. Ils montrent que les deux enzymes participent à la composition du fuseau mitotique et que ce dernier est régulé par le dialogue entre OGT/OGA et le chromosome passenger complex (CPC). Le même mécanisme intervient dans le contrôle de la méiose. La O-GlcNAcylation régule également la stabilité de facteurs de transcription impliqués dans le cycle cellulaire comme c-Myc et p53 (cf. supra).

2.5.4 Implication de la O-GlcNAcylation dans les pathologies

La dérégulation de la O-GlcNAcylation des protéines est associée à diverses maladies humaines telles que le cancer, le diabète et les maladies neuro-dégénératives. Cependant, les mécanismes moléculaires exacts par lesquels la O-GlcNAcylation contribue à ces maladies restent largement méconnus.

Diabète de type 2

En conditions physiologiques, la O-GlcNAcylation adaptée des protéines participe à la transduction optimale du signal de l'insuline dans les tissus cibles. Le diabète de type 2 se caractérise par une résistance à l'insuline, définie comme une diminution de l'efficacité de l'action de l'insuline sur les cellules cibles. L'augmentation pathologique de la glycémie active la voie de biosynthèse des hexosamines et favorise la O-GlcNAcylation des protéines par l'OGT. Autrement dit, l'excès de glucose entraine une élévation aberrante de la O-GlcNAcylation et compromet la signalisation de l'insuline (Yang et Qian, 2017).

Le rôle de la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP) dans l'insulino-résistance a été proposé dès 1991 lorsqu'il a été montré qu'une diminution de la sensibilité à l'insuline pouvait être induite dans des adipocytes en culture primaire par l'ajout dans le milieu de culture de substrats de l'HBP (Traxinger et Marshall, 1991). Cette hypothèse a été renforcée par McClain *et al.* qui montrent qu'une surexpression de l'OGT dans le muscle et le tissu adipeux provoque *in vivo* une hyper-insulinémie et une hyper-leptinémie sans hyperglycémie ni obésité associées (McClain *et al.*, 2002). Le rôle de la O-GlcNAcylation dans le diabète et l'insulinorésistance reste cependant controversé : des résultats contradictoires ont été publiés, notamment ceux de Macauley *et al.* Ces derniers montrent qu'une augmentation pharmacologique de la O-GlcNAcylation des protéines par l'administration d'un inhibiteur sélectif de la O-GlcNAcase chez des rongeurs ne perturbe pas leur sensibilité à l'insuline ni n'altère l'homéostasie du glucose. (ling Dai *et al.*, 2018 ; Macauley *et al.*, 2010).

De nombreuses protéines impliquées dans la signalisation de l'insuline sont sensibles à la O-GlcNAcylation (Figure 32). C'est le cas des sous-unités intracellulaires IRS1 et IRS2 du récepteur de l'insuline, des sous-unités p85 et p110 de la PI-3 Kinase, de PDK-1 (3-phosphoinositide-dependent kinase-1), de la protéine kinase PKB/AKT, de GSK3 et du facteur de transcription FoxO1 (Issad *et al.*, 2010). Au repos, l'OGT est essentiellement localisée dans les compartiments cytosolique et nucléaire. Sous l'action de l'insuline, la production membranaire de PIP3 par la PI3K permet de recruter l'OGT à la membrane plasmique ce qui va favoriser la O-GlcNAcylation d'AKT et de IRS1 qui interviennent dans la signalisation précoce. Cela va provoquer l'inhibition de la phosphorylation d'AKT sur la Thr308 et favoriser la phosphorylation d'IRS1 sur plusieurs sérines.

Plusieurs mécanismes permettant de lier glucotoxicité, insulinorésistance et O-GlcNAcylation sont proposés : 1) Le traitement à la glucosamine des cellules 3T3-L1 augmente la O-GlcNAcylation de Munc18c, un composant essentiel du complexe protéique de fusion des vésicules synaptiques. Simultanément, ce traitement inhibe la translocation de GLUT4 initialement provoquée par l'insuline (Chen *et al.*, 2002) mais il n'est pas encore démontré que la O-GlcNAcylation de Munc18c soit directement responsable du défaut de translocation de GLUT4. 2) La O-GlcNAcylation de CRTC2 sur des sites nécessaires à sa séquestration dans le cytoplasme est à l'origine d'une néoglucogenèse inadaptée (Dentin *et al.*, 2008). En présence de glucose, l'OGT hépatique favorise la néoglucogenèse en activant FoxO1 via PGC1α (Housley *et al.*, 2008). 3) La O-GlcNAcylation d'AKT sur les Thr305 et Thr312 dissocie le complexe AKT/PDK1 et atténue le signal de l'insuline (Wang *et al.*, 2012). 4) Dans les îlots β du pancréas, la transcription de NeuroD1, PDX-1 et MafA est accrue lorsqu'ils sont O-GlcNAcylés (Andrali *et al.*, 2007 ; Gao *et al.*, 2003 ; Vanderford *et al.*, 2006).

Récepteur de l'insuline PIP2 PIP3 AKT p110 FoxO1 GSK3β ®

Figure 32 - Voie de l'insuline et GlcNAcylation.

Maladies neurodégénératives

Plusieurs études ont montrées un lien entre les troubles du métabolisme des glucides et les maladies neurodégénératives (Daulatzai, 2016) : le diabète de type 2 augmente de 50 à 100% le risque de développer une maladie neurodégénérative (Biessels *et al.*, 2006). Comme nous l'avons indiqué plus haut, les gènes codant l'OGT et l'OGA se situent sur des locus associés à la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Kulshrestha *et al.*, 2017) ou à la maladie d'Alzheimer (AD) (Myers, 2000).

Le rôle de la O-GlcNAcylation dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (AD) a été suspecté dès lors qu'il a été montré que les protéines Tau et APP peuvent être O-GlcNAcylées (Arnold *et al.*, 1996 ; Griffith et Schmitz, 1995). La baisse du taux de glucose dans les neurones, décrite au cours de l'AD (Hoyer, 2004), est associée à une diminution du niveau global de O-GlcNAcylation (Liu *et al.*, 2004), conduisant à une hyperphosphorylation de la protéine Tau, une caractéristique moléculaire majeure de l'AD conduisant à son agrégation et à sa neurotoxicité (Morris *et al.*, 2015 ; Gong *et al.*, 2016). A l'inverse, l'augmentation de la O-GlcNAcylation de Tau par l'inhibition de l'OGA réduit sa phosphorylation et son agrégation (Yuzwa *et al.*, 2012). L'inhibition de l'OGA augmente aussi la O-GlcNAcylation de APP ce qui a pour effet de réduire l'agrégation de la protéine amyloïde toxique β (Aβ) qui est également impliquée dans la pathogénie de l'AD (Jacobsen et Iverfeldt, 2011). Enfin, il a été montré que l'augmentation de la O-GlcNAcylation *in vivo* à l'aide d'inhibiteurs de l'OGA réduit l'hyper-phosphorylation de Tau chez des rats sains (Yuzwa *et al.*, 2008) et ralentit la neuro-dégénérescence dans un modèle murin de maladie d'AD (Yuzwa *et al.*, 2012).

L'influence de la O-GlcNAcylation est suspectée dans d'autres maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson. Il a ainsi été montré que l'agrégation de l' α -synucleine était bloquée par la O-GlcNAcylation de sites spécifiques (Marotta *et al.*, 2015).

O-GlcNAcylation et cancer

Précédemment, nous avons détaillé les effets de la O-GlcNAcylation sur un ensemble de protéines cibles impliquées dans la carcinogenèse comme c-Myc et β -caténine. Des modifications globales du taux de O-GlcNAcylation des protéines ont également été rapportées dans différents cancers.

Plusieurs études portant sur des modifications du fonctionnement cellulaire provoquées par la O-GlcNAcylation ont décrit une hausse de l'activité de l'enzyme OGA dans des cancers du sein et de la thyroïde (Slawson *et al.*, 2001 ; Krzeslak, 2010). De nombreux cancers (sein, poumons, colon, pancréas, prostate, foie) présentent fréquemment une hausse du taux global de OGlcNAcylation (Barkovskaya *et al.*, 2017; Mi *et al.*, 2011 ; Shimizu et Tanaka, 2018 ; Sharma *et al.*, 2019 ; Itkonen *et al.*, 2019 ; Xu *et al.*, 2017). Ce taux n'est cependant pas nécessairement corrélé à la gravité de la maladie. Au moins dans le cas de la leucémie lymphoïde chronique (LLC), où le profil de O-GlcNAcylation est constamment augmenté, une élévation importante du taux de O-GlcNAcylation est associée à un meilleur pronostic qu'une élévation plus modérée (Shi *et al.*, 2010). Concernant le CHC, l'étude de Xu *et al.* montre une surexpression de l'enzyme OGT dans 66% des tumeurs associées à une NAFLD et un effet prooncogénique en lien avec le métabolisme lipidique, le stress du RE et l'activation de voies oncogéniques particulières comme précédemment décrit.

Un mécanisme à l'origine de l'hyper-O-GlcNAcylation dans les cancers repose sur l'effet Warburg (Ma et Vosseller, 2013) c'est-à-dire l'augmentation de la part d'ATP produite par la fermentation lactique par les cellules cancéreuses. Cette modification métabolique augmente la production totale d'ATP au détriment du rendement afin de répondre aux besoins croissants des cellules cancéreuses. Celles-ci augmentent fortement leur consommation de glucose. Cela provoque en parallèle une hausse de la concentration intracellulaire du substrat de l'OGT, l'UDP-GlcNAc, et une augmentation de l'activité enzymatique de l'OGT. La hausse de l'activité de l'OGA apparaît secondairement assurant un nouvel équilibre avec l'OGT à un niveau plus élevé de O-GlcNAcylation des protéines. Cette hausse de la O-GlcNAcylation des protéines a un impact majeur sur un grand nombre de processus pro-tumoraux (Figure 33). Elle favorise la prolifération et la survie des cellules, améliore la résistance au stress, la reprogrammation cellulaire et la formation d'un microenvironnement tumoral favorisant l'angiogenèse et la formation de métastases (Ma et Vosseller, 2013).

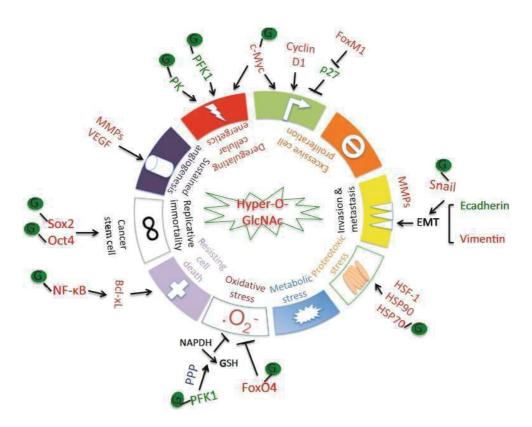


Figure 33 - Mécanismes pro-tumoraux favorisés par l'hyper-GlcNAcylation des protéines. Les protéines indiquées sont disposées suivant leur action dans les grands processus biologiques altérés dans le cancer. Celles indiquées en rouge ont leur activité, stabilité et/ou expression accrue par la O-GlcNAcylation. Ces mêmes paramètres sont diminués dans les protéines indiquées en vert. Icône « G » : O-GlcNAcylation des protéines indiquées (Ma et Vosseller, 2013)

NF-κB est un facteur de transcription essentiel de la réponse au stress et du contrôle de l'apoptose. Son étude dans la lignée cellulaire pancréatique PDAC a mis en évidence l'hyper-O-GlcNAcylation de sa sous-unité p65. L'inhibition de cette MPT atténue la phosphorylation du résidu Ser536 de NF-kB, sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle. A l'inverse, augmenter le niveau d'O-GlcNAcylation de NF-кВ par un moyen pharmacologique accroit son activité anti-apoptotique notamment via Bcl-xL (Ma et al., 2013). L'inhibition de la O-GlcNAcylation diminue l'expression de la cycline D1 et de FoxM1. Cette dernière est à l'origine d'une augmentation de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 (Caldwell et al., 2010 ; Ma et al., 2013). La O-GlcNAcylation globale des protéines conduit donc à des effets anti-apoptotiques et pro-prolifératifs. Les protéines de choc thermique (HSP) forment une famille de protéines participant à la réponse au stress cellulaire. Leur expression est sous le contrôle transcriptionnel du facteur de choc thermique HSF1. L'hyper-O-GlcNAcylation globale des protéines est associée à une hausse de l'expression de HSF1, HSP70 et HSP90 (Singleton et Wischmeyer, 2008 ; Gong et Jing, 2011). De même, l'activité transcriptionnelle de FoxO4, un important médiateur de la

réponse au stress oxydatif, est augmentée par la O-GlcNAcylation spécifique du résidu Ser193 (Ho *et al.* 2010). Ces travaux illustrent le rôle protecteur de l'hyper-O-GlcNAcylation dans la survie des cellules tumorales. L'hyper-O-GlcNAcylation est associée à la diminution de l'activité de la pyruvate kinase (PK) et de la phosphofructokinase 1 (PFK1) (Yi *et al.*, 2012). Il a été proposé que ces processus servent à rediriger le glucose vers des voies de synthèse anabolique et vers la voie des pentoses phosphates, respectivement. Ceci dans le but de soutenir la croissance tumorale et la production de NADPH, effecteur majeur de l'élimination des ROS (Ma et Vosseller, 2013).

Comme mentionné précédemment, les quatre facteurs de transcription c-Myc, Oct4, Sox2 et KLF4 identifiés par l'équipe de Yamanaka participent à la reprogrammation de cellules somatiques différenciées en cellules pluripotentes induites iPSC (Takahashi et Yamanaka, 2006). Trois de ces facteurs de pluripotence (c-Myc, Oct4 et Sox2) peuvent être O-GlcNAcylés. Il a été montré que la O-GlcNAcylation de Oct4 favorisait l'auto-renouvellement et la pluripotence en condition tumorale. Le rôle de Sox2 O-GlcNAcylé n'est pas encore élucidé. Concernant c-Myc, nous avons décrit l'importance de sa stabilisation par O-GlcNAcylation et ses effets majeurs pleiotropiques dans la carcinogenèse.

Il a été montré que la réduction de l'hyper-O-GlcNAcylation dans le modèle cellulaire de carcinome prostatique (PC3-ML) entrainait une extinction de l'expression des gènes des métalloprotéases matricielles MMP-2 et 9 nécessaires à la dégradation de la matrice extracellulaire préalable à l'angiogenèse (Lynch et al., 2012). Les auteurs montrent qu'une diminution de l'hyper-OGIcNAcylation dans ces cellules provoquait une baisse de l'expression du facteur de croissance VEGF. Ce travail suggère que la O-GlcNAcylation participerait à l'invasion métastatique et à l'angiogenèse tumorale par différents mécanismes médiés par des composants de la matrice extracellulaire et des facteurs secrétés. La réduction de L'hyper-O-GlcNAcylation est associée à une augmentation de l'expression du marqueur épithélial E-cadhérine et une diminution de l'expression du marqueur mésenchymateux vimentine, ce qui souligne un lien entre O-GlcNAcylation et transition épithélio-mésenchymateuse (Gu et al., 2010 ; Park et al., 2010). Le facteur de transcription Snail, stabilisé par O-GlcNAcylation du résidu Ser112, fixe et réprime le promoteur de la E-cadhérine et pourrait être l'un des médiateurs de ce mécanisme essentiel de la dissémination tumorale (Park et al. 2010 ; Peinado et al. 2007).

O-GlcNAcylation et CHC

L'hyper-GlcNAcylation a été décrite dans les CHCs, notamment ceux développés sur NAFLD, et les cholangiocarcinomes où elle est associée au processus d'invasion métastatique (Zhu *et al.*, 2011 ; Ma et Vosseller, 2013 ; Phoomak *et al.*, 2019). Une

surexpression de l'OGT, similaire à celle observée dans les cancers du sein, poumon, côlon, vessie et prostate, a été révélée dans les parties tumorales des cancers du foie comparées aux tissus adjacents non tumoraux. Les niveaux de O-GlcNAcylation sont en revanche très réduits dans les foies normaux. Les conséquences fonctionnelles d'une O-GlcNAcylation aberrante incluent la levée de l'inhibition du cycle cellulaire, l'activation de la synthèse protéique ou encore l'activation de protéines et de voies oncogéniques.

La O-GlcNAcylation entraine une diminution de l'action des inhibiteurs du cycle cellulaire p27 et p21. Quatre sites de O-GlcNAcylation de p27 ont été caractérisés dans les lignées de CHC HepG2 et Huh7. La O-GlcNAcylation du résidu Ser2 provoque la phosphorylation du résidu Ser10 et est à l'origine de la poly-ubiquitinylation et de la dégradation de p27 (Qiu *et al.*, 2017). L'activité de HDAC1 est accrue par O-GlcNAcylation et conduit à l'inhibition de l'expression du suppresseur de tumeur p21 (Zhu *et al.*, 2011). Ces deux mécanismes favorisent la progression du cycle cellulaire et la prolifération tumorale.

La O-GlcNacylation de la protéine ribosomale RACK1 augmente sa stabilité et la traduction des protéines au cours de la carcinogenèse alors que l'inhibition de cette modification post-traductionnelle décroit fortement la tumorigenèse, l'angiogenèse et le pouvoir métastatique *in vitro* et *in vivo* (Duan *et al.*, 2018). La O-GlcNAcylation du facteur d'initiation eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E), une protéine clé dans le contrôle de la synthèse protéique, empêche sa dégradation par le protéasome et favorise là encore la production ribosomale de protéines. Une étude portant sur une cohorte de 232 patients atteints de CHC montre une corrélation entre un taux élevé de protéines eIF4E et une plus faible survie globale des patients (Cao *et al.*, 2019).

L'activation de l'enzyme OGT dans un modèle de xénogreffe orthotopique chez la souris participe à la carcinogenèse du foie associant une NAFLD en induisant la production d'acide palmitique qui augmente de manière significative le stress du réticulum endoplasmique (RE). Les auteurs montrent que cela a pour conséquence l'activation de voies oncogènes déclenchées par le stress du RE, telles que JNK/c-jun/AP-1 et NF-κB (Xu *et al.*, 2017) suggérant un rôle de promoteur de tumeur de l'OGT médié par la régulation du métabolisme des lipides et le stress du RE dans le développement du NAFLD-HCC. L'oncogène YB-1 peut être O-GlcNAcylé, ce qui accroit son activité proliférative dans la lignée cellulaire HepG2 (Liu *et al.*, 2016). SIX1, le facteur de transcription clé qui régule l'effet Warburg dans le cancer, est également modifié par O-GlcNAcylation ce qui entraine sa stabilité et favorise la prolifération des cellules de CHC (Chu *et al.*, 2020). Enfin, la surexpression de l'Acyl-CoAligase 4 (ACSL4), une enzyme du métabolisme lipidique, est corrélée à la prolifération cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose via l'activation de la voie mTOR et la surexpression du transporteur GLUT1. La O-GlcNAcylation de ACSL4 favorise ce mécanisme (Wang *et al.*,

2020). En situation de stress cellulaire, la protéine de choc thermique HSP27 est phosphorylée et migre dans le noyau (Bryantsev *et al.*, 2007). Les travaux de Guo *et al.* montrent une translocation similaire dans le noyau après O-GlcNAcylation de HSP27 suggérant l'interaction entre glycosylation et phosphorylation de HSP27 dans la régulation de sa localisation subcellulaire et ses fonctions biologiques dans le cancer du foie. (Guo *et al.*, 2012). Rab3A, une petite GTPase de type Ras, essentielle pour le trafic membranaire, inhibe les métastases en augmentant la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS) dans le CHC, ceci est atténué par l'O-GlcNAcylation de Rab3A (Wu, CDD 2018).

L'O-GlcNAcylation peut améliorer l'expression, la stabilité et la fonction de la protéine YAP (Yes-associated protein) qui est le régulateur transcriptionnel en aval de la voie Hippo et un puissant facteur oncogène dans les cancers du foie. Un site O-GlcNAc de YAP a été identifié en Thr241, et la mutation de ce site diminue la O-GlcNAcylation, la stabilité et les capacités pro-tumorigènes de YAP, tout en augmentant sa phosphorylation. De plus, l'O-GlcNAcylation de YAP est nécessaire à la carcinogenèse hépatique induite par un haut niveau de glucose *in vitro* et dans un modèle de souris diabétique (Zhang *et al.*, 2017). Des taux élevés de glucose peuvent aussi stimuler la O-GlcNAcylation du proto-oncogène c-Jun sur le résidu Ser73 (et inhiber sa phosphorylation sur ce même site) ce qui conduit à sa plus forte activation et stabilité dans des cellules de CHC (Qiao *et al.*, 2016)

La variation des niveaux de O-GlcNAcylation a par ailleurs été corrélée à d'autres mécanismes délétères pour les patients atteints de CHC. Zhu *et al.* montrent que l'élévation de la O-GlcNAcylation dans les échantillons tumoraux de CHC de 60 patients ayant bénéficié d'une greffe hépatique était associée à un risque plus important de récidive tumorale. Les auteurs ajoutent que la faible expression de l'OGA est un marqueur indépendant de cette récidive. (Zhu *et al.*, 2011). Le O-GlcNAc fait partie d'un ensemble de 13 types de glycosylation identifiées dans le sérum de patients atteints de CHC dont la réduction des taux est corrélée avec l'apparition d'une encéphalopathie hépatique précoce (Liu *et al.*, 2016).

La lectine REG3A

3.1 Famille Reg

3.1.1 Nomenclature

Les protéines REG (Regenerating-islet derived proteins) appartiennent à la superfamille des lectines et plus particulièrement à celle des lectines de type C (CTL). Ces lectines possèdent un ou plusieurs domaines de reconnaissance des carbohydrates (CRD) leur permettant de fixer différentes cibles glucidiques de façon réversible et généralement calcium-dépendante. Certaines CTL sont mannose/fucose-spécifiques et possèdent un motif EPN (Glu Pro Asn) ; d'autres sont galactose-spécifiques avec un motif QPD (Gln-Pro-Asp). Les lectines de type C sont classées en 17 familles de protéines en fonction de leur structure (transmembranaire, type, nombre et ordre des CRDs - Figure 34) (Zelensky et Gready, 2005).

Parmi ces 17 familles, 10 d'entre elles sont constituées de lectines transmembranaires. Les 7 autres sont secrétées, il s'agit des familles I, III, VII, IX, XII, XVI, XVII. Ces CTL solubles agissent comme facteurs de croissance, opsonines, protéines antimicrobiennes ou composants de la matrice extracellulaire (MEC). Elles participent à la régulation du développement in utero, de la respiration, la coagulation, l'angiogenèse et l'inflammation (Cummings *et al.*, 2009). Ces activités se regroupent généralement dans deux catégories : les activités liées à l'immunité et celles liées à la MEC.

Les protéines REG sont classées au sein de la famille VII. Elles ne possèdent qu'un seul domaine CRD et n'ont pas besoin de calcium pour lier leurs cibles glucidiques. La dénomination des protéines de la famille REG a beaucoup évolué ce qui a longtemps introduit une certaine confusion dans la nomenclature (Parikh *et al.*, 2012). Les premières protéines de cette famille ont été identifiées lors de pathologies pancréatiques (lithiase, pancréatite). Ceci leur a valu les noms initiaux de : PSP (pancreatic stone protein) (Multigner *et al.*, 1983), PAP (pancreatitis-associated protein) (Keim *et al.*, 1984), PTP (pancreatic thread protein) (Gross *et al.*, 1985) et lithostathine

(Sarles *et al.*, 1990). Le nom de Reg a été proposé pour la première fois en 1988 pour la protéine Reg1. Elle avait été identifiée dans un modèle de régénération du pancréas après pancréatectomie partielle suivie d'un traitement au nicotinamide chez le rat (Terazono *et al.*, 1988) Une augmentation du nombre de cellules β pancréatiques est associée à la surexpression du gène codant Reg1.

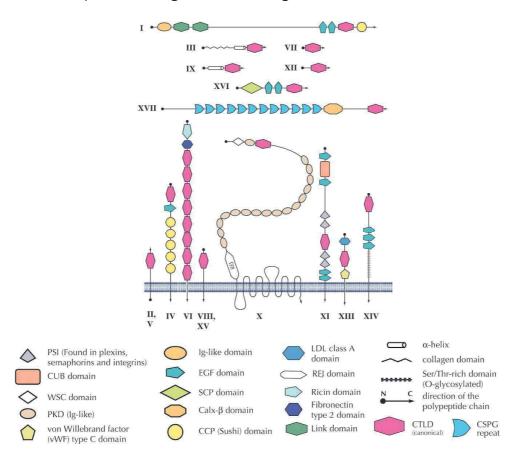


Figure 34 - Lectines de type C. (Zelensky et Gready, 2005)

De nombreuses protéines sont rattachées à la famille REG, retrouvées dans différentes espèces. Face à la multiplicité de leur dénomination, une nomenclature unique est proposée en 1993. Elle a été complétée à de multiples reprises (Unno *et al.*, 1993 ; Abe *et al.*, 2000 ; Hartupee *et al.*, 2001). Aujourd'hui la famille REG est divisée en 4 sous-familles (Reg1, Reg2, Reg3, Reg4) et les différents membres sont classés en fonction de leur structure primaire. La classification actuelle ainsi que les différents noms attribués à ces protéines sont récapitulées ci-après (Tableau 1).

Cette classification ne permet cependant pas d'identifier de façon intuitive et certaine les protéines orthologues. Par exemple, les protéines murines Reg1 et Reg2 sont les orthologues de REG1A et REG1B chez l'Homme (NCBI homology map, 2010). La protéine humaine REG3A est l'orthologue de Reg3b et Reg3g murins selon les publications mais pas de Reg3a. Les protéines Reg présentent une homologie de séquence variable (de 26 à 87%), au sein des espèces et entre espèces (Tableau 2).

Classification Actuelle	Autres dénominations
<u>Homme :</u>	
REG1A	PSP, PTP, Lithostathine, PSPS, ICRF, P19
REG1B	REGH, REGL, Lithostathine, RS, PSP-2
REG3A	REG3B, HIP, PAP, HIP/PAP, PAP1, PTP
REG3G	Reg3, PAP IB, PAP II, PAP III, UNQ429
REG4	REG IV, GISP, RELP
Souris:	
Reg1	Reg, PSP, PTP, Lithostathine
Reg2	PTP2, PSP2, Lithostathine 2
Reg3a	PAP II
Reg3b	PAP I, PAP, HIP
Reg3g	PAP III
Reg3d	INGAP-rp, INGAP
Reg4	RELP
<u>Rat :</u>	
Reg1	Reg, PSP, PTP, Lithostathine
Reg3a	Reg3, PAP II
Reg3b	PAP, PAP I, HIP, Peptide 23
Reg3g	PAP III
Reg4	Reg IV

Tableau 1 - Unification de la nomenclature des protéines Reg.

Α

	REG1A	REG1B	REG3G	REG4
REG3A	66%	66,00%	93,00%	38,00%

В

	Reg3a	Reg3g
Reg3b	76%	83,00%

Tableau 2 - Homologie de séquence des protéines REG. (A) REG3 humains (B) Reg3 murins

Gènes et structures protéiques

Les gènes codant les différentes protéines Reg font environ 3kb et possèdent 6 exons et 5 introns (Lasserre *et al.*, 1994). Ils sont regroupés au locus 2p12 chez l'Homme et 6C3 chez la souris (Nata *et al.*, 2004) à l'exception des gènes REG4/Reg4 situés au locus 1p12 chez l'Homme et 3F3 chez la souris (Hartupee *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2019). La forte similarité intra et inter-espèces des gènes Reg suggère qu'ils seraient issus d'un unique gène ancestral. (Narushima *et al.*, 1997 ; Laurine *et al.*, 2005 ; Gurr, 2011).

Les protéines Reg ont un poids allant de 16 à 17 kDa et présentent des structures très similaires entre elles. Elles comprennent un unique CRD associé à un peptide signal de 20 à 30 acides aminés à l'extrémité N-terminale permettant leur sécrétion (Zhao *et al.*, 2013). Le motif EPN des lectines fixe préférentiellement le mannose et le GlcNAc (East *et al.*, 2002). L'affinité de REG3A pour ces deux sucres sous leur forme monomériques est faible, en revanche REG3A possède une forte affinité pour les polysaccharides complexes composés de mannose et de GlcNAc tels que la chitine, le mannane et le peptidoglycane (Cash, 2006).

3.1.2 Récepteurs cellulaires

A ce jour, seul EXTL3 (exostosin like glycosyltransferase) a été identifié comme étant un récepteur de REG1A / Reg1 (Kobayashi *et al.*, 2000 ; Ba *et al.*, 2011). Il s'agit d'une glycosyltransférase qui régule la biosynthèse de l'héparane sulfate pour notamment soutenir le développement du squelette et de l'hématopoïèse en formant des protéoglycanes. EXTL3 a une expression ubiquitaire, localisée dans le réticulum endoplasmique et le golgi (Takasawa, 2015). Il possède une forte homologie de séquence avec la famille EXT et l'activation de EXTL3 dans les cellules pancréatiques β induit leur prolifération avec un effet positif dans le diabète (Akiyama, 2000). EXTL3 est nécessaire à la fonction de REG3A dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes (Lai *et al.*, 2012). Certains auteurs suggèrent que EXTL3 serait aussi un récepteur de REG3A (Lai *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2016).

Moniaux *et al.* ont montré que le réseau de fibrine et de fibronectine de la MEC formé en conditions inflammatoires interagit avec REG3A et que cette interaction diminuait les dommages oxydatifs extracellulaires (Moniaux *et al.*, 2015). La protéine gp130, de la famille des récepteurs à l' est évoquée par certains auteurs comme possible récepteur des protéines Reg, en particulier des protéines REG3 (Loncle *et al.*, 2015). Aucun résultat expérimental n'est venu étayer cette hypothèse qui est largement controversée (Li *et al.*, 2016).

3.2 **REG3A**

Dans la suite de ce chapitre nous traiteront spécifiquement de REG3A et de ses homologues murins Reg3b et Reg3g (INGAP chez le hamster).

3.2.1 Présentation

La protéine REG3A a été découverte par plusieurs équipes indépendamment les unes des autres. La première mise en évidence en 1986 a été effectuée à partir d'extraits d'hypophyse de rat sous la dénomination de peptide 23 (Yokoya et Frisen, 1986; Tachibana *et al.*, 1988). Elle est redécouverte en 1991 dans le suc pancréatique de rat au cours de la pancréatite aiguë sous le nom de protéine associée à la pancréatite (PAP) (Keim *et al.*, 1991). En 1992, le criblage d'une banque de cDNAs de CHC humain permet d'identifier une nouvelle fois la protéine REG3A, cette fois-ci sous le nom de Hepatocarcinoma-Intestin-Pancreas (HIP) (Lasserre *et al.*, 1992). L'homologue de hamster INGAP est découvert indépendamment en 1997 (Rafaeloff *et al.*, 1997). Les protéines HIP et PAP se révèlent identiques ainsi que le Peptide 23 et sont ensuite dénommées HIP/PAP (Lasserre *et al.*, 1994; Katsumata *et al.*, 1995). A partir des année 2000, la dénomination REG3A s'impose dans la littérature.

3.2.2 Régulation génétique et structure protéique

Plusieurs mécanismes participent à la régulation de la transcription du gène *REG3A*. Certaines interleukines, comme l'IL-17 et l'IL-33 provoquent l'augmentation de la transcription de *REG3A* qui assure alors le contrôle de l'inflammation dans un contexte de dommages tissulaires (Wu *et al.*, 2016 ; Lai *et al.*, 2012). Liu *et al.*, montrent *in vitro* que le signal de l'IL-6 utilise la voie de signalisation JAK/STAT pour accroitre les niveaux d'expression de REG3A (Liu *et al.*, 2015). L'activation de la voie WNT/β-caténine induit l'expression de REG3A dans la lignée de cellules HuH7 dérivées de CHC (Cavard *et al.*, 2015). Cho *et al.* montrent que la co-culture de cellules stromales (cellules stellaires activées) et de cellules tumorales dérivées de CHC induit une expression plus forte de REG3A qu'une monoculture de cellules cancéreuses. La diminution de REG3A par siRNA décroit la prolifération des cellules tumorales en co-culture *in vitro* et *in vivo*. (Cho *et al.*, 2020).

REG3A est synthétisé sous la forme d'un pré-pro-peptide de 175 acides aminés (aa) et 19 kDa (Tableau 3). Le peptide signal de 26 aa en position N-terminale est clivé ce qui libère un pro-peptide de 149 aa et 16 kDa. Ce dernier est présent dans tous les organes où l'expression de REG3A est observée. Dans la lumière digestive, un second clivage de 9 ou 11 aa est effectué par des protéases digestives : les trypsines au niveau de la liaison peptidique Arg37-Ile38 ou les élastases au niveau de la liaison peptidique

Ser35-Ala36. Ce clivage est à l'origine d'une forme courte de 15 kDa.

La protéine ne peut alors plus être digérée par aucune autre protéase. Elle acquiert la capacité de s'agréger en oligomères pour former une structure insoluble, fibrillaire, précipitant en présence d'un pH supérieur à 6,5 (Graf *et al.*, 2001 ; Schiesser *et al.*, 2001). Hormis ces deux clivages, aucune autre modification post-traductionnelle de REG3A n'a été décrite.

En 1999 la structure tridimensionnelle de REG3A est obtenue par cristallographie puis confirmée par résonance magnétique nucléaire (Abergel *et al.*, 1999) (Figure 35). Sa structure secondaire est composée de deux hélices α et de huit feuillets β , sa structure tertiaire est maintenue par trois ponts disulfure en positions 40-51, 68-171 et 146-163. Les deux premiers ponts sont typiques des CRD de lectine, le troisième est spécifique du groupe VII. REG3A possède un CRD formé de deux boucles : la boucle 1 s'étend des résidus 107 à 121 et contient un motif EPN en position 114-116. La boucle 2 s'étend des résidus 130 à 145 et est dépourvue de motif EPN (Lehotzky *et al.*, 2010). Ceci est une différence notable comparé aux autres CTL où ce motif est aussi présent sur la boucle 2, il permet la fixation calcium-dépendante des sucres cibles (Weis *et al.*, 1992). Un motif ND habituellement présent sur le feuillet β 4 des CTL n'est pas conservé chez REG3A (Lehotzky *et al.*, 2010). Il était jusqu'alors considéré comme nécessaire à la fixation de l'extrémité 4-OH des glucides. Bien que de charge neutre, REG3A présente une structure polaire avec sur une face de la protéine 9 des 11 résidus acides et 12 des 13 résidus basiques à l'opposé (Ho *et al.*, 2006).

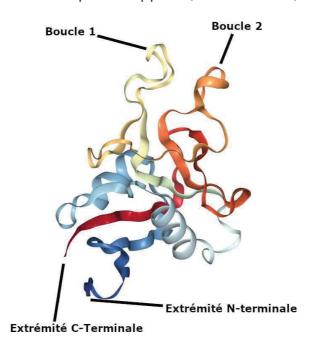


Figure 35 - Structure tridimensionnelle de REG3A. (https://www.rcsb.org/3d-view/2G00/0)

Elements	Position(s)	Représentation graphique	Taille (aa)
Peptide signal	1 - 26		26
propeptide	27 - 175		149
2nd clivage	27 - 37		11
Forme courte	38 - 175		138

Tableau 3 - Clivages de REG3A par les élastases.

3.2.3 Profil d'expression

Chez l'Homme, REG3A est exprimé en condition physiologique dans un certain nombre de tissus et types cellulaires bien définis suggérant une régulation tissu spécifique. REG3A est détectée dans les cellules β des îlots de Langherans, les cellules épithéliales, pyloriques et fovéolaires de la muqueuse gastrique, les cellules de Paneth de l'intestin grêle, les cholangiocytes, l'épithélium utérin, les motoneurones, le cervelet et les cellules mélanotropes de l'hypophyse (Livesey *et al.*, 1997 ; Choi *et al.*, 2007 ; Christa *et al.*, 1996, 1999 ; Chakraborty *et al.*, 1995 ; Nishimune *et al.*, 2000 ; Bartoli *et al.*, 1998). Au cours du développement, REG3A est détecté dans le pancréas, le jéjunum, le colon, l'hypophyse, le lobe frontal et le cervelet (Bartoli *et al.*, 1998). REG3A n'est pas détecté ni dans le colon ni dans le foie sain (Christa *et al.*, 1996) (Tableau 4). Dans les modèles murins, Reg3b et Reg3g sont exprimés dans le pancréas (Bimmler *et al.*, 2004 ; Narushima *et al.*, 1997). Chez le rat, Reg3g a été détecté dans des cellules souches embryonnaires (Jing *et al.*, 2010).

En condition inflammatoire, REG3A est surexprimé dans les acini pancréatiques, le colon, mais aussi dans les kératinocytes (Gironella *et al.*, 2007 ; Dieckgraefe *et al.*, 2000 ; Lawrance, 2001 ; Ogawa *et al.*, 2003 ; Lai *et al.*, 2012 ; Jiang *et al.*, 2017 ; Fan *et al.*, 2019). REG3A est détectée dans les motoneurones en régénération ainsi que dans les plaques amyloïdes au cours de la maladie d'Alzheimer (Namikawa *et al.*, 2005 ; de la Monte *et al.*, 1990) (Tableau 4). Reg3b et Reg3g sont détectés dans le pancréas inflammatoire et en situation régénérative dans les neurones sensoriels et moteurs de rat (Namikawa *et al.*, 2005 ; Bimmler *et al.*, 2004 ; Graf *et al.*, 2002).

REG3A est exprimée au cours de plusieurs maladies tumorales comme l'adénocarcinome pancréatique, le cancer colorectal, les cancers hépatiques, l'adénome hypophysaire et les tumeurs de la sphère ORL (Xie *et al.*, 2003 ; Ye *et al.*, 2015 ; Yuan, 2005 ; Christa *et al.*, 1999 ; Bartoli *et al.*, 1998 ; Mikami *et al.*, 2019 ; Masui *et al.*, 2013). En revanche son expression serait éteinte au cours de l'adénocarcinome gastrique (Choi *et al.*, 2007) (Tableau 4). Nous reviendrons sur le rôle de REG3A dans le cancer dans une section spécifique.

0	Conditions						
Organes	Physiologique	Inflammatoire	Tumorale				
Pancréas	Cellules α	pancréatite (acini)	adénocarcinome				
Estomac	Muqueuse						
Intestin grèle	Cellules de Paneth	Dysbiose (C. Paneth)					
Colon		Colite (C. épithéliales)	cancer colorectal				
Foie	Cholangiocytes	Hépatites (hepatocytes)	CHC / cholangiocarcinome				
Peau		Plaie (keratinocytes)					
utérus	Cellules épitheliales						
Cerveau	Motoneurones et melanotropes	Alzheimer	Adénome hypophysaire				

Tableau 4 - Profil d'expression de REG3A.

Le taux sanguin circulant de REG3A apparaît être un bon marqueur prédictif de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) après greffe de moelle osseuse (Ferrara *et al.*, 2011). La concentration physiologique de REG3A dans le sérum est inférieure à 10 ng/mL, la concentration seuil prédictive d'une complication a été fixée à 150 ng/mL. Il s'agit d'une maladie au cours de laquelle les lymphocytes T issus du donneur agressent les tissus du receveur et provoquent une importante inflammation de certains organes. L'atteinte du tractus digestif est la complication grave la plus fréquente de la GVHD (Kakihana *et al.*, 2016). La surexpression pharmacologique de REG3A est proposée comme étant une possible solution thérapeutique non-immunosuppressive de la GVHD (Zhao *et al.*, 2018).

3.3 Activités biologiques de REG3A

Un grand nombre d'activités biologiques différentes selon l'organe étudié et la pathologie considérée ont été révélées par différentes équipes. Elles concernent essentiellement le contrôle de l'inflammation et de la réparation/régénération des tissus ainsi que le contrôle de l'oncogenèse. Nous avons sélectionné dans cette partie de notre exposé un ensemble de preuves expérimentales non exhaustives venant confirmer la capacité d'accélération du processus de réparation par REG3A dans un contexte inflammatoire.

3.3.1 Activité anti-inflammatoire et de réparation tissulaire

Maladies digestives aiguës

Les effets bénéfiques anti-inflammatoires de REG3A ont été rapportés dans plusieurs modèles de pancréatite aiguë, d'hépatite aiguë et de colite aiguë.

Il a par exemple été montré *In vivo* que RelA/p65, membre de la famille NF-κB, régule positivement Reg3b et protège les cellules pancréatiques acineuses de l'inflammation aiguë (Algul *et al.*, 2007). Concernant le foie sur lequel nous nous étendrons davantage, Lieu *et al.* ont montré que l'injection de protéine recombinante humaine REG3A à des souris sauvages C57Bl/6 entraine une moindre sensibilité à l'hépatite aiguë induite par l'acétaminophène ou encore qu'une injection de protéine REG3A avant hépatectomie partielle stimule la régénération hépatique (Simon *et al.*, 2003; Lieu *et al.*, 2005; Moniaux *et al.*, 2010). Les souris invalidées pour l'orthologue murin Reg3b présentent une survie diminuée et un ralentissement de la régénération hépatique au décours d'une hépatite aiguë induite (Lieu *et al.*, 2006).

L'ensemble des études de REG3A dans des modèles *in vivo* de souffrance hépatique et d'hépatite ont révélées une fonction anti-oxydante de la protéine REG3A. REG3A atténue les dommages mitochondriaux provoqués par les ROS produits lors d'une intoxication à l'acétaminophène chez la souris (Lieu *et al.*, 2005). Il a été montré que REG3A induisait une forte diminution des niveaux de peroxydation lipidique et de carbonylation des protéines dans des hépatocytes stressés *in vitro* et dans des foies de modèles d'hépatite (Moniaux *et al.*, 2010). Les auteurs montrent que REG3A possède une fonction de piégeage des ROS, en particulier du radical hydroxyle. REG3A est capable de diminuer significativement le niveau extracellulaire de ROS en fixant les radicaux libres présents dans la matrice extracellulaire inflammatoire (Moniaux *et al.*, 2015). Cette activité anti-oxydante extracellulaire améliore grandement la fonctionnalité des voies de signalisation impliquées dans la survie et la prolifération des cellules hépatiques.

Un essai clinique de phase I a démontré l'innocuité de la protéine recombinante humaine REG3A (ALF5755) administrée par voie veineuse à des volontaires sains (Moniaux *et al.*, 2010). Un essai de phase II chez des patients atteints d'hépatites aiguës sévères et fulminantes a conclu à une absence d'effet sur l'ensemble de la cohorte de patients traités mais une efficacité significative dans un sous-ensemble de patients ayant une hépatite auto-immune ou une hépatite d'origine virale (VHB) (Nalpas *et al.*, 2016).

Chez le rat, la surexpression colique de REG3A via un adénovirus véhiculant REG3A protège les animaux d'une colite induite en inhibant les cytokines TNF α et IL-6 (Lv *et al.*, 2012 ; Carvalho *et al.*, 2017). La délivrance entérique du transgène REG3A favorise, d'une part, la résistance contre une colite induite chez la souris et, d'autre part, la présence dans le microbiote de ces animaux d'une plus grande proportion de symbionts comme les Clostridiales (Ruminococcaceae, Lachnospiraceae) aux dépens des Bacteroidetes (Prevotellaceae). L'activité anti-oxydante de REG3A agit sur les communautés bactériennes formant le microbiote intestinal en protégeant de la toxicité ROS les commensaux sensibles à l'oxygène et sur la barrière mucosale

intestinale limitant la translocation bactérienne locale et systémique (Darnaud *et al.*, 2018). L'activité bactéricide directe de REG3A vis-à-vis de bactéries Gram-positif révélé dans l'étude de Cash *et al.* en 2006 n'est pas retrouvée dans cette étude. Il n'est pas clairement établi si les modifications de composition du microbiote intestinal provoquées par les protéines REG sont à attribuer à leurs fonctions antimicrobienne, antioxydante ou de maintenance de la barrière mucosale intestinale (Shin et Seeley, 2019; Darnaud *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2016).

Maladies inflammatoires de la peau, maladies du myocarde

Les travaux de Lai *et al.* ont montré les effets bénéfiques de REG3A dans l'homéostasie tissulaire cutanée (Lai *et al.*, 2012 ; Wu *et al.*, 2016). REG3A est fortement exprimée dans les kératinocytes au cours du psoriasis humain et dans un modèle d'inflammation cutanée de type psoriasique induit par l'imiquimod ainsi que lors de la réparation des plaies, cette expression est augmentée sous l'action des cytokines IL-17, IL-33 et IL-36. Les auteurs ont découvert que REG3A favorise la cicatrisation cutanée en inhibant la différentiation terminale des kératinocytes et en soutenant leur prolifération. Ces résultats suggèrent que REG3A pourrait être un des médiateurs de l'hyper-prolifération épidermique observée au cours de la réparation physiologique des plaies et dans le psoriasis.

Lörchner et al. ont démontré que les cardiomyocytes survivant situés en périphérie d'une zone d'infarctus étaient des « senseurs » essentiels du contrôle de l'inflammation et de la réparation post-infarctus (Lörchner et al., 2015). Les auteurs rapportent que ces cardiomyocytes périphériques favorisent la réparation du myocarde en libérant la protéine Reg3b en excès. Cette dernière participe à la protection de la matrice extracellulaire en stimulant le recrutement local de macrophages ce qui limite l'infiltration délétère des polynucléaires neutrophiles. L'extinction de Reg3b entraine à contrario la dérégulation de la population de neutrophiles dans la zone infarcie et accentue la dégradation de la matrice, les risques de dilatation ventriculaire et de rupture cardiaque. Ces résultats suggèrent un rôle crucial de Reg3b dans l'immunomodulation (par chémoattraction) pour assurer la réparation tissulaire cardiaque en limitant l'inflammation du microenvironnement dans la zone non infarcie.

Neuro-inflammation et régénération

Dans le système nerveux central, la surexpression de certains membres de la famille Reg est associée aux processus neurodégénératifs avec un effet potentiellement délétère. Au cours de la maladie d'Alzheimer, les taux de REG1A et REG3A sont augmentés précocement dans le liquide céphalo-rachidien, au sein des plaques amyloïdes et des enchevêtrements neuro-fibrillaires de protéines Tau (Duplan, 2001). Les auteurs de cette étude supposent que la structuration en fibrilles insolubles de

REG3A faciliterait la précipitation hétérogène d'autres protéines et participerait à la formation de ces amas pathologiques. Des dépôts similaires de REG1A ont été retrouvés dans les plaques amyloïdes de patients atteints de la maladie de Creutzfeld-Jacob (Laurine *et al.*, 2003).

Dans le système nerveux périphérique, la phagocytose par les macrophages est nécessaire à l'élimination des débris de myéline et d'axone, étape préliminaire à la régénération nerveuse. Namikawa et al. montrent que REG3A est capable de recruter les macrophages au même titre que les chimiokines LIF et MCP1 (Namikawa et al., 2006). REG3A peut aussi directement interagir avec des macrophages ce qui provoque leur agrégation et entretient la réponse inflammatoire (Viterbo et al., 2008). REG3A favorise la surexpression par les macrophages des cytokines pro-inflammatoires Il-1β, IL-6 et TNF α (Viterbo *et al.*, 2008). Chez le rat, les expressions de Reg3b et Reg3g sont fortement augmentées en périphérie de la lésion après un traumatisme crânien (Ampo et al., 2009). Les auteurs soulignent le rôle potentiellement anti-inflammatoire de ces deux protéines. REG3A réduit le phénomène d'excitotoxicité postnatale : l'injection intracérébrale de protéine recombinante humaine REG3A et d'ibotenate, un agoniste des récepteurs NMDA, a un effet protecteur sur le parenchyme cérébral. *In vitro*, cette protection est associée à une réduction du stress oxydatif affectant les neurones. REG3A protège les neurones corticaux, hippocampaux et cérébelleux du stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène chez le rat (Haldipur et al., 2014). Vingt-quatre heures après section du nerf sciatique chez le rat, une forte hausse de la concentration en protéines Reg3b est observée localement au niveau de la section. L'injection d'un anticorps dirigé contre Reg3b ralentit le processus de régénération. Les auteurs ont constaté un effet mitogène de Reg3b sur les cellules de Schwann in vitro (Livesey et al., 1997). Les motoneurones sont très sensibles à la section en période post-natale. Ils ont une forte tendance à l'apoptose comparé à des motoneurones matures (Greensmith et Vrbova, 1996). L'étude de Livesey et al. montre qu'une section de nerf périphérique chez des rats nouveau-nés provoque une forte diminution des niveaux de Reg3b et est associée à l'apoptose des cellules nerveuses (Livesey et al., 1997). Il est également rapporté que Reg3b est un intermédiaire de signalisation dans la voie de survie des neurones médiée par le CNTF, une cytokine de la famille de l'IL-6 (Nishimune et al., 2000). REG3A pourrait aussi favoriser la survie des neurones, leur régénération et leur plasticité, en les protégeant du stress oxydatif (Haldipur et al., 2014).

3.1.1 Promoteur ou inhibiteur de carcinogenèse?

Les effets de REG3A au cours de la carcinogenèse ne sont pas clairement démontrés. Concernant le cancer du pancréas il semble que les résultats obtenus par quelques équipes soient globalement homogènes avec une action pro-tumorale et pro-invasive de REG3A. Cela est différent concernant les études réalisées dans les cancers gastriques, coliques et hépatiques où les articles publiés présentent des

résultats contradictoires (Tableau 5). Il est à noter que la majorité de ces études ont été réalisées *in vitro*, y compris les études à propos du pancréas, et que les modèles et protocoles expérimentaux employés diffèrent largement suivant les auteurs. Aucune étude n'a réellement exploré le rôle de REG3A *in vivo* chez le mammifère. De plus, nous notons que les résultats publiés ne permettent pas de distinguer les effets autocrines des effets paracrines de la protéine REG3A ce qui est difficile expérimentalement et contribue probablement à la variabilité des résultats. Pour ces raisons, les différents résultats publiés contiennent une part d'incertitude et leurs comparaisons restent sujettes à caution.

Globalement les niveaux d'expression de REG3A sont généralement augmentés dans les tissus tumoraux comparés aux tissus non-tumoraux adjacents et aux tissus sains que ce soit dans le pancréas, le foie, le colon et l'estomac (Tableau 5). Cependant, l'expression tumorale de REG3A est très variable d'un échantillon à l'autre, pouvant aller d'une quasi-absence d'expression à une augmentation de plusieurs ordres de grandeur. Cette variabilité d'expression peut notamment correspondre à des degrés différents d'activation transcriptionnelle du gène REG3A plus ou moins facilitée par un environnement tumoral pro- inflammatoire.

Le pancréas est l'organe où REG3A a le plus été étudié. Elle y est fortement exprimée au cours du cancer et y est corrélée à l'invasion métastatique ainsi qu'à une plus faible survie des patients (Xie et al., 2003). REG3A y est détectée à des taux 24 fois supérieurs à ceux de patients atteints d'autres maladies pancréatiques en général et 16 fois supérieurs à ceux de patients atteints de pancréatite chronique (Rosty et al., 2002). Cette activité pro-tumorale de REG3A est inhibée par la protéine suppresseur de signal cytokinique SOCS3 (Wang et al., 2014). Les auteurs montrent que la réduction de SOCS3 par un siRNA accroit le potentiel pro-tumoral de REG3A et, qu'à l'inverse, la surexpression de SOCS3 entraine un effet protecteur dans 5 lignées cellulaires humaines. L'exposition de cellules SW1990 à l'IL-6 active la voie JAK/STAT, responsable d'une hausse de l'expression de REG3A. Elle engendre à son tour une hausse de l'activité de JAK/STAT, provoquant une boucle de rétroaction positive d'expression et d'inflammation qui accroit l'agressivité tumorale (Liu et al., 2015). L'eckol, un phlorotanin étudié pour ses effets anti-ROS (Kang et al., 2005), est capable d'inhiber in vitro cet effet pro-prolifératif de REG3A (Zhang et al., 2019). L'activation de JAK/STAT par REG3A favorise l'invasion péri-neurale au cours de l'adénocarcinome ductulaire pancréatique (Nigri et al., 2017). Les investigateurs de cette dernière étude proposent d'utiliser le taux sérique de REG3A comme biomarqueur pronostique chez les patients cancéreux traités. Ils associent un taux élevé de REG3A à une faible réponse à la chirurgie, une faible survie sans progression et une faible espérance de vie totale des patients. L'analyse sur puce à ADN du transcriptome de cellules SW1990 montre que l'expression de plusieurs gènes pro-tumoraux est augmentée en présence de REG3A, en particulier JAK1, STAT3, IL10, FOXM1, KRAS, c-MYC, Cycline D1 et c-FOS. (Xu et al.,

	au		Nature de	la preuv	e		
Organe	Observation mentionnée	Biopsies			r	Auteurs	Année
	Surexpression de REG3A dans le cancer du pancréas.	x				Rosty et al.	2002
	Forte expression de REG3A dans le cancer du pancréas.	x				Xie et al.	2003
	SOCS3 inhibe l'activité protumorale de REG3A.			x		Wang et al.	2014
Pancréas	REG3A favorise la progression tumorale en présence d'IL-6 via JAK/STAT.			x		Liu et al.	2015
	REG3A promeut l'expression de gènes pro-tumoraux.	8		х	8 0	Xu et al.	2016
	REG3A favorise l'invasion tumorale périneurale via JAK/STAT.			х	8	Nigri et al.	2017
	L'eckol inhibe la prolifération tumorale induite par REG3A.			x		Zhang et al.	2019
	L'expression de REG3A est régulée négativement dans le tisssu tumoral.	х				Choi et al.	2007
	REG3A est un marqueur potentiel du cancer gastrique,	х				Matsumura et al.	2011
Estomac	Une catégorie de patients atteints de cancer gastrique exprime des anticorps anti-REG3A	х				Xu et al.	2012
	REG3A est suexprimée dans le cancer gastrique. Elle favorise la prolifération et l'invasion tumorale.	х		х		Chen et al.	2017
	Défaut d'expression de REG3A dans le tisssu tumoral. REG3A inhibe la prolifération et favorise l'apoptse des cellules tumorales.	х		x		Qiu et al.	2018
	Expression de REG3A dans le cancer du colon.	x		.1.	¥ 6	Motoo et al.	1998
	L'expression de REG3A est correlée à une faible invasion tissulaire et à un meilleur pronostic.	х			0 0	Zheng et al.	2011
	REG3A est un marqueur potentiel du cancer colorectal.				х	Nagaraj et al.	2011
Colon	REG3A est sur-exprimée dans le cancer du colon et favorise la prolifération tumorale.	х		х		Ye et al.	2015
	REG3A est correlée à la colonisation colique par Fusobacterium.		x			Lennard et al.	2016
	Surexpression de REG3A dans le cancer du colon.	х			6 0	Xu et al.	2017
	Protection contre l'inflamation et la tumorigénère colique par Reg3b via l'inhibition de STAT3.		x		9 9	Liu et al.	2017
525528	Surexpression de REG3A dans le CHC.	х				Cavard et al.	2006
Foie	Effet protumoral de REG3A dans CHC via le stroma.			х	¢ é	Cho et al.	2019

Tableau 5 - Liste des publications traitant de REG3A dans le cancer.

Comme mentionné précédemment, la littérature décrit également des niveaux d'expression élevés de REG3A dans les tissus tumoraux gastriques, coliques et hépatiques. L'équipe de Chen *et al.* a montré que l'expression de REG3A est plus importante dans le tissu tumoral gastrique de 41 patients comparativement au tissus sain (Chen *et al.*, 2017) (Figure 37 - A). Toujours au niveau gastrique, l'étude de Xu *et*

al. a montré que des auto-anticorps anti-REG3A étaient retrouvés chez 22,9% de patients atteints d'adénocarcinome gastrique mais absents chez les patients témoins (Xu et al., 2012). Au niveau colorectal, REG3A est retrouvé dans 21% (6/28) des cancers par hybridation in-situ (Motoo et al., 1998). Une autre étude rapporte que la surexpression de REG3A, mesurée par RT-PCR est présente dans 70,7% (58/82) des biopsies analysées (Ye et al., 2015). En comparant 79 biopsies de tumeurs coliques aux tissus sains adjacents, un autre article rapporte une expression de REG3A 23 fois supérieure dans les tissus pathologiques (Xu et al., 2017). Enfin, au niveau hépatique, 76% (32/42) des tumeurs expriment REG3A selon une étude menée par RT-PCR. Ce profil d'expression tumoral est surtout détecté dans les CHCs présentant des mutations de la voie WNT/β-caténine : 62% (20/32) des tumeurs exprimant REG3A étaient mutées contre 10% (1/10) des tumeurs REG3A négatif (Cavard et al., 2005) (Figure 38).

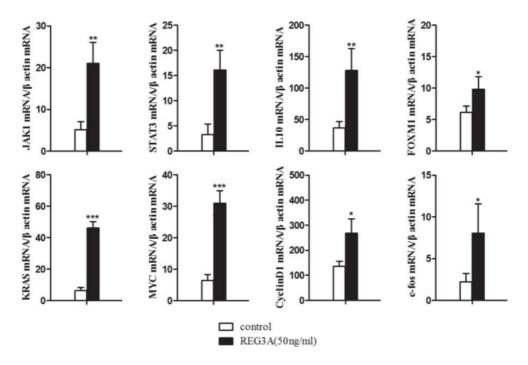


Figure 36 - Niveau d'expression de l'ARN messager des gènes indiqués dans des cellules cancéreuses pancréatiques SW1990 stimulés par REG3A. (Xu et al., 2016)

Ces résultats ont encouragé plusieurs équipes à étudier REG3A comme marqueur diagnostic de cancer. L'équipe de Matsumura *et al.* a proposé un panel de 5 protéines (REG3A, TSPAN8, EPCAM, MMP12, MMP7) permettant de détecter les cellules cancéreuses circulantes et de suspecter le diagnostic d'adénocarcinome gastrique (Matsumura *et al.*, 2011). Nagaraj *et al.* ont identifié REG3A in-silico comme un marqueur diagnostic potentiel du cancer colorectal (Nagaraj and Reverter, 2011). Enfin, l'expression de REG3A a été corrélée à la colonisation colique par la bactérie *Fusobacterium nucleatum*, une bactérie déjà associée au cancer colorectal (Lennard *et al.*, 2016).

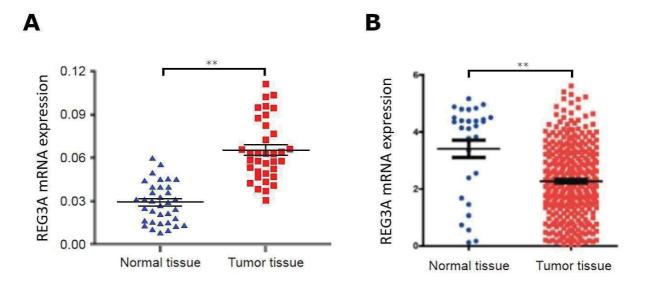


Figure 37 - Niveau d'expression normalisée de REG3A dans l'adénocarcinome gastrique. A) Travaux de Chen et al., 2017. B) Travaux de Qiu et al., 2018.

Ces résultats sont contestés par d'autres études. Les travaux de Choi *et al.* rapportent que l'expression de REG3A mesurée par RT-PCR est diminuée dans 20 biopsies d'adénocarcinomes gastriques sur un panel de 30, comparativement aux tissus gastriques sains. Les auteurs ne détectent pas d'ARNm REG3A dans la lignée de cancer gastrique du panel SNU. Ils rapportent que la déméthylation *in vitro* de l'ADN par le 5-aza-2'-deoxycytidine restaure l'expression de REG3A (Choi *et al.*, 2007). L'étude menée par Qiu *et al.* affirme que l'expression de REG3A dans le cancer gastrique est plus faible dans le tissu tumoral que dans le tissus sain (Qiu *et al.*, 2018) (Figure 37 - B).

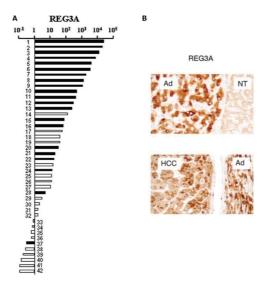


Figure 38 - (A) Niveau d'expression de REG3A dans le carcinome hépatocellulaire (CHC). Rectangle plein/vide : présence/absence de mutations dans la voie WNT/β-caténine. (B) Immunomarquage tissulaire de REG3A dans le CHC, l'adénome (Ad) et le tissu non-tumoral (NT). (Cavard et al., 2005)

Cette controverse sur l'expression de REG3A en condition tumorale n'est pas la seule soulevée par la littérature. Le rôle de REG3A est lui aussi débattu (Zhang et al., 2019). Un premier ensemble d'articles soutient que REG3A favorise la croissance tumorale. Dans le cancer gastrique, Chen et al. rapportent que l'invalidation de REG3A à l'aide d'un siRNA diminue la prolifération, l'invasion et la migration de cellules cancéreuses de la lignée SGC-7901 in vitro (Chen et al., 2017) (Figure 39). Au niveau colique, Ye et al. décrivent un effet pro-prolifératif et pro-tumoral de REG3A, sa délétion provoquant l'arrêt de la prolifération en phase G1 et déclenchant l'apoptose (Ye et al., 2015). Selon Cho et al., l'expression de REG3A in vitro par les cellules hépatiques tumorales Huh-7, HepG2 et SNU761 n'augmente qu'en présence d'une co-culture avec des cellules hépatiques stellaires. Cette surexpression est alors associée à une hausse de la prolifération cellulaire (Cho et al., 2020). L'inhibition par un siRNA REG3A ramène la prolifération cellulaire à son niveau basal en absence de cellules stellaires. Les auteurs rapportent que ce mécanisme utilise la signalisation de PDGF-ββ et de p42/44-MAPK. Ils montrent que l'inhibition de REG3A diminue l'activité de ces voies de signalisation et que la sur-activation exogène de celles-ci reproduit les effets de REG3A.

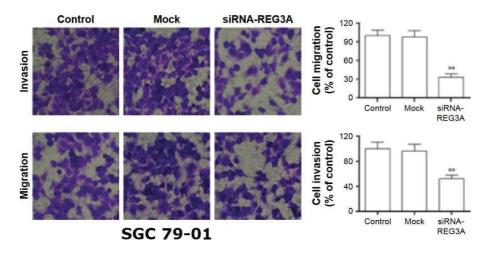


Figure 39 - Effet pro-invasif de REG3A dans la lignée cellulaire gastrique SGC7901 (Chen et al., 2017). **: p<0.01.

A contrario, Qiu et al. rapportent que la surexpression de REG3A à l'aide d'un lentivirus favorise l'apoptose et ralentit la prolifération et l'invasion tumorale dans les lignées gastriques MGC-803, BGC-823 et SGC-7901. Ils affirment que cet effet passe par l'activation de la voie PI3K/AKT (Qiu et al., 2018) (Figure 40). Au niveau colique, Zheng et al. montrent que l'expression de REG3A est corrélée à une plus faible invasion tissulaire et est associée à un meilleur pronostic pour le patient (Zheng et al., 2011). Cet effet serait dû à une inhibition par REG3A de la protéine STAT3 dans les entérocytes (Liu et al., 2017).

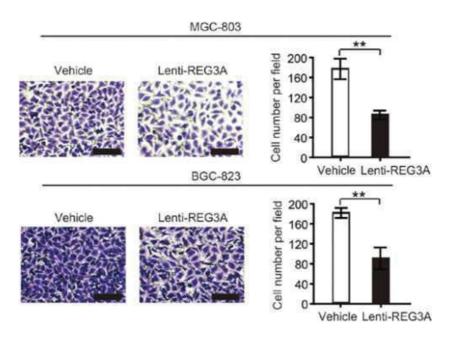


Figure 40 - Effet anti-invasif gastrique de REG3A dans les lignées cellulaires MGC-803 et BGC-823 (Qiu et al., 2018). **: p< 0.01.

Deuxième partie : Matériel et méthode

Modèles expérimentaux

Modèles animaux

Les souris utilisées dans ces travaux sont toutes de fond génétique C57BL\6N. Elles ont été hébergées au SEAT (SErvice des Animaux Transgéniques, CNRS, Université Paris-Sud, Villejuif) et au SEIVIL (Service d'Expérimentation *In vivo* INSERM Lavoisier, INSERM, Université Paris-Saclay, Villejuif). Les animaux ont été élevés dans un environnement conventionnel dans des cages ventilées regroupant un maximum de 5 animaux sur un rythme jour/nuit de 12h. Elles ont eu un accès à l'eau et à de la nourriture RM1 et RM3 (Special Diet Service) *ad libitum*. Nous avons utilisé les quatre lignées d'animaux suivantes :

- REG3A-TG: La lignée transgénique homozygote REG3A-TG est issue des travaux de Simon et al. (Simon et al., 2003). La protéine humaine REG3A est spécifiquement exprimée dans les hépatocytes sous la dépendance du promoteur murin du gène de l'albumine.
- MYC-TG: Dans ce modèle, l'expression hépatique spécifique de c-Myc, induite par les séquences régulatrices du virus de l'hépatite de la marmotte (WHV), provoque le cancer du foie chez tous les animaux (Etiemble *et al.*, 1994). Une lignée homozygote MYC-TG a été généré à partir de la lignée hétérozygote décrite par Etiemble *et al.*
- MYC/REG3A-TG: Nous avons croisé les deux lignées de souris REG3A-TG et MYC-TG pour établir la lignée homozygote MYC/REG3A-TG.
- WT : Cette lignée est issue du croisement de souris C57BL/6N et de souris REG3A-TG. Les animaux REG3A -/- issus de la seconde génération de ces croisements ont été sélectionnés pour nos études.

Les expériences menées sur ces lignées se répartissent suivant deux modèles de carcinogénèse (Tableau 6) :

— Un modèle génétique reposant sur les deux lignées MYC-TG et

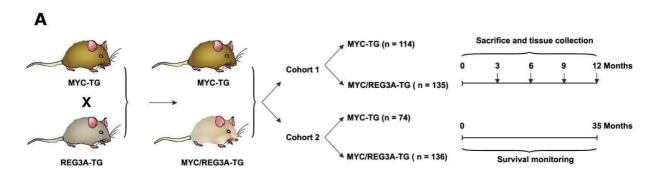
MYC/REG3A-TG. Deux expériences ont été effectuées avec ces lignées (Figure 41 - A).

- Une étude de survie impliquant 74 animaux MYC-TG et 136 MYC/REG3A-TG.
- Une cinétique de carcinogenèse avec un sacrifice tous les 3 mois pendant 18 mois pour un total de 166 animaux MYC-TG et 226 MYC/REG3A-TG.
- Un modèle chimique résultant de l'injection intrapéritonéale d'une dose unique de 10 μg/g de diethylnitrosamine (DEN) au quatorzième jour de vie des animaux. Un total de 73 animaux sauvages et 75 animaux REG3A-TG ont été inclus dans le protocole et sacrifiés par étapes à 2, 3, 4, 5, 6, 8 et 9 mois (Figure 41 - B).

	Comula	bras REG3A -	74							
	Survie	bras REG3A +	136							
Modèle génétique		Mois	3	6	9	12	18	Total		
Sacrifices	bras REG3A -	25	30	39	51	21	166			
		bras REG3A +	33	48	31	70	44	226		
		Mois	2	3	4	5	6	8	9	Total
Modèle DEN Sacrifices	Sacrifices	bras REG3A -	10	10	10	10	9	14	10	73
	bras REG3A +	10	10	10	10	9	16	10	75	

Tableau 6 - Nombre d'animaux par lignée et par expérience.

Au sacrifice, les animaux ont été pesés, le sang collecté et les organes prélevés. Les foies ont été pesés et disséqués afin de déterminer la présence, le nombre et la taille des nodules tumoraux. Des échantillons de foie ont été fixés en formaldéhyde ou congelés immédiatement dans l'azote liquide.



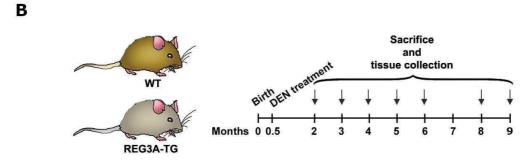


Figure 41 - A) Genèse de la lignée MYC/REG3A-TG et protocoles expérimentaux transgéniques. B) Protocoles expérimentaux chimiques.

Modèles cellulaires

Les lignées hépatiques cancéreuses humaines HuH-7 et HepG2 ont été cultivées dans du milieu DMEM GlutaMAX 4,5g/L de glucose (Gibco Ref : 11584516) en présence de pénicilline (1%), de streptomycine (1%) et de sérum de veau fœtal (10%) (Gibco Ref : 26140). Elles ont été conservées en incubateur à 37°C avec 5% de CO2. Toutes les transfections ont été effectuées à l'aide du kit ViromerRED (biotech Ref : VR-01LB-03) suivant le protocole établi par le fabricant en utilisant 4 µg de plasmide contrôle pcDNA 3.1 ou de plasmide contenant REG3A (pcDNA 3.1-REG3A) par boîte de Pétri de 10 cm.

Analyse biochimique des échantillons

Histologie

Les fragments hépatiques fixés en formaline puis inclus en paraffine ont été coupés au microtome en sections de 5 µm et les coupes ont été déposées sur une lame de verre. Les échantillons ont ensuite été déparaffinés au xylène et réhydratés en éthanol. Les antigènes d'intérêt ont été révélés suivant deux procédures distinctes en fonction de l'anticorps utilisé :

- Les lames ont été plongées en tampon citrate pH6 et placées dans une enceinte fermée à la température de 120°C à la pression de deux atmosphères pendant 10 min. (anticorps anti-Ki-67 et anti-Caspase 3)
- Les lames ont été plongées en tampon TE-pH9 et montées à la température de 100°C au micro-onde, 3x5 min. (anticorps anti-γH2AX)

TE-pH9:

Tris base Tris base: 1,21g

EDTA anhydre: 0,37g / disodique: 0,47g

Eau distillée : qsp 1L NaOH : ajuster au pH 9

Tween: 500 µL

Les peroxydases endogènes ont été bloquées par une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 30 min puis les lames ont été incubées avec l'anticorps primaire pendant la nuit à 4°C à la concentration recommandée par le fabricant (Tableau 7). Après lavages en tampon phosphate salin (PBS), les lames ont été incubées avec l'anticorps secondaire 30 min à température ambiante puis lavées et révélées au 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (Dako Liquid DAB+ Substrate Ref : K3468). Les lames ont ensuite été contre-colorées à l'hématoxyline puis montées avec une lamelle. Elles ont été conservées à l'abri de la lumière à température ambiante jusqu'à leur lecture.

Les colorations hématoxyline, éosine et safran (HES) ont été effectuées sur l'automate du service d'anatomopathologie de l'hôpital du Kremlin-Bicêtre.

Analyse des protéines

Les protéines ont été extraites suivant deux protocoles distincts :

- Extraction totale: Les fragments de tissus congelés ont été lysés en tampon RIPA à l'aide du TissuLyser (Quiagen) à 30Hz pendant 3x1 min, les échantillons cellulaires en culture ont été resuspendu en tampon RIPA et homogénéisés pendant 10s. Tous les échantillons ont ensuite été laissés sur glace 30 min puis l'ADN fragmenté par aspiration-refoulement à travers une aiguille 26G. Après avoir été congelés une nuit à -80°C, ils ont été centrifugés 15 min à 12 000g. Les surnageants ont été conservés à -80°C.
- Fractionnement nucléo-cytoplasmique : La séparation des protéines cytoplasmiques et nucléaires a été effectuée à l'aide du kit NE-PER : Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo scientific Ref 78835) suivant le protocole du fabricant.

Pour l'analyse par immunodétection sur membrane, 30 µg de chaque extrait protéique ont été séparés par SDS-PAGE et transférés sur une membrane de nitrocellulose (GE healthcare). Les membranes ont été incubées 12h à 4°C en présence des différents anticorps primaires dilués en blotto (TBST + 5% de protéines de lait) à la concentration spécifiée par le fabricant, après validation de celle-ci (Tableau 7). Les anticorps secondaires ont été incubés 1h à température ambiante. Les protéines ont été révélées par chimioluminescence à l'aide du Kit Pierce ECL Plus (Thermo scientific Ref 32123). Le signal a été acquis sur film autoradiographique (GE Amersham Hyperfilm ECL) et quantifié à l'aide du logiciel ImageJ.

En condition non fractionnée, les résultats ont été normalisés en faisant le ratio signal de la protéine d'intérêt sur signal de l' α/β -tubuline. En condition fractionnée ils ont été normalisés avec l' α -tubuline pour la fraction cytoplasmique et avec la lamine B1 pour la fraction nucléaire.

Un échantillon de référence a été déposé sur l'ensemble des membranes afin de comparer entre elles les mesures issues de différentes expériences.

Slot Blot : 0.3µg de différents carbohydrates et 0,8ng de protéine recombinante REG3A ont été déposé sous vide sur une membrane de nitrocellulose et liés par une exposition aux UV de 1 minute. La membrane a ensuite été incubée avec 15ml d'une

solution contenant 1 µg/ml de protéine recombinante REG3A diluée en TBST pendant 2h à température ambiante puis lavée en PBS. La présence de protéine REG3A fixée aux sucres a été révélée par immunodétection suivant la même procédure que ci-dessus.

Co-immunoprécipitation: Les lysats cellulaires ont été collectés en tampon RIPA. 100 µg de chaque échantillon ont été incubés pendant 2h à 4°C avec 15ml d'une solution de RIPA contenant 1µg/ml d'anticorps anti REG3A ou d'IgG polyclonal de lapin (contrôle négatif). Les anticorps ont été agrégés par l'ajout de billes magnétiques couplée à la protéine A/G (Pierce Ref #88802S). Les billes agrégées ont été récupérées avec un aimant et lavées en tampon WB-CoIP. Les extraits ont été montés à 100°C pour détacher les anticorps des billes puis centrifugés à 16000g. Les surnageants ont été récoltés et immunodétectés sur membrane.

WB-CoIP:

NaCl 300mmol/L 0.1% TRITON x100 50 mmol/L TRIS 5mmo/L EDTA

TBST:

TRIS pH 7,5 1M:50 ml

NaCl 5M: 30 ml Tween: 10 ml

Eau distillée : qsp 1L

Pré-RIPA:

TRIS pH 7,5 1M: 1,21 g

NaCl: 1,75 g

IGEPAL 100% : 2,0 ml Na-deoxycholate : 0,50 g Eau stérile : qsp 200 ml

RIPA:

Pre-RIPA: 1040 µL

NAF : 75 μL

β-Glycerophosphate : 75 μL

Cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC) : 30 μ L Orthovanadate de sodium (Na3VO4) : 15 μ L Fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF) : 15 μ L

Anticorps	Fabricant	Référence fabricant	clonalité	Espèce source	Espece cible	dilution WB	dilution IHC
α/β-tubuline	Cell Signalling	2148	poly	Rabbit	Mouse	1/2000e	х
α-tubuline	Sigma	T6199	mono	Mouse	Mouse	1/1000e	х
Caspase-3 clivée	Cell Signalling	9661	ploy	Rabbit	Mouse	X	1/200e
c-MYC	Cell Signalling	5605	mono	Rabbit	Mouse	1/2000e	х
c-MYC - pT58	MyBioSource	821193	poly	Rabbit	Mouse	1/500e	х
Cycline A	Santa Cruz	sc-596	poly	Rabbit	Mouse	1/200e	х
Cycline B1	Santa Cruz	sc-752	poly	Rabbit	Mouse	1/200e	х
Cycline D3	Santa Cruz	sc-182	poly	Rabbit	Mouse	1/200e	х
ERK	Cell Signalling	9102	poly	Rabbit	Mouse	1/1000e	х
ERK - pT202/Y204	Cell Signalling	9101	poly	Rabbit	Mouse	1/1000e	х
GSK3β	Cell Signalling	12456	mono	Rabbit	Mouse	1/1000e	х
GSK3β - pS9	Cell Signalling	55588	mono	Rabbit	Mouse	1/1000e	х
H2AX - pS139	Merck	05-636	mono	Mouse	Mouse	1/1000e	х
H2AX - pS139	Cell Signalling	9718	mono	Rabbit	Mouse	X	1/300e
KI-67	FisherScientific	9106	mono	Rabbit	Human	X	1/100e
Lamine B1	Cell Signalling	13435	mono	Rabbit	Mouse	1/1000e	х
O-GlcNAc	ThermoFisher	MA1-072	mono	Mouse	Mouse	1/1000e	х
OGT	Sigma	06014	poly	Rabbit	Mouse	1/1000e	х
p21	Santa Cruz	sc-397	poly	Rabbit	Mouse	1/200e	х
p27	Santa Cruz	sc-1641	mono	Mouse	Mouse	1/100e	х
REG3A	UMR - 1193	R03-300	ploly	Rabbit	Human	1μg/μl	х

Tableau 7 - Liste des anticorps utilisés.

Analyse des acides nucléiques

L'ARN des échantillons a été extrait en TRIzol à 4° C. Chaque échantillon de cellules a été immergé avec 1 mL de TRIzol pour 5- $10x10^6$ cellules et chaque échantillon de tissu de 1 mm³ avec $500 \, \mu L$ de TRIzol. Les échantillons ont ensuite été homogénéisés avec $200 \, \mu L$ de chloroforme, laissés reposer 3 min et centrifugés $15 \, \text{min}$ à $16 \, 000 \, \text{g}$. La phase supérieure a été récupérée, homogénéisée dans $500 \, \mu L$ d'isopropanol, laissée reposer $10 \, \text{min}$ et centrifugée $10 \, \text{min}$ à $16 \, 000 \, \text{g}$. Le culot a été récupéré, resuspendu dans $1 \, \text{ml}$ d'éthanol à 75% et centrifugé $15 \, \text{min}$ à $5 \, 000 \, \text{g}$. Le culot d'acides nucléiques a été resuspendu dans $50 \, \mu L$ d'eau RNA-free autoclavée.

L'ADN présent dans les échantillons a ensuite été dégradé à l'aide du kit RNAse Free : Turbo DNA-free (Invitrogen, Ref AM1907) afin de ne conserver que les ARNs. Les ARNs ont été exploités suivant différentes procédures :

- PCR en temps réel : 2 µg d'ARN ont été répliqués en ADN complémentaire à l'aide du kit RevertAid RT Reverse Transcription (ThermoFisher, Ref K1691). L'analyse par qPCR a été effectuée avec le mélange SYBR green sur un automate LightCycler 96 (Roche). La liste des olygonucléotides utilisés est disponible dans le Tableau 8. Les mesures ont été faites en duplicats et les résultats ont été normalisés avec la β-Actine.
- Analyses transcriptomiques : 200 ng d'ARN ont été répliqués en ADN complémentaire à l'aide du kit Ambion WT Expression (ThermoFisher, ref 4411974) et étiquetés avec le kit Affymetrix GeneChip WT Terminal Labeling (ThermoFisher, ref 900671). Les cDNA ont ensuite été hybridés pendant 16h à 45°C sur une puce Affymetrix (GeneChip Mouse Gene 2.0 ST arrays). Les données brutes ont été extraites par le logiciel Affymetrix GeneChip Command Console V4.1.2 et traitées via Affymetrix Expression Console V1.4.1. L'ensemble de ces analyses ont été effectuées par la plateforme Biopuces et Séquençage de l'IGBMC.
- Séquençage : Les ARN d'intérêt ont été amplifiés par qPCR et transmis à la société
 Beckman Coulter Genomics afin d'être séquencés par la méthode de Sanger.

Glycémie et quantification du glycogène

La glycémie des animaux a été mesurée sur les échantillons de sérum prélevés lors du sacrifice à l'aide d'un lecteur de glycémie conventionnel (AccuCheck).

Le niveau de glycogène hépatique a été mesuré par absorptiométrie. Chaque échantillon tissulaire (100 mg) est dissout en hydroxyde de potassium, précipité en éthanol et centrifugé 10 min à 1700 g. Le culot de glycogène est resuspendu en phénol. Les échantillons obtenus sont dilués en acide sulfurique et leur absorbance est mesurée à la longueur d'onde de 490 nm.

SeaHorse

Toutes les mesures ont été effectuée sur un automate Seahorse Bioscience XFp. Les cellules ont préalablement été cultivées en puits de 0.32cm² (format de plaque 96 puits), transfecté avec les vecteurs correspondants et laissées incuber 48h. Elles ont ensuite été décollées à la trypsine, comptées et 1,5x10⁴ cellules ont été ensemencées dans chaque puits de la plaque fournit par le fabricant. Apres 24h d'incubation les plaques ont été insérées dans l'automate. Tous les kits utilisés ont été fournis par Seahorse Bioscience et ont été mis en œuvre suivant les protocoles du fabricant.

Oligonucléotide	Séquence	animal	
β-actin F	CAGATGTCGATCAGCAAGCAGGAG	NAME OF THE OWNER OW	
β-actin R	TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAGCA	Mus musculus	
ALDOC F	LDOC F GCCCGCTATGCCAGCATCT		
ALDOC R	AGCCAGGACCTTCTCTGTAA	Mus musculus	
c-MYC F	AGACCTGAGCGCCGCCC	Mus mussulus	
c-MYC R	GAGGACTCCGTGGAGGAGA	Mus musculus	
ENO1 F	AGTACGGGAAGGACGCCACCA	Mus musculus	
ENO1 R	GCAGCCACATCCATGCCGAT	Mus musculus	
GAPDF	CCTCAACTACATGGTCTACA	Advis mavisaviliti	
GAPDR	CTCCTGGAAGATGGTGAT	Mus musculus	
GPI F	CCTGTCTACGAACACGGCCAA	Mus mussili	
GPI R	TACCCAATCCCAGAACTC	Mus musculus	
HK2 F	GGGCATGAAGGGCGTGTCCC	WALKER DOLLARD STREET	
HK2 R	TCTTCACCCTCGCAGCCGGA	Mus musculus	
PGK1 F	GAAGCGGGTCGTGATGAG	Mus musculus	
PGK1 R	GCCTTGATCCTTTGGTTGTT	- IVIUS IIIUSCUIUS	
PKM2 F	CCACTTGCAGCTATTCGAGGAA	Mars mars and the	
PKM2 R	GTGAGCACTCCTGCCAGACT	Mus musculus	
TPI1 F	TPI1 F GATCATTTATGGAGGTTCTG		
TPI1 R	ATTGATGATGTCCACAAATT	Mus musculus	

Tableau 8 - Liste des oligonucléotides utilisées.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide de l'application en ligne biostaTGV (http://biostatgv.sentiweb.fr). Pour de comparer deux groupes nous avons utilisé le test de Student, lorsque nous avons comparé plus de deux groupes dans une même analyse nous avons utilisé le test de Mann-Whitney. Les données sont représentées par leur moyenne +/- erreur type.

Les données de survie sont représentées suivant la méthode de Kaplan-Meier et la significativité des résultats et calculée à l'aide du test du Log-Rank.

Transcriptomique : Nous utilisons la matrice complète des gènes et de leurs expressions et soumettons l'ensemble de ces données à l'algorithme GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Il identifie les groupes fonctionnels de gènes dont la différence d'expression est due uniquement aux caractères d'intérêts et leurs attribue un score d'enrichissement. Seuls les groupes enrichis avec un taux de fausses découvertes inférieur à 5% ont été retenus. Les données d'expression sont centrées réduites et visualisées par une analyse en composante principale.

Une valeur de P < 0.05 est considérée comme statistiquement significative.

Troisième partie : Résultats

1 L'activation de la voie c-Myc est réduite dans les CHCs de souris transgéniques MYC/REG3A-TG.

Au cours de ce travail, notre objectif était d'étudier l'influence de REG3A sur la carcinogenèse hépatique à l'aide de différents modèles expérimentaux. Nous avons tout d'abord analysé le développement spontané de tumeurs dans une lignée murine transgénique exprimant la protéine REG3A humaine dans les hépatocytes (REG3A-TG, n=58) et une lignée de souris contrôles de même fond génétique C57BL/6 (WT, n=53) âgés de 24 mois et vivant dans les même conditions d'hébergement. Globalement, peu de cancers spontanés ont été relevés sur ce fond génétique que ce soit chez les souris WT ou chez les souris transgéniques : 1/58 souris REG3A-TG a développé un CHC comparé à 5/53 souris WT qui ont développées des tumeurs de type CHC (n=3), lymphome (n=1) et sarcome (n=1). Nous avons par la suite étudié l'action de REG3A dans un modèle murin de carcinogenèse génétique exprimant l'oncogène c-Myc dans les hépatocytes (MYC-TG) (Etiemble *et al.*, 1994) et avons généré une lignée transgénique doublement homozygote pour c-Myc et REG3A (MYC/REG3A-TG).

Nous avons étudié les profils moléculaires de foies précancéreux et cancéreux en analysant les transcriptomes de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG. Les profils d'expression de gènes ont été obtenus par l'analyse d'échantillons d'ARN tumoraux et non-tumoraux collectés à différents temps sur une période de 18 mois.

Nous avons mené une analyse comparative entre les transcriptomes murins obtenus et les transcriptomes humains correspondant aux trois groupes S1, S2 et S3 décrits dans la classification moléculaire proposée par Hoshida *et al.* (Introduction : chapitre 1.4.4, page 49). Les tumeurs humaines caractérisées par une activation de la voie MYC sont connues pour être concentrées dans le groupe S2. Nous confirmons par une analyse fonctionnelle que l'identité moléculaire de CHCs développés chez les souris MYC-TG est proche de celle de CHCs humains activées par c-MYC. Les signatures transcriptionelles spécifiques des sous-groupes moléculaires prolifératifs S1 et c-MYC-activé S2, sont enrichies dans les tumeurs hépatiques de souris MYC-TG mais pas celle du sous-groupe S3, non-prolifératif et muté β-caténine. Le profil moléculaire des tumeurs de souris MYC/REG3A-TG recoupe celui du sous-groupe S3 de la classification de Hoshida *et al.*, groupe incluant les CHCs humains mutés pour le gène CTNNB1 et exprimant fortement REG3A (Figure 42).

Nous montrons également qu'un ensemble de gènes cibles de c-MYC identifiés expérimentalement par Zeller *et al.* est significativement enrichi dans les tumeurs de souris MYC-TG mais non dans les tumeurs de souris MYC/REG3A-TG (Zeller *et al.*, 2006).

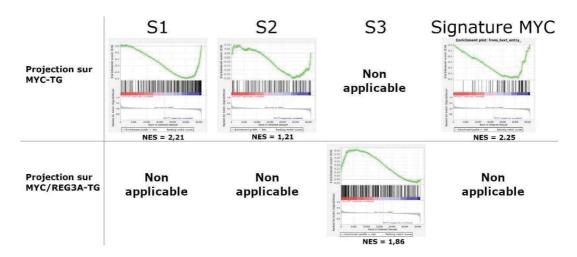


Figure 42 - Analyses d'enrichissement moléculaire de CHCs de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG. Les gènes spécifiques des sous-classes moléculaires S1-S3 (Hoshida et al., 2010) et une liste de 86 gènes cibles de c-MYC (Zeller et al., 2006) ont été utilisés pour réaliser ces analyses. Score NES (Normalized Enrichment Score)

Dans le but de mieux caractériser les CHCs exprimant REG3A chez l'Homme, nous avons stratifié les 371 CHCs humains de la cohorte TCGA en fonction de leur niveau d'expression de REG3A hépatique et comparé le profil d'expression des tumeurs exprimant fortement REG3A (premier quartile) à celui des tumeurs n'exprimant pas ou faiblement REG3A (troisième et quatrième quartile). Nous avons généré une signature de 100 gènes humains spécifiques du sous-groupe exprimant fortement REG3A, ceux-ci sont caractéristiques de plusieurs voies de signalisation hépatocytaire, en particulier des voies de transport et de métabolisme (Figure 43). Cette signature est spécifiquement enrichie dans les tumeurs de souris MYC/REG3A-TG (Figure 44).

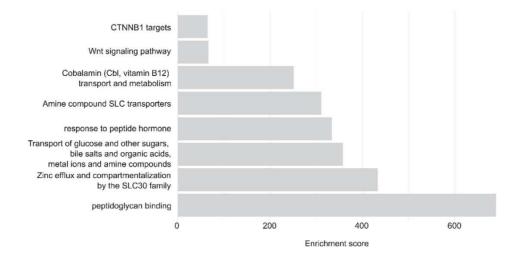


Figure 43 - Enrichissement de voies de signalisation du Top 100 gènes surexprimés dans les CHCs humains du TCGA exprimant fortement REG3A

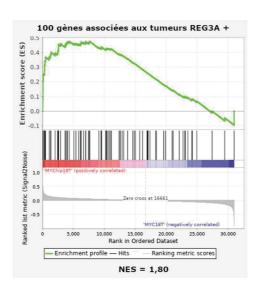


Figure 44 - Représentation graphique de l'enrichissement d'expression et score NES (Normalized Enrichment Score) du Top 100 gènes dans les tumeurs exprimant fortement REG3A.

Nous avons ensuite comparé entre eux les transcriptomes tumoraux issus des lignées MYC-TG et MYC/REG3A-TG et identifié les voies de signalisation préférentiellement activées dans chaque lignée (Figure 45). Les tumeurs de la lignée MYC-TG sur-expriment les voies de signalisation liées au cycle cellulaire, en particulier des cibles de c-MYC, des cibles de E2F, de P53 et du checkpoint G2M. Les tumeurs de la lignée MYC/REG3A-TG expriment préférentiellement la voie WNT/β-caténine ainsi que des voies caractéristiques d'une activité hépatocytaire physiologique : le métabolisme des acides biliaires, des acides gras et des xénobiotiques.

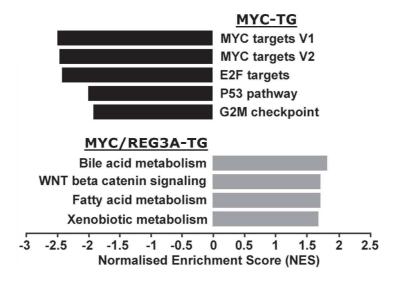


Figure 45 - Représentation graphique de l'enrichissement d'expression des principales voies de signalisation modulées dans les CHCs développées chez des souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG. Voies de signalisation issues de la base de donnée KEGG. NES : Normalized Enrichment Score.

Au total, ces résultats montrent que les CHCs issus des souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG présentent une activité transcriptionnelle similaires aux CHCs humains des sous-classes moléculaires prolifératives S1 / c-MYC-activé S2 et non-proliférative S3, respectivement. En particulier, l'expression de nombreux gènes cibles de l'oncogène c-Myc est réduite dans les CHCs issues des animaux MYC/REG3A-TG que dans celles des animaux MYC-TG.

2 REG3A ralentit le développement du carcinome hépatocellulaire chez la souris transgénique Myc-REG3A.

La mesure au cours du temps du rapport poids du foie / poids de l'animal (LW/BW) montre une croissance nette de ce ratio chez les souris MYC-TG : il est de 11,8%±1,3, 13,9%±1,7 et 17,8%±3,0 à 9, 12 et 18 mois, respectivement. Chez les souris MYC/REG3A-TG, ce ratio croit plus faiblement et atteint aux mêmes âges les valeurs de 7,2%±0,9, 8,7%±1,2 et 9,1%±1,0. Le ratio LW/BW murin normal est aux environs de 4 à 5%, valeur retrouvée chez tous les animaux âgés de 3 et 6 mois. Ce ratio double chez les animaux MYC/REG3A-TG pour se stabiliser autour de 10% alors qu'il augmente jusqu'à approcher 20% chez les animaux MYC-TG (Figure 46).

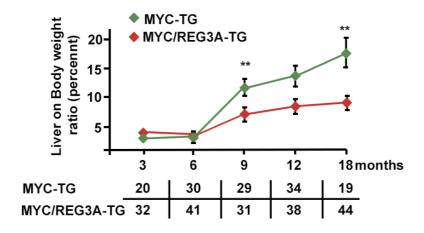


Figure 46 - Évolution du ratio poids du foie / poids de l'animal (LW/BW) au cours du temps. *P<0.05, **P<0.01

Les premières tumeurs visibles macroscopiquement ont été détectées chez des animaux MYC-TG et MYC/REG3A-TG âgés de 6 mois. Le nombre d'animaux qui présentaient au moins une tumeur maligne a augmenté progressivement au cours des 18 mois d'observation atteignant 40% puis 82% des souris MYC-TG et seulement 13% puis 42% des souris MYC/REG3A-TG à 6 et 9 mois, respectivement (Figure 47). Cette

différence disparait aux temps très tardifs. Un exemple représentatif des tumeurs observées est présenté sur la Figure 48.

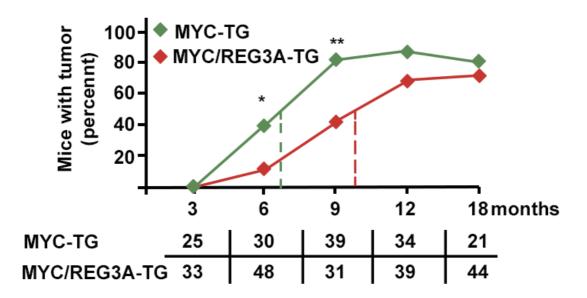


Figure 47 - Évolution du pourcentage d'animaux ayant développé une tumeur maligne du foie au cours du temps. *P<0.05, **P<0.01

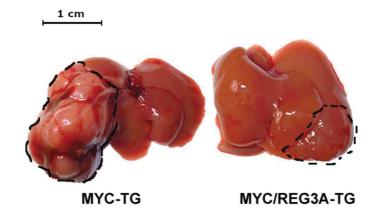


Figure 48 - Photographie macroscopique représentative de tumeurs du foie développées chez des animaux MYC-TG et MYC/REG3A-TG âgés de 9 mois.

Nous notons également que les diamètres cumulés des nodules tumoraux sont moins importants chez les souris MYC/REG3A-TG que les souris MYC-TG à 18 mois (Figure 49), ce qui est cohérent avec le nombre réduit ($n=2,7\pm0,3$) de nodules tumoraux présents par animal MYC/REG3A-TG comparé aux animaux MYC-TG ($n=4,5\pm0,7$) à cet âge. Ce phénotype tumoral est associé à une meilleure survie des animaux MYC/REG3A-TG comparativement aux animaux MYC-TG (Figure 50).

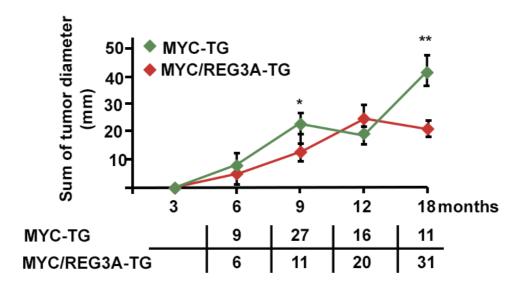


Figure 49 - Évolution du diamètre tumoral cumulé au cours de la maladie cancéreuse. *P<0.05, **P<0.01

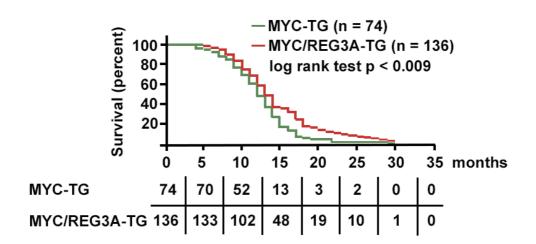


Figure 50 - Graphique de survie de Kaplan-Meyer de souris transgéniques c-Myc (MYC-TG) et de souris transgéniques c-Myc et REG3A (MYC/REG3A-TG).

Les analyses d'index de prolifération (marquage KI-67, expression de cyclines et d'inhibiteurs de CDK, p21 et p27), d'apoptose (caspase 3 clivée) et de dommages de l'ADN (marquage γ H2AX) n'ont pas montré de différence entre échantillons de foie provenant de souris MYC-TG ou MYC/REG3A-TG (Figure 51 et Figure 52).

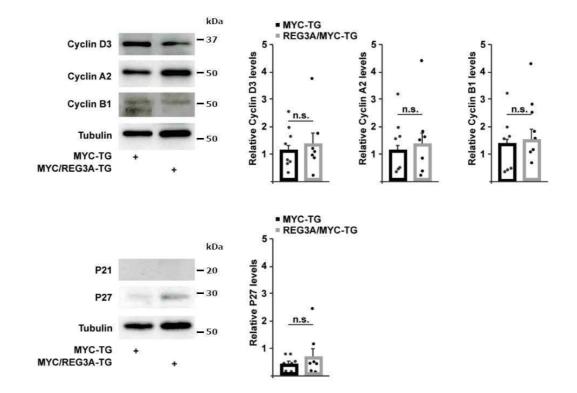


Figure 51 - Gauche : Immunoblots anti-cyclines D3, A2, B1 et p21, p27. Droite : Quantification par densitométrie. Chaque point correspond à une souris. ns : non significatif.

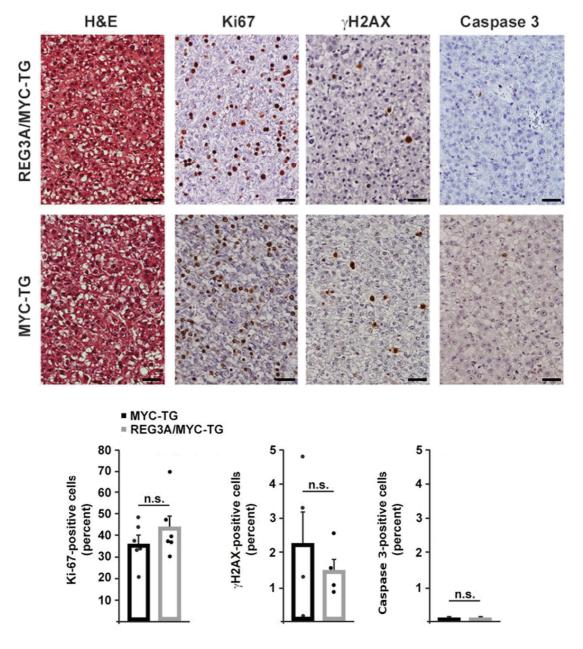


Figure 52 - Analyse de la prolifération, de l'apoptose et des dommages de l'ADN dans des échantillons de foie tumoral de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG après coloration à l'hématoxyline-éosine (H&E) et immunohistochimiques avec les anticorps Ki-67, γ-H2AX et Caspase 3. Barre d'échelle : 200μm. Chaque point correspond à une souris. ns : non significatif.

Au total, nous montrons que le nombre et le volume des tumeurs des animaux MYC/REG3A-TG sont moins important que ceux des animaux MYC/REG3A-TG. L'analyse des échantillons tumoraux ne montre pas de différence d'index de prolifération ni de mort cellulaire suggérant un effet de REG3A sur l'initiation de la carcinogénèse du foie et non pas sur la progression tumorale, dans ce modèle expérimental.

3 Les niveaux nucléaires de c-Myc sont réduits dans les CHCs de souris transgénique MYC/REG3A-TG.

Nous nous sommes demandé si la réduction tumorale associée à REG3A était liée à des variations de la régulation de c-Myc aux niveaux transcriptionnel et protéique. La mesure par qPCR du niveau de l'ARN messager c-MYC a montré que, bien qu'augmenté dans les échantillons de foie tumoraux comparativement aux foies sains et non-tumoraux appariés, ce niveau était du même ordre de grandeur dans les foies de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG à tous les temps analysés (Figure 53).

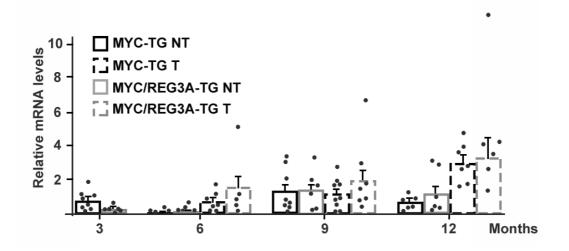


Figure 53 - Quantification par qPCR de l'expression de l'ARN messager c-Myc dans des échantillons de foie tumoral (T) et non-tumoral (NT) provenant de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG aux différents temps indiqués. Chaque point correspond à une souris.

Concernant la protéine c-Myc, elle est, comme attendue, très faiblement détectée dans les foies sains. En contexte tumoral, son expression est fortement augmentée dans les échantillons tumoraux comparés aux échantillons non-tumoraux appariés. Mais aucune différence d'expression n'a été relevée dans les extraits globaux, préparés à partir d'échantillons de foie de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG (Figure 54 et Figure 55).

Cependant, des analyses d'expression après fractionnement subcellulaire ont révélé des taux substantiellement plus élevés de protéine c-Myc dans les fractions hépatiques nucléaires d'échantillons tumoraux de souris MYC-TG que dans celles de souris MYC/REG3A-TG (Figure 56 et Figure 57). Nous notons également que le pool de protéine c-Myc phosphorylée sur le résidu Thr58 est plus important dans les échantillons tumoraux de souris MYC/REG3A-TG que de souris MYC-TG. Cette modification post-traductionnelle conduisant à la protéolyse de c-Myc par le

protéasome (Figure 31), ce résultat suggère un rôle possible de REG3A dans les mécanismes de régulation de la stabilité de c-Myc. Aucune différence d'expression de c-Myc totale et phosphorylée sur la Thr58 n'est retrouvée dans les fractions tumorales cytoplasmiques quelle que soit la lignée murine étudiée. Nous n'avons pas non plus observé de différence significative d'expression de ces protéines, expression par ailleurs faible et essentiellement nucléaire, dans les parties non-tumorales adjacentes aux tumeurs ni dans les échantillons de tissus sains ou pré-néoplasiques où l'expression de c-Myc est essentiellement cytoplasmique (Figure 58).

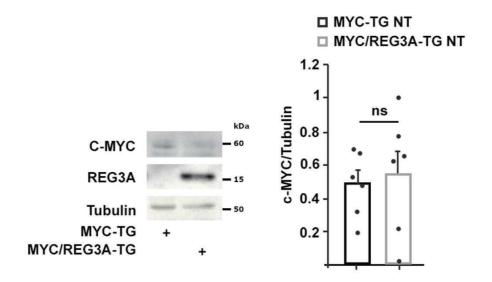


Figure 54 - Quantification d'immunoblots de l'expression des protéines c-Myc et REG3A dans des échantillons de foie non-tumoral (NT) provenant de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG âgées de 6 mois. Chaque point correspond à une souris. ns : non significatif.

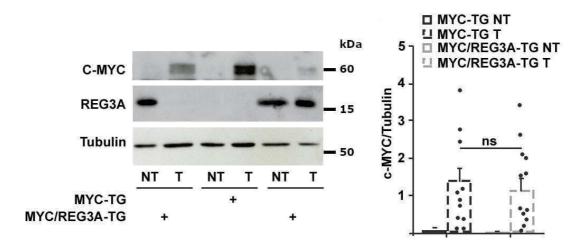


Figure 55 - Quantification d'immunoblots de l'expression des protéines indiquées dans des échantillons de foie tumoral (T) et non-tumoral (NT) provenant de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG âgées de 12 mois. Chaque point correspond à une souris. ns : non significatif.

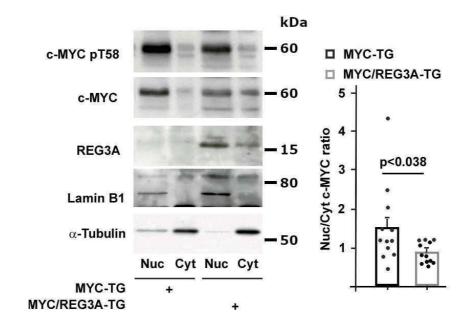


Figure 56 - Immunoblots détectant les protéines indiquées dans des fractions tumorales nucléaires (Nuc) et cytoplasmiques (Cyt) à 12 mois. Droite : Quantification par densitométrie. Chaque point correspond à une souris.

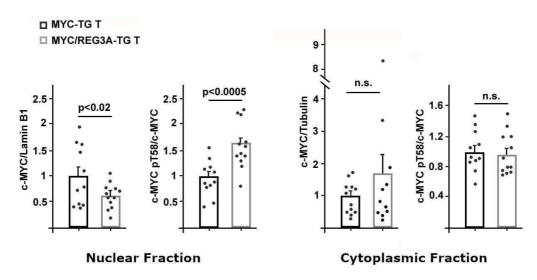


Figure 57 - Quantification par densitométrie d'immunoblots détectant les protéines C-Myc totale et phosphorylée sur la thréonine 58 dans des fractions tumorales nucléaires et cytoplasmiques à 12 mois. Chaque point correspond à une souris. ns : non significatif. (Exemples d'immunoblots sur la Figure 56).

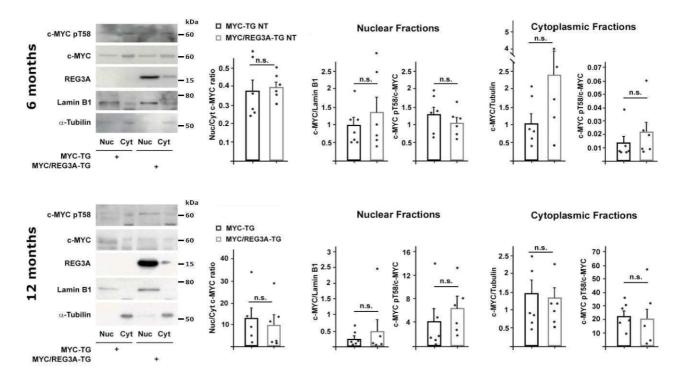


Figure 58 -Immunoblots détectant les protéines indiquées dans des fractions nucléaires (Nuc) et cytoplasmiques (Cyt) provenant d'échantillons de foie sain (6 mois) et non-tumoral (12 mois). Droite : Quantification par densitométrie. Chaque point correspond à une souris. ns : non significatif.

Comme mentionné précédemment, les modifications post-traductionnelles qui régulent la stabilité de c-MYC comprennent la phosphorylation et la O-GlcNAcylation. Les kinases ERK1 et GSK3β étant connues pour être impliquées dans la phosphorylation respective des résidus Ser62, entrainant la stabilisation de c-MYC, et Thr58 signalant sa dégradation, nous avons analysé leurs niveaux d'expression et d'activation dans des échantillons de foie non tumoral et tumoral. Nous n'observons aucune différence d'expression ni d'activation des kinases ERK1 et GSK3β dans les échantillons tumoraux de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG. Ceci indique que ces régulateurs de la stabilité de MYC ne semblent pas impliqués dans la régulation négative de MYC par REG3A (Figure 59).

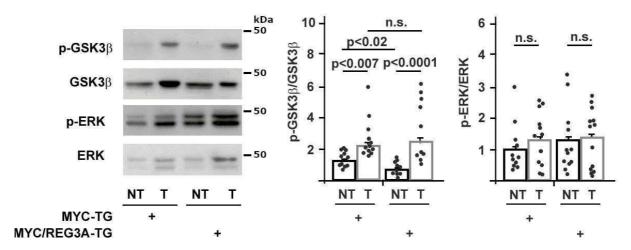


Figure 59 - Quantification par densitométrie d'immunoblots détectant les protéines indiquées dans des échantillons de foie non-tumoral (NT) et tumoral (T) d'animaux MYC-TG et MYC/REG3A-TG à 12 mois. Chaque point correspond à une souris. ns : non significatif.

4 Les foies prénéoplasiques et tumoraux de souris MYC/REG3A-TG présentent une réduction de la O-GlcNAcylation des protéines.

La phosphorylation de c-Myc sur la Thr58 est mutuellement exclusive de la O-GlcNAcylation. Cette dernière favorisant la stabilité de la protéine MYC, nous avons émis l'hypothèse que l'augmentation de la protéine c-Myc phosphorylée sur Thr58 dans les tumeurs des souris MYC/REG3A-TG pouvait être associée à une diminution de la O-GlcNAcylation.

A l'heure actuelle, des raisons techniques nous ont empêché de détecter la forme O-GlcNAcylée de c-Myc. Nous avons voulu contourner cette difficulté en mesurant le niveau global de O-GlcNAcylation des protéines dans un ensemble d'échantillons de foie sain, pré-néoplasique et tumoral. Nous montrons que les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines augmentent significativement au cours de la carcinogenèse induite par c-Myc, et que ce niveau est sensiblement le même dans les parties tumorales et les parties adjacentes non-tumorales de foie de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG âgées de 12 mois. De manière intéressante, nous observons à 6 mois une diminution significative de 47% de la O-GlcNAcylation globale des protéines dans les échantillons de foie pré-néoplasique de souris MYC/REG3A-TG comparé à celui de souris MYC-TG. Une tendance à la baisse de 50% est aussi observée chez les souris REG3A-TG comparativement aux souris sauvages (Figure 60).

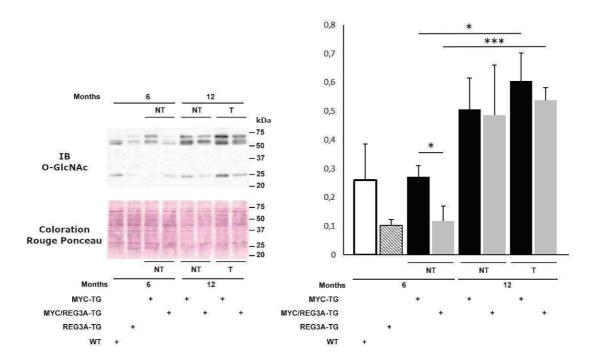


Figure 60 - Niveau global des protéines O-GlcNAcylées dans des échantillons de foie sain (WT, REG3A-TG), pré-néoplasique (MYC-TG, MYC/REG3A-TG, 6 mois) et tumoral (MYC-TG, MYC/REG3A-TG, 12 mois). Gauche : immunoblot (IB) pour O-GlcNAc. Coloration au rouge Ponceau pour la normalisation des Western blots. Droite : Quantification par densitométrie. NT : non tumoral ; T : tumoral. *P<0.05, ***P<0.001.

Après fractionnement subcellulaire, nous observons une nette réduction de la O-GlcNAcylation des protéines dans les fractions nucléaires de foies pré-néoplasiques (6 et 12 mois) et néoplasiques (12 mois) des animaux MYC/REG3A-TG comparé aux animaux MYC-TG (Figure 61). Cette réduction est de 72% dans les foies pré-néoplasiques (n=6, p<0.005), de 60% dans les tissus non-tumoraux adjacents à la tumeur (n=6, p<0.05) et de 19% dans les tissus tumoraux appariés (n=12, p=0.026). Une réduction d'environ 40% des protéines O-GlcNAcylées est également retrouvée dans les fractions cytoplasmiques de foies pré-néoplasiques chez des souris MYC/REG3A-TG comparé à des souris MYC-TG âgées de 6 et 12 mois. En revanche, aucune différence des niveaux de O-GlcNAcylation n'a été observée entre les fractions cytoplasmiques tumorales de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG. Ces résultats indiquent que le retard de l'apparition et du développement des tumeurs induit par REG3A est associé à une franche diminution de la O-GlcNAcylation globale des protéines dans ce modèle expérimental de CHC induit par c-Myc.

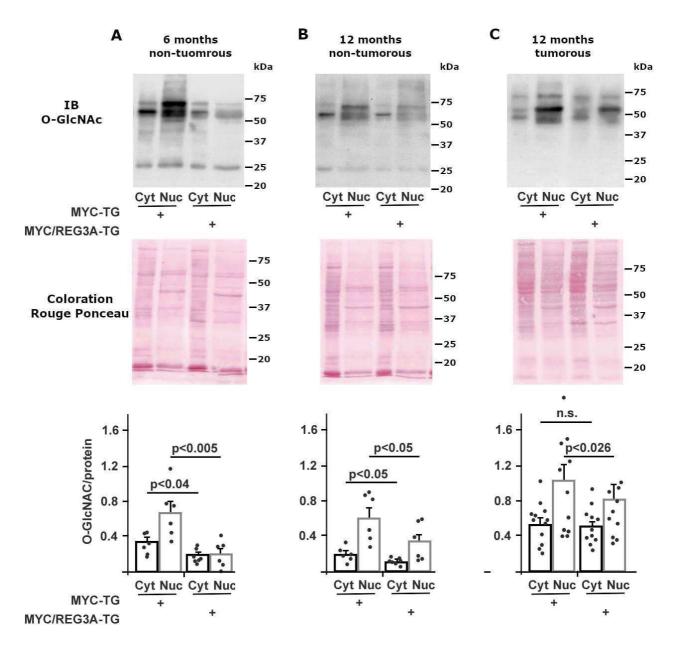


Figure 61 - Niveau des protéines O-GlcNAcylées nucléaires (Nuc) et cytoplasmiques (Cyt) dans des échantillons de foie pré-néoplasique (6 mois) et tumoral (12 mois). Haut : immunoblot (IB) pour O-GlcNAc. Milieu : Coloration au rouge Ponceau pour la normalisation des Western blots. Bas : Quantification par densitométrie. NT : non tumoral ; T : tumoral. Chaque point correspond à une souris. ns : non significatif.

5 La surexpression hépatique de REG3A retarde le développement de tumeurs du foie et est associée à une réduction de la O-GlcNAcylation dans le modèle DEN.

Nous avons établi un deuxième modèle de carcinogenèse hépatique chimioinduit et étudié les effets de REG3A sur la croissance tumorale et la O-GlcNAcylation des protéines hépatiques chez des souris sauvages C57BL/6 (n=75; WT) et des souris transgéniques REG3A (n=73 ; REG3A-TG) ayant reçu à l'âge de 14 jours une injection unique de 10µg/g de l'agent alkylant diéthylnitrosamine (DEN). Cette méthode provoque le développement d'un CHC de manière reproductible chez plus de 80% des souris sauvages à 9 mois (Teoh et al., 2008). Neuf à seize souris de chaque génotype injectées de DEN ont été examinées tous les mois pendant 9 mois afin de détecter la présence de tumeurs hépatiques. À 5 mois, ces tumeurs étaient macroscopiquement et histologiquement observables chez 40% des souris sauvages (Figure 62 - A, B) alors qu'aucune des souris REG3A-TG ne développaient de nodules hépatiques (p: 0,043). Une tendance à la baisse, bien qu'elle ne soit pas statistiquement significative, a également été observée à l'âge de 6 mois. A ce temps d'analyse, la taille des nodules tumoraux était millimétrique chez les animaux REG3A-TG et centimétrique chez les souris sauvages (Figure 62 - D). Ces résultats montrent que la surexpression hépatique de REG3A dans un contexte de carcinogenèse chimique provoque un retard au développement des tumeurs du foie.

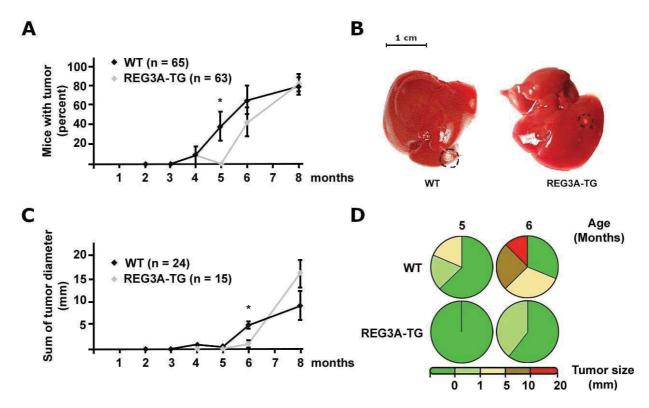


Figure 62 - Cinétique du développement tumoral hépatique dans le modèle chimio-induit par le DEN chez des souris sauvages (WT) et transgéniques REG3A (REG3A-TG). A) Évolution du pourcentage d'animaux présentant une tumeur hépatique. B) Photographie macroscopique représentative de tumeurs du foie. Chez des animaux âgés de 6 mois. C-D) Évolution du diamètre tumoral cumulé. WT : sauvage ; REG3A-TG : souris transgéniques pour REG3A.

*P<0.05.

Après fractionnement subcellulaire, nous montrons que les fractions nucléaires des foies de souris REG3A-TG âgées de 6 mois présentaient une nette réduction de la O-GlcNAcylation des protéines comparée à celle des souris sauvages (Figure 63). Aucune différence de niveau de O-GlcNAcylation n'a été observée dans les fractions cytoplasmiques. Ces résultats combinés à ceux obtenus dans le modèle c-Myc renforcent l'hypothèse d'une régulation négative de la voie des O-GlcNAc par REG3A ce qui aurait pour conséquence de réduire le développement tumoral du CHC.

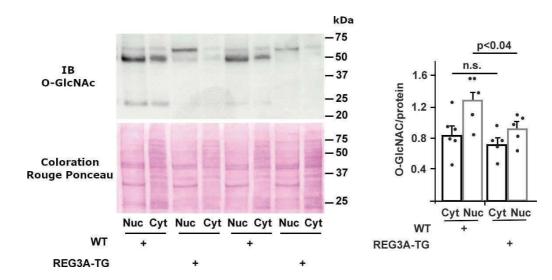


Figure 63 - Immunoblot du taux de O-GlcNAcylation des protéines dans des fractions nucléaires (Nuc) et cytoplasmiques (Cyt) provenant d'échantillons de foie de souris sauvages (WT) et transgéniques REG3A (REG3A-TG) âgées de 6 mois exposées au DEN. Coloration au rouge Ponceau pour la normalisation des Western blots. Droite : Quantification par densitométrie. Chaque point correspond à une souris. Chaque point correspond à une souris. ns : non significatif.

6 REG3A réduit la O-GlcNAcylation des protéines.

Pour avancer dans la compréhension des mécanismes de régulation de la O-GlcNAcylation des protéines par REG3A, nous avons exprimé REG3A par transfection dans la lignée cancéreuse dérivée de CHC humain HuH7 (Figure 64) et étudié l'expression de MYC et les niveaux des protéines O-GlcNAcylées. Nous observons que REG3A est significativement exprimé après un délai de 48h après la transfection. Nous avons conservé ce délai dans l'ensemble des études *in vitro* que nous vous présentons dans ce mémoire.

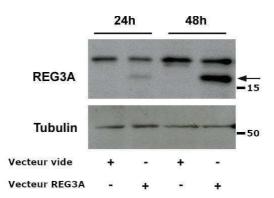


Figure 64 -Immunoblot anti-REG3A à 24 et 48h après transfection dans des cellules HuH7.

Nous montrons qu'il n'y a aucune différence d'expression de l'ARN c-MYC endogène dans les cellules HuH7, qu'elles expriment ou non REG3A 48h après transfection (Figure 65). En revanche, nous observons une réduction significative du taux endogène de protéine c-MYC total associée à une augmentation du taux de protéine c-MYC phosphorylé sur la Thr58 dans la fraction nucléaire de cellules exprimant REG3A comparé aux cellules contrôles (Figure 66). La co-transfection de REG3A et de c-MYC réduit également le taux nucléaire de protéine c-MYC total exogène dans les cellules HuH7 (Figure 67). Aucune différence de niveau d'expression de c-MYC total et phosphorylé endogène ou exogène n'est observée dans les fractions cytoplasmiques des cellules, qu'elles expriment ou non REG3A. Pour déterminer si cet effet de REG3A sur l'expression de MYC est médié par une action autocrine de la protéine, nous avons stimulé les cellules HuH7 avec 1µg de protéine recombinante humaine REG3A puis mesuré le taux de la protéine c-MYC total. Nous montrons que ce dernier reste similaire que les cellules aient été incubées avec de la protéine REG3A ou le tampon contrôle (Figure 68). Ce résultat montre que l'effet observé sur les niveaux de c-MYC est dû à l'action de la protéine REG3A intracellulaire.

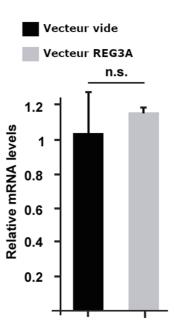
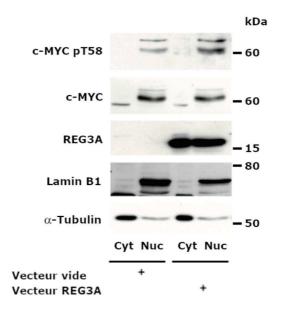


Figure 65 - Quantification par qPCR de l'expression de l'ARN C-Myc dans des cellules HuH7 exprimant ou non REG3A. ns : non significatif.



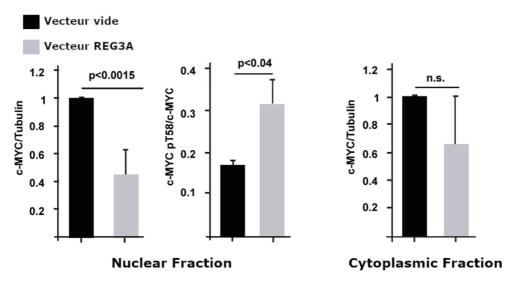


Figure 66 -Immunoblots détectant l'expression des protéines indiquées dans les fractions nucléaires (Nuc) et cytoplasmiques (Cyt) de cellules HuH7 exprimant ou non REG3A. Bas : Quantification par densitométrie des protéines C-Myc total et phosphorylé sur la Thr58. ns : non significatif.

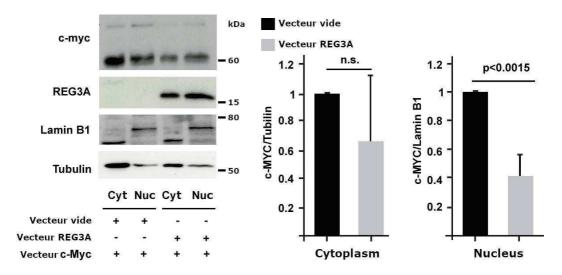


Figure 67 - Immunoblots détectant l'expression des protéines indiquées dans les fractions nucléaires (Nuc) et cytoplasmiques (Cyt) de cellules HuH7 co-exprimant ou non REG3A et c-MYC. Droite : Quantification par densitométrie de la protéine C-Myc total. ns : non significatif.

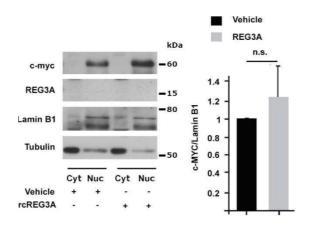


Figure 68 -Immunoblots détectant l'expression des protéines indiquées dans les fractions nucléaires (Nuc) et cytoplasmiques (Cyt) de cellules HuH7 incubées ou non avec une protéine recombinante humaine REG3A.

Les niveaux d'expression et d'activation des kinases ERK1 et GSK3β n'ont pas été retrouvés modulés de manière différente dans les cellules HuH7 exprimant REG3A et dans les cellules contrôles (Figure 69). Les cellules HuH7 exprimant REG3A présentaient une diminution significative de 20% de la O-GlcNAcylation des protéines (p<0.002) 48h après transfection supportant l'idée que REG3A est impliqué dans la réduction de la O-GlcNAcylation (Figure 70). L'expression de REG3A est associée à une diminution de la prolifération cellulaire (Figure 71 A) contrairement à l'ajout de protéine recombinante REG3A qui est sans effet sur la prolifération cellulaire (Figure 71 B).

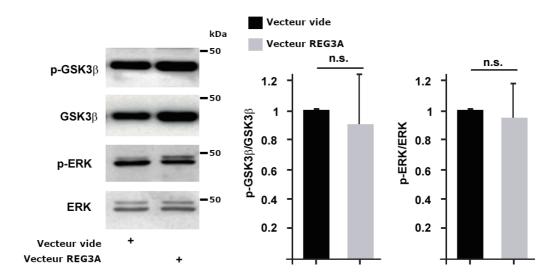


Figure 69 -Immunoblots détectant les protéines indiquées dans des cellules HuH7 exprimant ou non REG3A. Droite : Quantification par densitométrie. ns : non significatif.

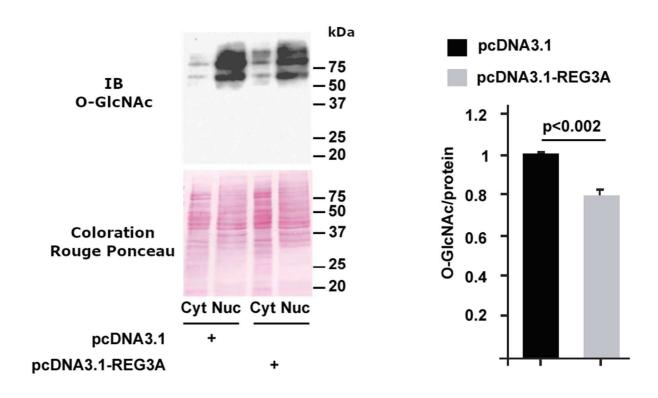


Figure 70 -Immunoblot évaluant les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines cytoplasmiques (Cyt) et nucléaires (Nuc) dans des cellules HuH7 exprimant ou non le vecteur REG3A.

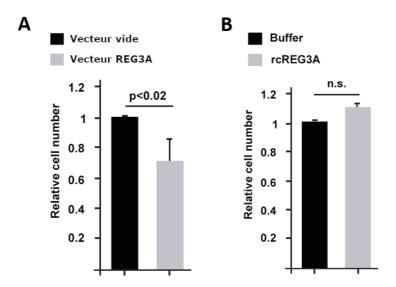


Figure 71 - Index de prolifération au cristal violet A) Dans des cellules HuH7 exprimant le vecteur REG3A ou non. B) Dans des cellules HuH7 incubées avec de la protéine recombinante humaine REG3A ou le tampon contrôle. Ns : non significatif.

Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent que la O-GlcNAcylation des protéines hépatiques est réduite dans les cellules et les tissus exprimant REG3A et que cet effet est associé à une diminution de la prolifération cellulaire *in vitro* et une importante réduction tumorale dans deux modèles expérimentaux de carcinogenèse génétique et chimio-induite. Dans le modèle génétique, nous faisons l'hypothèse que REG3A favoriserait la dégradation de l'oncogène c-Myc via une réduction de sa O-GlcNAcylation qu'il reste à démontrer.

7 REG3A n'interagit pas avec l'UDP-GlcNAc ni avec les protéines O-GlcNAcylées.

La question que nous avons par la suite abordée était de comprendre comment REG3A régule la O-GlcNAcylation des protéines. Celle-ci dépend de deux enzymes l'OGT et l'OGA et de la quantité de substrat disponible, l'UDP-GlcNAc. Nous avons mesuré les niveaux de ces enzymes dans des échantillons de foie sain (souris âgées de 6 mois) et tumoral (paires appariées tumeur et non-tumeur de souris âgées de 12 mois). Nous n'avons pas trouvé de différence significative de l'expression de l'ARN et de la protéine OGT entre souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG (Figure 72 et Figure 73). Concernant l'OGA, nous n'avons pas été jusqu'à présent en mesure de détecter l'ARN et la protéine OGA. Ces analyses sont actuellement en cours avec l'utilisation d'autres amorces PCR et d'autres anticorps spécifiques.

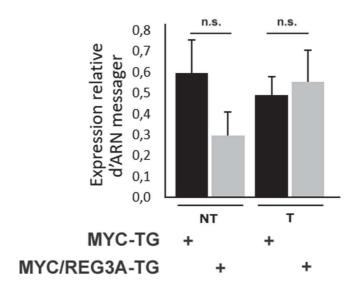


Figure 72 - Niveau d'expression de l'ARNm OGT dans des échantillons de foie nontumoraux (NT) et tumoraux (T). ns : non significatif.

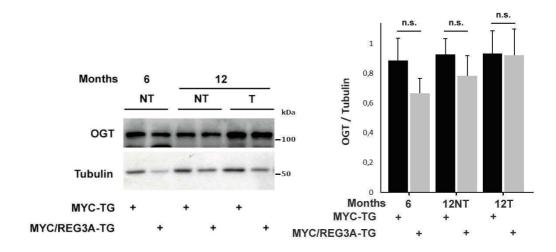


Figure 73 - Quantification par immunoblot du niveau de la protéine OGT dans des échantillons de foie non-tumoraux (NT) et tumoraux (T) d'animaux âgés de 6 et 12 mois. ns : non significatif.

Parallèlement, nous avons étudié la fonction lectine de REG3A en analysant sa capacité à reconnaitre différents sucres, dont l'UDP-GlcNAc. L'hypothèse ici étant qu'une éventuelle titration de l'UDP-GlcNAc par la lectine REG3A contribuerait à la diminution globale des protéines O-GlcNAcylées. L'analyse par slot-blot a révélé l'activité attendue lectine de REG3A qui reconnait le sucrose (disaccharide formé de fructose et de glucose) mais pas les monomères de glucose ou de fructose et reconnait également le mannane mais pas le monomère de mannose. Cette analyse montre que REG3A ne reconnait pas le GlcNAc ni l'UDP-GlcNAc (Figure 74).

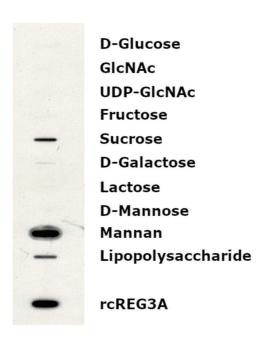


Figure 74 - Analyse en slot blot de l'interaction de la protéine REG3A avec différents sucres. GlcNAc : N-acétyl-D-glucosamine ; rcREG3A : Protéine recombinante REG3A.

Nous avons ensuite étudié la capacité de REG3A à reconnaitre le monomère de GlcNAc lié aux protéines cellulaires. Nous avons séparé sur gel électrophorétique des extraits protéiques provenant de foie tumoral de souris MYC-TG puis, après transfert sur membranes de nitrocellulose, incubé celles-ci avec la protéine recombinante REG3A ou son tampon de formulation. La fixation de REG3A sur des cibles protéiques O-GlcNAcylées a été révélé par immunoblot en utilisant un anticorps spécifique de REG3A. Le profil des bandes détectées par l'anticorps anti-REG3A est très différent de celui détecté par les anticorps anti-O-GlcNAc et présenté précédemment (voir Figure 60). Nous montrons que REG3A semble ne pas interagir avec les protéines O-GlcNAcylées dont les poids moléculaires sont habituellement aux environs de 50-80 kDa (Figure 75). Les seules protéines reconnues sont de bas poids moléculaire (16-20 kDa) et pourraient correspondre aux protéines endogènes de la famille REG3.

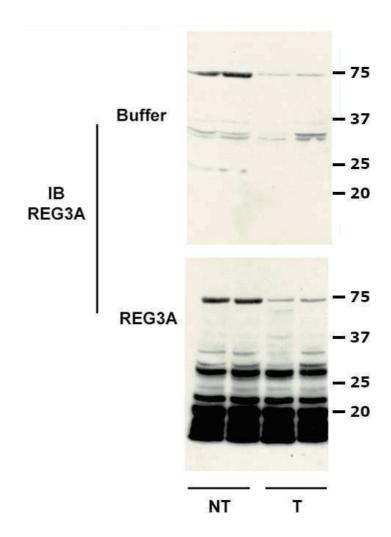


Figure 75 - Immunoblot (IB) anti-REG3A pour l'étude de l'interaction de REG3A avec les protéines O-GlcNAcylées dans des échantillons de foie non-tumoral (NT) et tumoral (T) de souris MYC.

Ce résultat négatif est confirmé par une autre série d'expériences où nous montrons que les protéines immunoprécipitées avec un anticorps anti-REG3A ne sont pas des protéines O-GlcNAcylées (Figure 76).

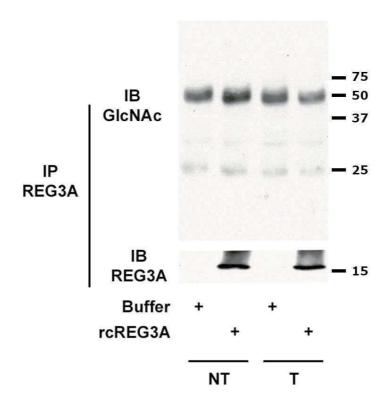


Figure 76 - Analyse de l'interaction potentielle de REG3A avec des protéines O-GlcNAcylées. Les protéines extraites d'échantillons de foie non tumoral et tumoral de souris MYC ont été immunoprécipitées avec un anticorps anti-REG3A puis détectées par immunoblot (IB) avec des anticorps anti-O-GlcNAc (Haut) et anti-REG3A (Bas). A noter que les seules bandes détectées dans l'IB anti-O-GlcNAc correspondent à des immunoglobulines.

Pris dans leur ensemble, ces résultats semblent montrer que REG3A ne titre pas l'UDP-GlcNAc ni n'interagit avec les protéines O-GlcNAcylées. REG3A pourrait donc agir en amont sur le métabolisme de l'UDP-GlcNAc lui-même.

Pour rappel, une fois entré dans la cellule, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate. Trois voies métaboliques sont alors accessibles : celle du glycogène permettant le stockage des glucides, celle des pentoses-phosphates menant à la production de NADPH et de ribose-5-P, et celle de la glycolyse. Cette dernière débute par la transformation du glucose-6-phosphate (G6P) en fructose-6-phosphate (F6P) jusqu'à la formation de pyruvate. Entre 2 et 5% du F6P échappe à cette voie pour rejoindre celle de biosynthèse des hexosamines (HBP) (Akella *et al.*, 2019).

Nous montrons que la glycémie basale est similaire chez les animaux MYC-TG et MYC/REG3A-TG âgés de 6 et 12 mois (Figure 77). Concernant la production du glycogène, nous observons une diminution du glycogène hépatique dans les tissus pré-néoplasiques (6 mois) et tumoraux (12 mois) d'animaux MYC/REG3A-TG comparé

à des animaux MYC-TG (Figure 78). Ces résultats montrent que la réduction de O-GlcNACylation associée à REG3A ne peut être expliquée par un stockage excessif de glucose sous la forme de glycogène ce qui dans ce cas entrainerait une diminution de la voie de l'HBP.

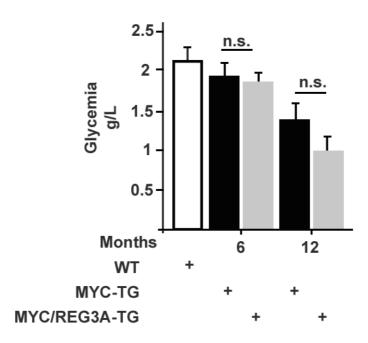


Figure 77 - Mesure de la glycémie capillaire de souris âgées de 6 et 12 mois.

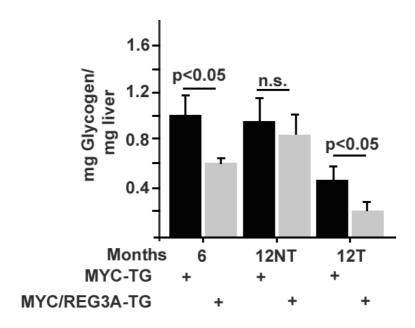


Figure 78 - Analyse par absorptiométrie de la concentration en glycogène dans des foies non-tumoraux (NT) et tumoraux (T) d'animaux MYC-TG et MYC/REG3A-TG.

Comme cette voie métabolique est directement reliée à l'activité glycolytique des cellules, nous avons poursuivi les investigations en étudiant le métabolisme énergétique global des cellules à l'aide de l'analyseur Seahorse. Il permet de mesurer

simultanément la consommation d'oxygène par des cellules vivantes et l'acidification de leur l'environnement, ce qui procure des informations sur l'activité de la chaine OXPHOS mitochondriale et de la glycolyse, respectivement. Nous montrons que des cellules HuH7 exprimant REG3A présentent une réduction de la vitesse de production de l'ATP par la chaine OXPHOS mitochondriale et par la voie de la glycolyse comparé aux cellules contrôles (Figure 79). Ces données préliminaires suggèrent que REG3A contribue à une moindre activité de la voie de la glycolyse et, par-là, de la voie des hexosamines qui dépend de cette dernière. Ces résultats sont à valider *in vivo* par une analyse Seahorse réalisée sur des biopsies fraiches de tissus tumoraux issus de souris MYC-TG et MYC/REG3A-TG.

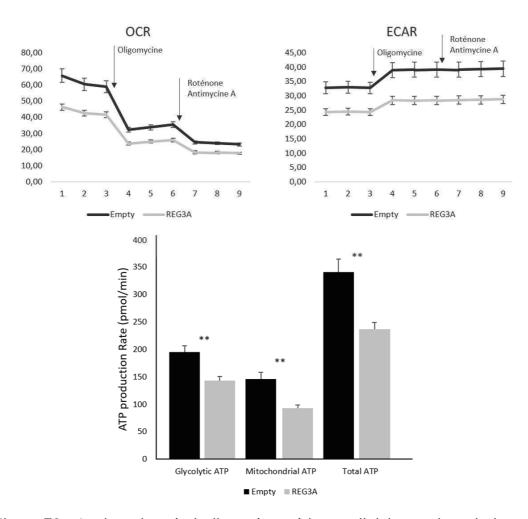


Figure 79 - Analyse du métabolisme énergétique cellulaire par la technique du « SeaHorse » Haut) Evolution des paramètres OCR (oxygen consumption rate) et ECAR (extra-cellular acidification rate). Bas) Taux de production d'ATP mesurés. (Oligomycine : inhibiteur de l'ATP synthétase. Roteonone & Antimycine A : inhibiteurs de la chaine respiratoire, complexes I et III respectivement.)

Quatrième partie : Discussion & perspectives

Un nombre important de travaux ont décrit une corrélation entre élévation de la O-GlcNAcylation des protéines et transformation/progression tumorale dans différents tissus cancéreux (sein, prostate, foie, colon, poumons, la vessie, pancréas) humains. Il a ainsi été suggéré qu'une O-GlcNAcylation anormalement régulée pourrait contribuer à la pathologie des cancers. Cette élévation globale de la O-GlcNAcylation des protéines est corrélée à de nombreux facteurs péjoratifs, parmi lesquels le grade tumoral, la récidive tumorale, les métastases et un mauvais pronostic. Par exemple, une étude réalisée sur des biopsies de tissu prostatique a établi un lien entre forte O-GlcNAcylation et mauvais pronostic dans une cohorte de 56 patients cancéreux (Kamigaito et al., 2013). Dans un ensemble de 70 biopsies de carcinome ductulaire mammaire, l'augmentation de l'expression de l'OGT est corrélée aux tumeurs peu différenciées de grade II et III (Krzeslak et al., 2011). D'autres études montrent des taux élevés de O-GlcNAcylation dans des séries de 60 CHC (Zhu et al., 2011) et 44 cholangiocarcinomes (Indramanee et al., 2012) comparés à des foies sains. Les auteurs rapportent que cette élévation est corrélée avec la récidive tumorale après transplantation hépatique et avec la présence d'un phénotype aggravé, définie par une migration, une invasion et une viabilité accrues des cellules cancéreuses in vitro (Zhu et al., 2011). Par ailleurs, l'ARNm de l'OGT a été proposé comme marqueur diagnostic du cancer de la vessie. En effet une étude portant sur 143 individus sains et 176 patients atteints de cancer de la vessie montre que l'ARNm OGT est spécifiquement détecté dans les urines des patients cancéreux (Rozanski et al., 2012).

Des études réalisées *in vitro* sur différentes lignées cellulaires montrent que la O-GlcNAcylation globale des protéines apporte un avantage sélectif à la prolifération cellulaire et au développement tumoral. L'inhibition de l'OGT dans les lignées tumorales coliques HCT116 et HT29 diminue la prolifération cellulaire, la migration et l'adhésion cellulaires (Steenackers *et al.,* 2016). L'inhibition de l'OGA dans les cellules tumorales thyroïdiennes 8305C accroit le phénotype invasif des cellules (Zhang *et al.,* 2015). Certaines études identifient des protéines particulières dont le niveau de O-GlcNAcylation module des voies de signalisation impliquées dans la carcinogenèse. Par exemple, les index mitotiques des lignées mammaire MCF10a et gastrique MKN45 sont augmentés suite à la stabilisation du facteur FoxM1 O-GlcNAcylé ce qui, en activant Skp2, inhibe l'inhibiteur de CDK p27 (Inoue *et al.,* 2018; Caldwell *et al.,* 2010). L'inhibition pharmacologique de l'OGT provoque l'apoptose de cellules tumorales mammaires suite à la dégradation du proto-oncogène HIF-1α (Ferrer *et al.,* 2014) et un ralentissement de la prolifération de cellules cancéreuses prostatiques associé à une diminution dose-dépendante de c-Myc (Itkonen *et al.,* 2013).

Globalement, nos résultats montrent que l'expression hépatique de la lectine REG3A est associée à une réduction de la O-GlcNAcylation des protéines et à un retard à l'apparition du cancer du foie, ce qui est à rapprocher des propriétés similaires constatées après administration d'inhibiteurs pharmacologiques de l'OGT. Dans le

modèle de carcinogenèse hépatique induit par c-Myc, la réduction de la O-GlcNAcylation globale associée à REG3A pourrait réduire la glycosylation spécifique de c-Myc favorisant ainsi sa dégradation. Cette hypothèse n'est cependant pas encore vérifiée. La régulation de la carcinogenèse hépatique par REG3A par le biais d'une modulation de la O-GlcNAcylation ne serait pas restreinte à l'oncogène c-Myc puisque des résultats équivalents ont été révélés dans un autre modèle de carcinogenèse chimio-induit où la voie MYC n'est pas activée.

Nos résultats suggèrent que la O-GlcNAcylation des protéines est impliquée dans l'initiation de la carcinogenèse hépatique. A notre connaissance, le rôle direct de la O-GlcNAcylation des protéines dans l'initiation tumorale n'a pas été clairement mis en évidence, l'ensemble des travaux réalisés jusque-là l'ont été dans des lignées cellulaires ou des échantillons de tissus cancéreux. Dans nos travaux, nous montrons que le retard à l'apparition des tumeurs en présence de REG3A était associé à une diminution de la O-GlcNAcylation des protéines de 72% dans les tissus prénéoplasiques, 60% dans les tissus non-tumoraux adjacents aux tumeurs et 20% dans les tissus tumoraux. En l'état, nos résultats ne nous permettent pas d'établir si REG3A réduit la O-GlcNAcylation globale des protéines ou si REG3A régule le niveau d'O-GlcNAcylation de protéine(s) particulière(s), ayant un rôle clé dans l'initiation et la transformation tumorales. Cette question fera l'objet de travaux à venir à moyen terme dans notre laboratoire.

Une question fondamentale est celle des mécanismes de régulation de la O-GlcNAcylation des protéines par REG3A. Cette question peut être abordée suivant deux aspects : 1) du point de vue de REG3A et de ses fonctions connues ; 2) du point de vue de la O-GlcNAcylation elle-même et de ses mécanismes de régulation.

S'agissant du premier aspect, seules deux fonctions sont à ce jour attribuées à REG3A: une fonction lectine et une fonction anti-oxydante. Ainsi, REG3A pourrait titrer le glucose, le GlcNAc, l'UDP-GlcNAc ou tout autre sucre intermédiaire dans la chaine de l'HBP, et ainsi limiter la disponibilité en substrat. Il est connu que certaines lectines sont capables de fixer les résidus GlcNAc. Ce sont par exemple les cas de l'agglutinine de germe de blé (WGA), de la lectine recombinante du champignon *Psathyrella Velutina* (rPVL) (Kubota *et al.* 2017). Chez l'Homme, les ficolines comme P35, d'expression hépatique, ont la capacité de fixer les résidus GlcNAc (Matsushita *et al., 2013*). Cette famille présente une forte similarité fonctionnelle et structurelle avec les collectines (groupe III des lectines de type C), en particulier avec la lectine liant le mannose (MBL) (Matsushita *et al., 1996*). Cette dernière reconnait la fraction GlcNAc du peptidoglycane et participe ainsi à l'immunité innée (Nadesalingam *et al., 2005*). Il est bien établi que la fonction lectine de REG3A lui permet de fixer différents sucres, avec une nette affinité pour les multimères (mannane, peptidoglycane - un polymère contenant du GlcNAc). Nos résultats montrent que REG3A n'est pas capable de fixer

les différentes formes cellulaires du GlcNAc comme l'UDP-GlcNAc ou les résidus GlcNAc fixés aux protéines. Des expériences sont en cours pour évaluer l'interaction de REG3A avec différentes formes de sucre (G6P, F6P ou tout autre molécule intermédiaire de la voie de l'HBP) issues de la transformation du glucose en UDP-GlcNAc. Turano *et al.* ont montré l'existence de polymères d'UDP-GlcNAc/GlcNAc dans les neurones et la microglie dans la maladie d'Alzheimer (Turano *et al.*, 2015). A ce jour, l'existence dans le foie sain ou pathologique de polymères d'UDP-GlcNAc n'a pas été recherchée, l'action préférentielle de REG3A pour des polymères de sucres pouvant faire penser que ce type de cible, si elle existait, serait un potentiel candidat pour REG3A.

REG3A présente également la capacité d'éliminer les ROS, en particulier le radical hydroxyle, ce qui a pour conséquence de diminuer le stress oxydatif cellulaire et tissulaire dans un modèle murin d'hépatite aiguë (Moniaux et al., 2010). Il existe aujourd'hui des arguments expérimentaux montrant que le stress oxydatif favorise la O-GlcNAcylation des protéines. En condition de stress oxydatif, au décours par exemple d'une hyperglycémie, le radical superoxyde produit par les mitochondries provoque une baisse de l'activité de la GAPDH. Cette enzyme transforme le G3P en 1,3-BPG et la baisse de son activité se traduit par une accumulation de F6P. Il est alors réorienté vers la voie de l'HBP, ce qui a pour conséquence une hausse de la O-GlcNAcylation des protéines (Du et al., 2000). Des résultats similaires d'inhibition de la GAPDH ont été obtenus au cours du stress oxydatif qui accompagne l'insuffisance rénale chronique (D'Apolito et al., 2015). Les auteurs montrent que la normalisation des taux de ROS suffit pour diminuer la O-GlcNAcylation des protéines. Notre connaissance de la biologie de REG3A combinée aux données de la littérature nous incite à penser que la fonction anti-oxydante de REG3A pourrait faciliter l'activité de la GAPDH et ainsi limiter la quantité de F6P disponible pour la synthèse de l'UDP-GlcNAc. D'autre part, en condition d'inflammation hépatique sévère induite par une intoxication à l'acétaminophène, la O-GlcNAcylation des protéines limite le réapprovisionnement en gluthation réduit (GSH), favorisant ainsi les dommages oxydatifs du parenchyme hépatique (McGreal et al., 2018). Un mécanisme identique pourrait être à l'œuvre dans les hépatite chronique de manière plus insidieuse et participer à l'initiation de la carcinogénèse hépatique chez les patients cirrhotiques. En réduisant la O-GlcNAcylation des protéines via sa fonction anti-oxydante, dans les tissus de patients atteints de cirrhose, REG3A pourrait retarder l'apparition du cancer.

Concernant le second aspect, il est largement décrit dans la littérature que l'OGT est un senseur du métabolisme énergétique. Un travail approfondi a montré que l'OGT régulée par la chaperonne URI conférait des fonctions de survie dépendantes de c-Myc en réponse à des fluctuations de glucose (Buren *et al.*, 2016). Un taux élevé de glucose maintient un complexe fonctionnel entre URI, la phosphatase PP1 γ et l'OGT. En présence de glucose, URI lié à PP1 γ maintient l'activité de l'OGT et le taux de c-Myc. Cependant, lors d'une diminution du glucose disponible, la production d'ATP diminue

et le taux de cAMP augmente, provoquant l'activation de la kinase PKA. Elle phosphoryle URI, entraînant la libération de PP1y et l'inhibition de l'OGT, ce qui augmente la dégradation de c-Myc pour permettre aux cellules de s'adapter et de survivre sous l'effet du stress métabolique. En conséquence, les souris exprimant une protéine URI hépatique modifiée, non phosphorylable, présentent une forte activité OGT et une stabilisation de c-Myc, accélérant la carcinogenèse hépatique en accord avec les fonctions oncogènes de c-Myc (Buren et al., 2016). Il a été montré que REG3A interagit avec la sous-unité régulatrice RIIα de la PKA et que REG3A peut activer la signalisation PKA in vitro et dans le foie en régénération chez la souris (Simon et al., 2003; Demaugre et al., 2004). Nos résultats obtenus avec la méthode Seahorse montrent que REG3A diminue le niveau total d'ATP produit par la glycolyse et la respiration mitochondriale. REG3A pourrait donc réduire la O-GlcNAcylation des protéines en influençant la signalisation PKA. Reproduisant la signalisation activée par la diminution de la production d'ATP au cours de la restriction en glucose. Dans cette hypothèse, la présence de REG3A pourrait expliquer une diminution de la O-GlcANylation sans interférer avec l'expression de l'OGT mais en affectant son activité par deux points clefs : la synthèse d'ATP et l'activation de la PKA. Cette hypothèse reste encore à démontrer.

Nous ne pouvons exclure à l'heure actuelle que d'autres mécanismes de régulation de la O-GlcNAcylation des protéines soient impliqués. Des variations de O-GlcNAcylation peuvent être causées par une augmentation du niveau de l'OGT comme montré dans le cancer du côlon (Mi et al., 2011) ou une diminution du niveau de l'OGA, comme dans le cancer du sein (Krzeslak et al., 2011). Ces variations peuvent être provoquées par la fixation de facteurs de transcription sur la région du promoteur du gène OGT, comme Nrf2 dans des macrophages de colon (Li *et al.*, 2017) ou E2F1 dans des cellules rénales (Muthusamy et al., 2015). La dégradation de l'OGT par le système ubiquitine-protéasome peut aussi être régulée : Host Cell Factor 1 (HCF-1) se lie à l'OGT et la O-GlcNAcylation de HCF-1 est un signal pour sa protéolyse (Daou et al., 2011) alors que l'activité ubiquitine ligase (et non déméthylase) de l'histone déméthylase LSD2 favorise la dégradation par ubiquitinylation de l'OGT (Yang et al., 2015). D'autres travaux montrent que les modifications post-traductionnelles de l'OGT peuvent moduler son activité : sa phosphorylation, sous l'action des calmodulines II et IV ou de GSK3ß, accroit son activité (Song et al., 2008; Kaasik et al., 2013) alors que sa Snitrosylation la réduit (Ryu et Do, 2011).

En conclusion, nos travaux ont eu pour objectif de caractériser le phénotype tumoral associé à REG3A et l'impact moléculaire de REG3A sur la carcinogenèse hépatique dans des modèles *in vivo*. Nos résultats indiquent que l'expression hépatique de REG3A retarde le développement tumoral dans deux modèles de carcinogenèse hépatique et que cet effet est associé dans les deux cas à une diminution de la O-GlcNAcylation globale des protéines. Bien que le mécanisme exact par lequel

REG3A régule cette modification post-traductionnelle reste à clarifier, ces résultats ouvrent des perspectives originales dans la compréhension du mode d'action de REG3A au stade pré-néoplasique et dans le développement de candidats médicaments dans la prévention du cancer dans des populations à risque telles les patients cirrhotiques.

Bibliographie

- Abe M., Nata K., Akiyama T., Shervani N. J., Kobayashi S., Tomioka-Kumagai T., Ito S., Takasawa S., and Okamoto H. Identification of a novel reg family gene, reg IIIdelta, and mapping of all three types of reg family gene in a 75 kilobase mouse genomic region. *Gene*, 246(1-2):111–122, April 2000.
- Abergel C., Chenivesse S., Stinnakre M.-G., Guasco S., Brechot C., Claverie J.-M., Devinoy E., and Christa L. Crystallization and preliminary crystallographic study of HIP/PAP, a human c-lectin overexpressed in primary liver cancers. *Acta Crystallography*, 55(8):1487–1489, August 1999.
- Aggarwal S., Xie M.-H., Maruoka M., Foster J., and Gurney A. L. Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 21(12):1047–1053, December 2001.
- Akella N. M., Ciraku L., and Reginato M. J. Fueling the fire: emerging role of the hexosamine biosynthetic pathway in cancer. *BMC Biology*, 17(1), July 2019.
- Akiyama T. Activation of reg gene, a gene for insulin-producing beta -cell regeneration: Poly(ADP-ribose) polymerase binds reg promoter and regulates the transcription by autopoly(ADP-ribosyl)ation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (1):48–53, December 2000.
- Alfaro J. F., Gong C.-X., Monroe M. E., Aldrich J. T., Clauss T. R. W., Purvine S. O., Wang Z., Camp D. G., Shabanowitz J., Stanley P., Hart G. W., Hunt D. F., Yang F., and Smith R. D. Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain o-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific o-GlcNAc transferase targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(19):7280–7285, April 2012.
- Algul H., Treiber M., Lesina M., Nakhai H., Saur D., Geisler F., Pfeifer A., Paxian S., and Schmid R. M. Pancreas-specific RelA/p65 truncation increases susceptibility of acini to inflammation-associated cell death following cerulein pancreatitis. *Journal of Clinical Investigation*, 117(6):1490–1501, June 2007.
- Ampo K.-I., Suzuki A., Konishi H., and Kiyama H. Induction of pancreatitis-associated protein (PAP) family members in neurons after traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 26(10):1683–1693, October 2009.
- Andrali S. S., März P., and Özcan S. Ataxin-10 interacts with o-GlcNAc transferase OGT in pancreatic beta cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(1):149–153, November 2005.
- Andrali S. S., Qian Q., and Ozcan S. Glucose mediates the translocation of NeuroD1 byO-linked glycosylation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(21):15589–15596, April 2007.

- Armengol C., Cairo S., Fabre M., and Buendia M. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: The hepatoblastoma model. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(2):265–270, February 2011.
- Arnold C. S., Johnson G. V. W., Cole R. N., Dong D. L.-Y., Lee M., and Hart G. W. The microtubule-associated protein tau is extensively modified withO-linkedN-acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry*, 271(46):28741–28744, November 1996.
- Arthur M. J., Friedman S. L., Roll F. J., and Bissell D. M. Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type IV) collagen. *Journal of Clinical Investigation*, 84(4):1076–1085, October 1989.
- Arthur M. J. P. Fibrogenesis II. metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 279(2): G245–G249, August 2000.
- Audagnotto M. and Peraro M. D. Protein post-translational modifications: In silico prediction tools and molecular modeling. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 15:307–319, 2017.
- Averill S., Davis D. R., Shortland P. J., Priestley J. V., and Hunt S. P. Dynamic pattern of reg-2 expression in rat sensory neurons after peripheral nerve injury. *The Journal of Neuroscience*, 22(17):7493–7501, September 2002.
- Azechi H., Nishida N., Fukuda Y., Nishimura T., Minata M., Katsuma H., Kuno M., Ito T., Komeda T., Kita R., Takahashi R., and Nakao K. Disruption of the p16/cyclin d1/retinoblastoma protein pathway in the majority of human hepatocellular carcinomas. *Oncology*, 60(4):346–354, 2001.
- Ba I. A.-T. V., Marchal S., Francois F., Silhol M., Lleres C., Michel B., Benyamin Y., Verdier J.-M., Trousse F., and Marcilhac A. Regenerating islet-derived 1alpha (reg-1alpha) protein is new neuronal secreted factor that stimulates neurite outgrowth via exostosin tumor-like 3 (EXTL3) receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7): 4726–4739, December 2011.
- Bachman K. E., Park B. H., Rhee I., Rajagopalan H., Herman J. G., Baylin S. B., Kinzler K. W., and Vogelstein B. Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell*, 3(1):89–95, January 2003.
- Bae J.-J., Rho J.-W., Lee T.-J., Yun S.-S., Kim H.-J., Choi J.-H., Jeong D., Jang B.-C., and Lee T.-Y. Loss of heterozygosity on chromosome 10q23 and mutation of the phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 tumor suppressor gene in korean hepatocellular carcinoma patients. *Oncology Reports*, October 2007.
- Baldini S. F., Steenackers A., Stichelen S. O.-V., Mir A.-M., Mortuaire M., Lefebvre T., and Guinez C. Glucokinase expression is regulated by glucose through o-GlcNAc glycosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478(2): 942–948, September 2016.
- Balogh J., Victor D., Asham E. H., Burroughs S. G., Boktour M., Saharia A., Li X., Ghobrial M., and Monsour H. Hepatocellular carcinoma: a review. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*, Volume 3:41–53, October 2016.

- Banerjee S., Robbins P. W., and Samuelson J. Molecular characterization of nucleocytosolic o-GlcNAc transferases of giardia lamblia and cryptosporidium parvum. *Glycobiology*, 19(4):331–336, October 2008.
- Barkovskaya A., Prasmickaite L., Duveau D. Y., Mills I. G., Mælandsmo G. M., Moestue S. A., and Itkonen H. M. *Abstract 1131 : O-GlcNAc transferase inhibition in breast cancer cells*. American Association for Cancer Research, July 2017.
- Bartel D. P. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2): 215–233, January 2009.
- Bartoli C., Baeza N., Figarella C., Pellegrini I., and Figarella-Branger D. Expression of peptide-23/pancreatitis-associated protein andRegGenes in human pituitary and adenomas: Comparison with other fetal and adult human tissues1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(11):4041–4046, November 1998.
- Bastians H. *Causes of Chromosomal Instability*. Springer International Publishing, 2015.
- Bauer C., Göbel K., Nagaraj N., Colantuoni C., Wang M., Müller U., Kremmer E., Rottach A., and Leonhardt H. Phosphorylation of TET proteins is regulated viaO-GlcNAcylation by theO-LinkedN-acetylglucosamine transferase (OGT). *Journal of Biological Chemistry*, 290(8):4801–4812, January 2015.
- Bell R. J. A., Rube H. T., Kreig A., Mancini A., Fouse S. D., Nagarajan R. P., Choi S., Hong C., He D., Pekmezci M., Wiencke J. K., Wrensch M. R., Chang S. M., Walsh K. M., Myong S., Song J. S., and Costello J. F. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science*, 348 (6238):1036–1039, May 2015.
- Biessels G. J., Staekenborg S., Brunner E., Brayne C., and Scheltens P. Risk of dementia in diabetes mellitus: a systematic review. *The Lancet Neurology*, 5(1):64–74, January 2006.
- Bimmler D., Schiesser M., Perren A., Scheele G., Angst E., Meili S., Ammann R., and Graf R. Coordinate regulation of PSP/reg and PAP isoforms as a family of secretory stress proteins in an animal model of chronic pancreatitis. *Journal of Surgical Research*, 118(2):122–135, May 2004.
- Bioulac-Sage P., Balabaud C., and Zucman-Rossi J. Focal nodular hyperplasia, hepatocellular adenomas: Past, present, future. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 34(6-7):355–358, August 2010.
- Birchmeier W. Orchestrating wnt signalling for metabolic liver zonation. *Nature Cell Biology*, 18(5):463–465, April 2016.
- Birgani M. T. and Carloni V. Tumor microenvironment, a paradigm in hepatocellular carcinoma progression and therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (2):405, February 2017.
- Bishnupuri K. S., Sainathan S. K., Bishnupuri K., Leahy D. R., Luo Q., Anant S., Houchen C. W., and Dieckgraefe B. K. Reg4-induced mitogenesis involves akt-GSK3b-b-catenin-TCF-4 signaling in human colorectal cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 53(S1):E169–E180, October 2013.

- Bismuth H., Nakache R., and Diamond T. Management strategies in resection for hilar cholangiocarcinoma. *Annals of Surgery*, 215(1):31–38, January 1992.
- Blanc J. F. Carcinome hepatocellulaire. *Thesaurus National de Cancerologie Digestive*, 2019.
- Bogdanos D., Gao B., and Gershwin M. Liver immunology. *Comprehensive Physiology*, 3:567–598, 2013.
- Bonacchi A., Petrai I., Defranco R., Lazzeri E., Annunziato F., Efsen E., Cosmi L., Romagnani P., Milani S., Failli P., Batignani G., Liotta F., Laffi G., Pinzani M., Gentilini P., and Marra F. The chemokine ccl21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis c. *Gastroenterology*, 2003.
- Boyault S., Rickman D. S., de Reynies A., Balabaud C., Rebouissou S., Jeannot E., Herault A., Saric J., Belghiti J., Franco D., Bioulac-Sage P., Laurent-Puig P., and Zucman-Rossi J. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, 45(1):42–52, January 2007.
- Braidman I., Carroll M., Dance N., and Robinson D. Separation and properties of human brain hexosaminidase c. *Biochemical Journal*, 143(2):295–301, November 1974.
- Bralet M.-P., Regimbeau J.-M., Pineau P., Dubois S., Loas G., Degos F., Valla D., Belghiti J., DEGOTT C., and Terris B. Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver: Epidemiologic and histopathologic analysis of 80 french cases. *Hepatology*, 2000.
- Brennecke J., Hipfner D. R., Stark A., Russell R. B., and Cohen S. M. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in drosophila. *Cell*, 113(1):25–36, April 2003.
- Breuhahn K., Vreden S., Haddad R., Beckebaum S., Stippel D., Flemming P., Nussbaum T., Caselmann W. H., Haab B. B., and Schirmacher P. Molecular profiling of human hepatocellular carcinoma defines mutually exclusive interferon regulation and insulin-like growth factor II overexpression. *Cancer Research*, 64(17):6058–6064, September 2004.
- Bridgewater J. A., Goodman K. A., Kalyan A., and Mulcahy M. F. Biliary tract cancer: Epidemiology, radiotherapy, and molecular profiling. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 2016.
- Brito A., Abrantes A., Pinto-Costa C., Gomes A., Mamede A., Casalta-Lopes J., Goncalves A., Sarmento-Ribeiro A., Tralhao J., and Botelho M. Hepatocellular carcinoma and chemotherapy: The role of p53. *Chemotherapy*, 58(5):381–386, 2012.
- Broschat K. O., Gorka C., Page J. D., Martin-Berger C. L., Davies M. S., chih Huang H., Gulve E. A., Salsgiver W. J., and Kasten T. P. Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase i. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17):14764–14770, February 2002.
- Bruix J., Gores G. J., and Mazzaferro V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives. *Gut*, 63(5):844–855, February 2014.

- Brunt E. M., Janney C. G., Bisceglie A. M., Neuschwander-Tetri B. A., and Bacon B. R. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American Journal of Gastroenterology*, 1999.
- Bryantsev A., Chechenova M., and Shelden E. Recruitment of phosphorylated small heat shock protein hsp27 to nuclear speckles without stress. *Experimental Cell Research*, 313(1):195–209, January 2007.
- Buendia M. A. Genetic alterations in hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: Common and distinctive aspects. *Medical and Pediatric Oncology*, 39(5):530–535, September 2002.
- Burén S., Gomes A. L., Teijeiro A., Fawal M.-A., Yilmaz M., Tummala K. S., Perez M., Rodriguez-Justo M., Campos-Olivas R., Megías D., and Djouder N. Regulation of OGT by URI in response to glucose confers c-MYC-dependent survival mechanisms. *Cancer Cell*, 30(2):290–307, August 2016.
- Butkinaree C., Park K., and Hart G. W. O-linked beta-n-acetylglucosamine (o-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*, 1800(2):96–106, February 2010.
- Cairo S., Armengol C., Reyniès A. D., Wei Y., Thomas E., Renard C.-A., Goga A., Balakrishnan A., Semeraro M., Gresh L., Pontoglio M., Strick-Marchand H., Levillayer F., Nouet Y., Rickman D., Gauthier F., Branchereau S., Brugières L., Laithier V., Bouvier R., Boman F., Basso G., Michiels J.-F., Hofman P., Arbez-Gindre F., Jouan H., Rousselet-Chapeau M.-C., Berrebi D., Marcellin L., Plenat F., Zachar D., Joubert M., Selves J., Pasquier D., Bioulac-Sage P., Grotzer M., Childs M., Fabre M., and Buendia M.-A. Hepatic stem-like phenotype and interplay of wnt/beta-catenin and myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell*, 14(6):471–484, December 2008.
- Calderaro J., Couchy G., Imbeaud S., Amaddeo G., Letouze E., Blanc J.-F., Laurent C., Hajji Y., Azoulay D., Bioulac-Sage P., Nault J.-C., and Zucman-Rossi J. Histological subtypes of hepatocellular carcinoma are related to gene mutations and molecular tumour classification. *Journal of Hepatology*, 67(4):727–738, October 2017.
- Caldwell S. A., Jackson S. R., Shahriari K. S., Lynch T. P., Sethi G., Walker S., Vosseller K., and Reginato M. J. Nutrient sensor o-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene*, 29(19):2831–2842, March 2010.
- Calvisi D. F., Ladu S., Gorden A., Farina M., Conner E. A., Lee J.-S., Factor V. M., and Thorgeirsson S. S. Ubiquitous activation of ras and jak/stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*, 130(4):1117–1128, April 2006.
- Cao B., Duan M., Xing Y., Liu C., Yang F., Li Y., Yang T., Wei Y., Gao Q., and Jiang J. O-GlcNAc transferase activates stem-like cell potential in hepatocarcinoma through o-GlcNAcylation of eukaryotic initiation factor 4e. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(4):2384–2398, January 2019.
- Caremani M., Vincenti A., Benci A., Sassoli S., and Tacconi D. Ecographic epidemiology of non-parasitic hepatic cysts. *Journal of Clinical Ultrasound*, 1993.

- Carvalho R. D. D. O., do Carmo F. L. R., de Oliveira Junior A., Langella P., Chatel J.-M., Bermudez-Humaran L. G., Azevedo V., and de Azevedo M. S. Use of wild type or recombinant lactic acid bacteria as an alternative treatment for gastrointestinal inflammatory diseases: A focus on inflammatory bowel diseases and mucositis. *Frontiers in Microbiology*, 8, May 2017.
- Cash H. L. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science*, 313(5790):1126–1130, August 2006.
- Cavard C., Terris B., Grimber G., Christa L., Audard V., Radenen-Bussiere B., Simon M.-T., Renard C.-A., Buendia M.-A., and Perret C. Overexpression of regenerating islet-derived 1 alpha and 3 alpha genes in human primary liver tumors with b-catenin mutations. *Oncogene*, 25(4):599–608, November 2005.
- Centelles J. J. General aspects of colorectal cancer. *ISRN Oncology*, 2012 :1–19, 2012.
- Cerini C., Peyrot V., Garnier C., Duplan L., Veesler S., Caer J.-P. L., Bernard J.-P., Bouteille H., Michel R., Vazi A., Dupuy P., Michel B., Berland Y., and Verdier J.-M. Biophysical characterization of lithostathine. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (32):22266–22274, August 1999.
- Chakraborty C., Katsumata N., Myal Y., Schroedter I. C., Brazeau P., Murphy L. J., Shiu R. P., and Friesen H. G. Age-related changes in peptide-23/pancreatitis-associated protein and pancreatic stone protein/reg gene expression in the rat and regulation by growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology*, 136(5):1843–1849, May 1995a.
- Chakraborty C., Vrontakis M., Molnar P., Schroedter I., Katsumata N., Murphy L., Shiu R., and Friesen H. Expression of pituitary peptide 23 in the rat uterus: regulation by estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 108(1-2):149–154, February 1995b.
- Chalasani N., Younossi Z., Lavine J. E., Diehl A. M., Brunt E. M., Cusi K., Charlton M., and Sanyal A. J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the american association for the study of liver diseases, american college of gastroenterology, and the american gastroenterological association. *Hepatology*, 2012.
- Chang T.-J., Weaver J. R., Bowman A., Leone K., Raab R., Vinik A. I., Pittenger G. L., and Taylor-Fishwick D. A. Targeted expression of islet neogenesis associated protein to beta cells enhances glucose tolerance and confers resistance to streptozotocin-induced hyperglycemia. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 335(2):104–109, March 2011.
- Chao-Hung H., Jing-Houng W., Tsung-Hui H., Chien-Hung C., Kuo-Chin C., Yi-Hao Y., Yuan-Hung K., Ming-Chao T., Lu S.-N., and Lee C.-M. Insulin resistance is associated with hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis c infection. *World Journal of Gastroenterology*, 2010.
- Chen G., Liu P., Thurmond D. C., and Elmendorf J. S. Glucosamine-induced insulin resistance is coupled to o-linked glycosylation of munc18c. *FEBS Letters*, 534(1-3): 54–60, December 2002.

- Chen J.-H., Wang Y.-Y., Lv W.-B., Gan Y., Chang W., Tian N.-N., Huang X.-H., Liu L., Yu X.-F., and Chen S.-D. Effects of interactions between environmental factors and-KIF1bgenetic variants on the risk of hepatocellular carcinoma in a chinese cohort. *World Journal of Gastroenterology*, 22(16):4183, 2016.
- Chen P.-H., Chi J.-T., and Boyce M. Functional crosstalk among oxidative stress and o-GlcNAc signaling pathways. *Glycobiology*, 28(8):556–564, April 2018.
- Chen W., Qiang X., Wang Y., Zhu S., Li J., Babaev A., Yang H., Gong J., Becker L., Wang P., Tracey K. J., and Wang H. Identification of tetranectin-targeting monoclonal antibodies to treat potentially lethal sepsis. *Science Translational Medicine*, 12(539): eaaz3833, April 2020.
- Chen Z., Huang Z., Xue H., Lin X., Chen R., Chen M., and Jin R. REG3a promotes the proliferation, migration, and invasion of gastric cancer cells. *OncoTargets and Therapy*, Volume 10:2017–2023, April 2017.
- Chen Z., Downing S., and Tzanakakis E. S. Four decades after the discovery of regenerating islet-derived (reg) proteins: Current understanding and challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, October 2019.
- Cheng X. and Hart G. W. AlternativeO-glycosylation/o-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13):10570–10575, January 2001.
- Cherqui D., Laurent A., Mocellin N., Tayar C., Luciani A., Nhieu J. T. V., Decaens T., Hurtova M., Memeo R., Mallat A., and Duvoux C. Liver resection for transplantable hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgery*, 250(5):738–746, November 2009.
- Cheung W. D. and Hart G. W. AMP-activated protein kinase and p38 MAPK Activateo-GlcNAcylation of neuronal proteins during glucose deprivation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(19):13009–13020, March 2008.
- Chikanishi T., Fujiki R., Hashiba W., Sekine H., Yokoyama A., and Kato S. Glucose-induced expression of MIP-1 genes requires o-GlcNAc transferase in monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(4):865–870, April 2010.
- Cho Y., Park M. J., Kim K., Park J.-Y., Kim J., Kim W., and Yoon J.-H. Tumor-stroma crosstalk enhances REG3a expressions that drive the progression of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2):472, January 2020.
- Choi B., Suh Y., Kim W.-H., Christa L., Park J., and Bae C.-D. Downregulation of regenerating islet-derived 3 alpha (REG3a) in primary human gastric adenocarcinomas. *Experimental & Molecular Medicine*, 39(6):796–804, December 2007.
- Christa L., Carnot F., Simon M. T., Levavasseur F., Stinnakre M. G., Lasserre C., Thepot D., Clement B., Devinoy E., and Brechot C. HIP/PAP is an adhesive protein expressed in hepatocarcinoma, normal paneth, and pancreatic cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 271(6):G993–G1002, December 1996.

- Christa L., Simon M.-T., Brezault-Bonnet C., Bonte E., Carnot F., Zylberberg H., Franco D., Capron F., Roskams T., and Brechot C. Hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatic associated protein (HIP/PAP) is expressed and secreted by proliferating ductules as well as by hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma cells. *The American Journal of Pathology*, 155(5):1525–1533, November 1999.
- Chu Y., Jiang M., Wu N., Xu B., Li W., Liu H., Su S., Shi Y., Liu H., Gao X., Fu X., Chen D., Li X., Wang W., Liang J., Nie Y., and Fan D. O-GlcNAcylation of SIX1 enhances its stability and promotes hepatocellular carcinoma proliferation. *Theranostics*, 10 (21):9830–9842, 2020.
- Comer F. I. and Hart G. W. Reciprocity between o-GlcNAc and o-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II†. *Biochemistry*, 40(26):7845–7852, July 2001.
- Comtesse N., Maldener E., and Meese E. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-n-acetylglucosaminidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(3):634–640, May 2001.
- Constable S., Lim J.-M., Vaidyanathan K., and Wells L. O-GlcNAc transferase regulates transcriptional activity of human oct4. *Glycobiology*, 27(10):927–937, June 2017.
- Coste A. D. L., Romagnolo B., Billuart P., Renard C.-A., Buendia M.-A., Soubrane O., Fabre M., Chelly J., Beldjord C., Kahn A., and Perret C. Somatic mutations of the b-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15):8847–8851, July 1998.
- Cotler S. J., Hay N., Xie H., Chen M. L., Xu P. Z., Layden T. J., and Guzman G. Immuno-histochemical expression of components of the akt-mTORC1 pathway is associated with hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease. *Digestive Diseases and Sciences*, 53(3):844–849, September 2007.
- Cummings RD M. R. *Chapter 31 C-type Lectins*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- Czauderna P., Lopez-Terrada D., Hiyama E., Haberle B., Malogolowkin M., and Meyers R. Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. *Current Opinion in Pediatrics*, 2014.
- Dai R., Li J., Liu Y., Yan D., Chen S., Duan C., Liu X., He T., and Li H. miR-221/222 suppression protects against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via p27kip1- and MEK/ERK-mediated cell cycle regulation. *Biological Chemistry*, 391 (7), January 2010.
- Dali-Youcef N. and Schlienger J.-L. Metabolisme de l'alcool. *EMC Endocrinologie Nutrition*, 2012.
- Daou S., Mashtalir N., Hammond-Martel I., Pak H., Yu H., Sui G., Vogel J. L., Kristie T. M., and Affar E. B. Crosstalk between o-GlcNAcylation and proteolytic cleavage regulates the host cell factor-1 maturation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(7):2747–2752, February 2011.

- Dapito D. H., Mencin A., Gwak G.-Y., Pradere J.-P., Jang M.-K., Mederacke I., Caviglia J. M., Khiabanian H., Adeyemi A., Bataller R., Lefkowitch J. H., Bower M., Friedman R., Sartor R. B., Rabadan R., and Schwabe R. F. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell*, 21(4):504–516, April 2012.
- D'Apolito M., Du X., Pisanelli D., Pettoello-Mantovani M., Campanozzi A., Giacco F., Maffione A. B., Colia A. L., Brownlee M., and Giardino I. Urea-induced ROS cause endothelial dysfunction in chronic renal failure. *Atherosclerosis*, 239(2):393–400, April 2015.
- Darnaud M., Santos A. D., Gonzalez P., Augui S., Lacoste C., Desterke C., Hertogh G. D., Valentino E., Braun E., Zheng J., Boisgard R., Neut C., Dubuquoy L., Chiappini F., Samuel D., Lepage P., Guerrieri F., Doré J., Bréchot C., Moniaux N., and Faivre J. Enteric delivery of regenerating family member 3 alpha alters the intestinal microbiota and controls inflammation in mice with colitis. *Gastroenterology*, 154(4): 1009–1023.e14, March 2018.
- Daulatzai M. A. Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 95(4):943–972, June 2016.
- Davis L. I. and Blobel G. Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21):7552–7556, November 1987.
- de la Monte S. M., Ozturk M., and Wands J. R. Enhanced expression of an exocrine pancreatic protein in alzheimer's disease and the developing human brain. *Journal of Clinical Investigation*, 86(3):1004–1013, September 1990.
- De Meijer V. E., Kalish B. T., Puder M., and IJzermans. Systematic review and metaan alysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection. *British Journal of Surgery*, 2010.
- de Queiroz R. M., Madan R., Chien J., Dias W. B., and Slawson C. Changes in C-LinkedN-acetylglucosamine (o-GlcNAc) homeostasis activate the p53 pathway in ovarian cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 291(36):18897–18914, July 2016.
- Decaens T., Hurtova M., and Duvoux C. Transplantation hepatique pour carcinome hepatocellulaire. *Gastroenterologie Clinique et Biologique*, 33(1):61–69, January 2009.
- Demaugre F., Philippe Y., Sar S., Pileire B., Christa L., Lasserre C., and Brechot C. HIP/PAP, a c-type lectin overexpressed in hepatocellular carcinoma, binds the RIIa regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase and alters the cAMP-dependent protein kinase signalling. *European Journal of Biochemistry*, 271(19): 3812–3820, September 2004.
- Dentin R., Hedrick S., Xie J., Yates J., and Montminy M. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science*, 319(5868) :1402–1405, March 2008.

- Deplus R., Delatte B., Schwinn M. K., Defrance M., Méndez J., Murphy N., Dawson M. A., Volkmar M., Putmans P., Calonne E., Shih A. H., Levine R. L., Bernard O., Mercher T., Solary E., Urh M., Daniels D. L., and Fuks F. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and h3k4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *The EMBO Journal*, 32(5):645–655, January 2013.
- Dieckgraefe B. K., Stenson W. F., Korzenik J. R., Swanson P. E., and Harrington C. A. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. *Physiological Genomics*, 4(1):1–11, November 2000.
- Dieckgraefe B. K., Crimmins D. L., Landt V., Houchen C., Anant S., Porche-Sorbet R., and Ladenson J. H. Expression of the regenerating gene family in inflammatory bowel disease mucosa: Reg ialpha upregulation, processing, and antiapoptotic activity. *Journal of Investigative Medicine*, 50(6):421–434, November 2002.
- Donadon V., Balbi M., and Zanette G. Hyperinsulinemia and risk for hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver diseases and type 2 diabetes mellitus. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 2009.
- Dong D. L. and Hart G. W. Purification and characterization of an o-glcnac selective n-acetyl-beta-d-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 269(30):19321–19330, 1994.
- Dor Y., Brown J., Martinez O. I., and Melton D. A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature*, 429(6987): 41–46, May 2004.
- Dorfmueller H. C., Borodkin V. S., Schimpl M., Shepherd S. M., Shpiro N. A., and van Aalten D. M. F. GlcNAcstatin: a picomolar, SelectiveO-GlcNAcase inhibitor that modulates IntracellularO-GlcNAcylation levels. *Journal of the American Chemical Society*, 128(51):16484–16485, December 2006.
- Dorfmueller H. C., Borodkin V. S., Blair D. E., Pathak S., Navratilova I., and van Aalten D. M. F. Substrate and product analogues as human o-GlcNAc transferase inhibitors. *Amino Acids*, 40(3):781–792, July 2010a.
- Dorfmueller H. C., Borodkin V. S., Schimpl M., Zheng X., Kime R., Read K. D., and van Aalten D. M. Cell-penetrant, nanomolar o-GlcNAcase inhibitors selective against lysosomal hexosaminidases. *Chemistry & Biology*, 17(11):1250–1255, November 2010b.
- Dos Santos A. *Identification de rÃ*© *gulateurs clÃ*© *s de la carcinogenÃ* "se hé *patique humaine : Etudes clinico-pathologiques, molÃ*© *culaires et fonction-nelles*. PhD thesis, Université Paris-Saclay, 2019.
- Dreyer C., Raymond E., and Faivre S. La voie de signalisation Pl3k/AKT/mTOR. *Cancero digest*, 1(3):187, 2009.
- Drickamer K. Evolution of ca2+ dependent animal lectins. pages 207–232, 1993.
- Drickamer K. and Fadden A. J. Genomic analysis of c-type lectins. *Biochemical Society Symposium*, 69:59–72, October 2002.

- Drougat L., Stichelen S. O.-V., Mortuaire M., Foulquier F., Lacoste A.-S., Michalski J.-C., Lefebvre T., and Vercoutter-Edouart A.-S. Characterization of o-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially o-GlcNAcylated proteins during g1/s transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*, 1820(12):1839–1848, December 2012.
- Du X., Edelstein D., Rossetti L., Fantus I. G., Goldberg H., Wu F. Z. J., and Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, October 2000.
- Duan F., Wu H., Jia D., Wu W., Ren S., Wang L., Song S., Guo X., Liu F., Ruan Y., and Gu J. O -GlcNAcylation of RACK1 promotes hepatocellular carcinogenesis. *Journal of Hepatology*, 68(6):1191–1202, June 2018.
- Duffield J. S., Forbes S. J., Constandinou C. M., Clay S., Partolina M., Vuthoori S., Wu S., Lang R., and Iredale J. P. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *Journal of Clinical Investigation*, 115 (1):56–65, January 2005.
- Duncan A. W., Dorrell C., and Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*, 137(2):466–481, August 2009.
- Dungan K. M., Buse J. B., and Ratner R. E. Effects of therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus with a peptide derived from islet neogenesis associated protein (INGAP). *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 25(6):558–565, September 2009.
- Duplan L. Lithostathine and pancreatitis-associated protein are involved in the very early stages of alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 22(1):79–88, January 2001.
- Dusetti N. J., Ortiz E. M., Mallo G. V., Dagorn J.-C., and Iovanna J. L. Pancreatitis-associated protein i (PAP i), an acute phase protein induced by cytokines. *Journal of Biological Chemistry*, 270(38):22417–22421, September 1995.
- Duvoux C., Roudot-Thoraval F., Decaens T., Pessione F., Badran H., Piardi T., Francoz C., Compagnon P., Vanlemmens C., Dumortier J., Dharancy S., Gugenheim J., Bernard P.-H., Adam R., Radenne S., Muscari F., Conti F., Hardwigsen J., Pageaux G.-P., Chazouilleres O., Salame E., Hilleret M.-N., Lebray P., Abergel A., Debette-Gratien M., Kluger M. D., Mallat A., Azoulay D., and Cherqui D. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: A model including alpha-fetoprotein improves the performance of milan criteria. *Gastroenterology*, 143(4):986–994.e3, October 2012.
- East L., Rushton S., Taylor M. E., and Isacke C. M. Characterization of sugar binding by the mannose receptor family member, endo180. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52):50469–50475, October 2002.
- Edvardson S., Ashikov A., Jalas C., Sturiale L., Shaag A., Fedick A., Treff N. R., Garozzo D., Gerardy-Schahn R., and Elpeleg O. Mutations in SLC35a3 cause autism spectrum disorder, epilepsy and arthrogryposis. *Journal of Medical Genetics*, 50 (11):733–739, September 2013.

- Eguchi H., Ishikawa O., Ohigashi H., Takahashi H., Yano M., Nishiyama K., Tomita Y., Uehara R., Takehara A., Nakamura Y., and Nakagawa H. Serum REG4 level is a predictive biomarker for the response to preoperative chemoradiotherapy in patients with pancreatic cancer. *Pancreas*, 38(7):791–798, October 2009.
- El-Serag H. B. and Rudolph K. L. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology*, 2007.
- Elsen N. L., Patel S. B., Ford R. E., Hall D. L., Hess F., Kandula H., Kornienko M., Reid J., Selnick H., Shipman J. M., Sharma S., Lumb K. J., Soisson S. M., and Klein D. J. Insights into activity and inhibition from the crystal structure of human o-GlcNAcase. *Nature Chemical Biology*, 13(6):613–615, March 2017.
- Etiemble J., Degott C., Renard C., Fourel G., Shamoon B., Vitvitski-Trépo L., Hsu T., Tiollais P., and Buendia C. B. M. Liver-specific expression and high oncogenic efficiency of a c-myc transgene activated by woodchuck hepatitis virus insertion. *Oncogene*, 9:727–737, March 1994.
- Facundo H. T., Brainard R. E., Watson L. J., Ngoh G. A., Hamid T., Prabhu S. D., and Jones S. P. O-GlcNAc signaling is essential for NFAT-mediated transcriptional reprogramming during cardiomyocyte hypertrophy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 302(10):H2122–H2130, May 2012.
- Fan B., Malato Y., Calvisi D. F., Naqvi S., Razumilava N., Ribback S., Gores G. J., Dombrowski F., Evert M., Chen X., and Willenbring H. Cholangiocarcinomas can originate from hepatocytes in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 122(8):2911–2915, August 2012.
- Fan H., Wang Y., Zhang X., Chen J., Zhou Q., Yu Z., Chen Y., Chen Z., Gu J., and Shi Y. Ginsenoside compound k ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like dermatitis through inhibiting REG3a/RegIllgamma expression in keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 515(4):665–671, August 2019.
- Fang B. and Miller M. W. Use of galactosyltransferase to assess the biological function of o-linked n-acetyl-d-glucosamine: A potential role for o-GlcNAc during cell division. *Experimental Cell Research*, 263(2):243–253, February 2001.
- Fernandez-Banet J., Lee N. P., Chan K. T., Gao H., Liu X., Sung W.-K., Tan W., Fan S. T., Poon R. T., Li S., Ching K., Rejto P. A., Mao M., and Kan Z. Decoding complex patterns of genomic rearrangement in hepatocellular carcinoma. *Genomics*, 103 (2-3):189–203, February 2014.
- Ferrara J. L. M., Harris A. C., Greenson J. K., Braun T. M., Holler E., Teshima T., Levine J. E., Choi S. W. J., Huber E., Landfried K., Akashi K., Lugt M. V., Reddy P., Chin A., Zhang Q., Hanash S., and Paczesny S. Regenerating islet-derived 3-alpha is a biomarker of gastrointestinal graft-versus-host disease. *Blood*, 118(25):6702–6708, October 2011.
- Ferrer C. M., Lynch T. P., Sodi V. L., Falcone J. N., Schwab L. P., Peacock D. L., Vocadlo D. J., Seagroves T. N., and Reginato M. J. O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Molecular Cell*, 54(5):820–831, June 2014.

- Ferron M., Persello A., Dhot J., Aillerie V., Erraud A., Riviere M., Tessier A., Lebreton J., Chatham J., Waard M. D., Gauthier C., Rozec B., and Lauzier B. O-GlcNAc stimulation is beneficial in septic shock models. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 10(2):243, April 2018.
- Fong J. J., Nguyen B. L., Bridger R., Medrano E. E., Wells L., Pan S., and Sifers R. N. beta-n-acetylglucosamine (o-GlcNAc) is a novel regulator of mitosis-specific phosphorylations on histone h3. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15):12195–12203, February 2012.
- Forbes S. J. and Parola M. Liver fibrogenic cells. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 25(2):207–217, April 2011.
- France S. P. Recommandations relatives A l'alimentation, A l'activitA© physique et A la sA©dentaritA© pour les adultes. Technical report, SantA© Publique France, 2019.
- Freund P., Kerenyi M. A., Hager M., Wagner T., Wingelhofer B., Pham H. T. T., Elabd M., Han X., Valent P., Gouilleux F., Sexl V., Krämer O. H., Groner B., and Moriggl R. O-GlcNAcylation of STAT5 controls tyrosine phosphorylation and oncogenic transcription in STAT5-dependent malignancies. *Leukemia*, 31(10):2132–2142, January 2017.
- Friedman S. L., Roll F. J., Boyles J., and Bissell D. M. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(24):8681–8685, December 1985.
- Frizell E., Liu S. L., Abraham A., Ozaki I., Eghbali M., Sage E. H., and Zern M. A. Expression of sparc in normal and fibrotic livers. *Hepatology*, 1995.
- Fujiwara Y., Hoon D. S. B., Yamada T., Umeshita K., Gotoh M., Sakon M., Nishisho I., and Monden M. PTEN/MMAC1 mutation and frequent loss of heterozygosity identified in chromosome 10q in a subset of hepatocellular carcinomas. *Japanese Journal of Cancer Research*, 91(3):287–292, March 2000.
- Gagliardino J., Zotto H. D., Massa L., Flores L., and Borelli M. Pancreatic duodenal homeobox-1 and islet neogenesis-associated protein: a possible combined marker of activateable pancreatic cell precursors. *Journal of Endocrinology*, 177(2):249–259, May 2003.
- Gailhouste L., Ezan F., Bessard A., Fremin C., Rageul J., Langouet S., and Baffet G. RNAi-mediated MEK1 knock-down prevents ERK1/2 activation and abolishes human hepatocarcinoma growthin vitroandin vivo. *International Journal of Cancer*, pages NA–NA, 2009.
- Gao Y., Wells L., Comer F. I., Parker G. J., and Hart G. W. DynamicO-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13):9838–9845, January 2001.
- Gao Y., Miyazaki J.-I., and Hart G. W. The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by o-linked n-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 b-cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 415(2):155–163, July 2003.

- Garred P., Genster N., Pilely K., Bayarri-Olmos R., Rosbjerg A., Ma Y. J., and Skjoedt M.-O. A journey through the lectin pathway of complement-MBL and beyond. *Immunological Reviews*, 274(1):74–97, October 2016.
- Gelatti U., Covolo L., Franceschini M., Pirali F., Tagger A., Ribero M. L., Trevisi P., Martelli C., Nardi G., and Donato F. Coffee consumption reduces the risk of hepatocellular carcinoma independently of its aetiology: a case-control study. *Journal of Hepatology*, 2005.
- Gewinner C., Hart G., Zachara N., Cole R., Beisenherz-Huss C., and Groner B. The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of stat5. *Journal of Biological Chemistry*, 279(5):3563–3572, November 2003.
- Ghazarian H., Idoni B., and Oppenheimer S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica*, 113(3):236–247, May 2011.
- Giaccia A. J. and Kastan M. B. The complexity of p53 modulation : emerging patterns from divergent signals. *Genes & Development*, 12(19) :2973–2983, October 1998.
- Gibbons M. A., MacKinnon A. C., Ramachandran P., Dhaliwal K., Duffin R., Phythian-Adams A. T., van Rooijen N., Haslett C., Howie S. E., Simpson A. J., Hirani N., Gauldie J., Iredale J. P., Sethi T., and Forbes S. J. Ly6chimonocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184(5):569–581, September 2011.
- Giles A. C., Desbois M., Opperman K. J., Tavora R., Maroni M. J., and Grill B. A complex containing the o-GlcNAc transferase OGT-1 and the ubiquitin ligase EEL-1 regulates GABA neuron function. *Journal of Biological Chemistry*, 294(17):6843–6856, March 2019.
- Gilgenkrantz H. Une seule cellule souche dans le foie : l'hépatocyte! *médecine/sciences*, 31(4):357–359, April 2015.
- Gironella M., Folch-Puy E., LeGoffic A., Garcia S., Christa L., Smith A., Tebar L., Hunt S. P., Bayne R., Smith A. J. H., Dagorn J.-C., Closa D., and Iovanna J. L. Experimental acute pancreatitis in PAP/HIP knock-out mice. *Gut*, 56(8):1091–1097, August 2007.
- Globocan. All cancers excl. non-melanoma skin cancer. *The Global Cancer Observatory*, March 2019a.
- Globocan. Liver. *The Global Cancer Observatory*, March 2019b.
- Gloster T. M., Zandberg W. F., Heinonen J. E., Shen D. L., Deng L., and Vocadlo D. J. Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nature Chemical Biology*, 7(3):174–181, January 2011.
- Gong C.-X., Liu F., and Iqbal K. O-GlcNAcylation: A regulator of tau pathology and neurodegeneration. *Alzheimer's & Dementia*, 12(10):1078–1089, October 2016.

- Goumard C., Desbois-Mouthon C., Wendum D., Calmel C., Merabtene F., Scatton O., and Praz F. Low levels of microsatellite instability at simple repeated sequences commonly occur in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Genomics & Proteomics*, 14(5), September 2017.
- Gourgiotis S., Moustafellos P., Zavos A., Dimopoulos N., Vericouki C., and Hadjiyannakis E. I. Surgical treatment of hepatic haemangiomas: a 15 year experience. *Journal of Surgery*, 2006.
- Graf R., Schiesser M., Lussi A., Went P., Scheele G., and Bimmler D. Coordinate regulation of secretory stress proteins (PSP/reg, PAP i, PAP II, and PAP III) in the rat exocrine pancreas during experimental acute pancreatitis. *Journal of Surgical Research*, 105(2):136–144, June 2002.
- Graf R., Schiesser M., Scheele G. A., Marquardt K., Frick T. W., Ammann R. W., and Bimmler D. A family of 16-kDa pancreatic secretory stress proteins form highly organized fibrillar structures upon tryptic activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (24):21028–21038, March 2001.
- Greensmith L. and Vrbova G. Motoneurone survival: a functional approach. *Trends in Neurosciences*, 19(11):450–455, November 1996.
- Greis K. D., Gibson W., and Hart G. W. Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (ul32) at serine 921 and serine 952. *Journal of Virology*, 68(12):8339–8349, 1994.
- Greten T. F., Papendorf F., Bleck J. S., Kirchhoff T., Wohlberedt T., Kubicka S., Klempnauer J., Galanski M., and Manns M. P. Survival rate in patients with hepatocellular carcinoma: a retrospective analysis of 389 patients. *British Journal of Cancer*, 92 (10):1862–1868, May 2005.
- Griffith L. S. and Schmitz B. O-linked n-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to pertubations of phosphorylation. *European Journal of Biochemistry*, 262(3):824–831, June 1999.
- Griffith L. and Schmitz B. O-linked n-acetylglucosamine is upregulated in alzheimer brains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 213(2):424–431, August 1995.
- Gross B. J., Kraybill B. C., and Walker S. Discovery of O-GlcNAc transferase inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*, 127(42):14588–14589, October 2005.
- Gross J., Carlson R. I., Brauer A. W., Margolies M. N., Warshaw A. L., and Wands J. R. Isolation, characterization, and distribution of an unusual pancreatic human secretory protein. *Journal of Clinical Investigation*, 76(6):2115–2126, December 1985.
- Gu Y., Mi W., Ge Y., Liu H., Fan Q., Han C., Yang J., Han F., Lu X., and Yu W. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Research*, 70 (15):6344–6351, July 2010.
- Guichard C., Amaddeo G., Imbeaud S., Ladeiro Y., Pelletier L., Maad I. B., Calderaro J., Bioulac-Sage P., Letexier M., Degos F., Clément B., Balabaud C., Chevet E., Laurent

- A., Couchy G., Letouzé E., Calvo F., and Zucman-Rossi J. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*, 44(6):694–698, May 2012.
- Guinez C., Filhoulaud G., Rayah-Benhamed F., Marmier S., Dubuquoy C., Dentin R., Moldes M., Burnol A.-F., Yang X., Lefebvre T., Girard J., and Postic C. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes*, 60(5):1399–1413, April 2011.
- Guinez C., Mir A.-M., Dehennaut V., Cacan R., Harduin-Lepers A., Michalski J.-C., and Lefebvre T. Protein ubiquitination is modulated by o-GlcNAc glycosylation. *The FASEB Journal*, 22(8):2901–2911, August 2008.
- GUO K., GAN L., ZHANG S., CUI F. J., CUN W., LI Y., KANG N. X., GAO M. D., and LIU K. Y. Translocation of HSP27 into liver cancer cell nucleus may be associated with phosphorylation and o-GlcNAc glycosylation. *Oncology Reports*, 28(2):494–500, June 2012.
- Gurr W., Yavari R., Wen L., Shaw M., Mora C., Christa L., and Sherwin R. S. A reg family protein is overexpressed in islets from a patient with new-onset type 1 diabetes and acts as t-cell autoantigen in NOD mice. *Diabetes*, 51(2):339–346, February 2002.
- Gurr W., Shaw M., Li Y., and Sherwin R. RegII is a b-cell protein and autoantigen in diabetes of NOD mice. *Diabetes*, 56(1):34–40, December 2006.
- Gurr W. The Role of Reg Proteins, a Family of Secreted C-Type Lectins, in Islet Regeneration and as Autoantigens in Type 1 Diabetes. InTech, November 2011.
- Ha J. R., Hao L., Venkateswaran G., Huang Y. H., Garcia E., and Persad S. beta-catenin is o-GlcNAc glycosylated at serine 23: Implications for beta-catenin's sub-cellular localization and transactivator function. *Experimental Cell Research*, 321(2): 153–166, February 2014.
- Haberhausen G., Schmitt I., and Koehler A. Assignment of the dystonia-parkinsonism syndrome locus, dyt3, to a small region within a 1.8-mb yac contig of xq13.1. *American Journal of Human Genetics*, 57(3), 9 1995.
- Haldipur P., Dupuis N., Degos V., Moniaux N., Chhor V., Rasika S., Schwendimann L., le Charpentier T., Rougier E., Amouyal P., Amouyal G., Dournaud P., Bréchot C., Ghouzzi V. E., Faivre J., Fleiss B., Mani S., and Gressens P. HIP/PAP prevents excitotoxic neuronal death and promotes plasticity. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 1(10):739–754, October 2014.
- Haltiwanger R. S., Holt G. D., and Hart G. W. Enzymatic addition of o-glcnac to nuclear and cytoplasmic proteins. identification of a uridine diphosphonacetylglucosamine:peptide beta-n-acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 265(5):2563–2568, 1990.
- Haltiwanger R. S., Blomberg M. A., and Hart G. W. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. purification and characterization of a uridine diphosphonacetylglucosamine:polypeptide beta-n-acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(13):9005–9013, 1992.

- Han Y.-P., Yan C., Zhou L., Qin L., and Tsukamoto H. A matrix metalloproteinase-9 activation cascade by hepatic stellate cells in trans-differentiation in the three-dimensional extracellular matrix. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17):12928–12939, February 2007.
- Hann S. R. and Eisenman R. N. Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Molecular and Cellular Biology*, 4(11): 2486–2497, November 1984.
- Hanover J. A., Cohen C. K., Willingham M. C., and Park M. K. O-linked n-acetylglucosamine is attached to proteins of the nuclear pore. evidence for cytoplasmic and nucleoplasmic glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 262(20): 9887–94, 1987.
- Hanover J. A., Yu S., Lubas W. B., Shin S.-H., Ragano-Caracciola M., Kochran J., and Love D. C. Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of o-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 409(2):287–297, January 2003.
- Hara K., Fukui H., Sun C., Kitayama Y., Eda H., Yamasaki T., Kondo T., Tomita T., Oshima T., Watari J., Fujimori T., and Miwa H. Effect of REG ialpha protein on angiogenesis in gastric cancer tissues. *Oncology Reports*, 33(5):2183–2189, March 2015.
- Harris K., Kassis A., Major G., and Chou C. J. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *Journal of Obesity*, 2012.
- Hart G. W., Greis K. D., Dong L.-Y. D., Blomberg M. A., Chou T.-Y., Jiang M.-S., Roquemore E. P., Snow D. M., Kreppel L. K., Cole R. N., Comer F. I., Arnold C. S., and Hayes B. K. *O-Linked N-Acetylglucosamine : The "Yin-Yang" of Ser/Thr Phosphorylation?* Springer US, 1995.
- Hart G. W., Slawson C., Ramirez-Correa G., and Lagerlof O. Cross talk between o-GlcNAcylation and phosphorylation: Roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1):825–858, July 2011.
- Hartupee J., Zhang H., Bonaldo M., Soares M., and Dieckgraefe B. Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel member of the human regenerating protein family: Reg IV. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Gene Structure and Expression*, 1518(3):287–293, April 2001.
- Hashim O. H., Jayapalan J. J., and Lee C.-S. Lectins: an effective tool for screening of potential cancer biomarkers. *PeerJ*, 5:e3784, September 2017.
- Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J. W., Thurston G., Roberge S., Jain R. K., and McDonald D. M. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *The American Journal of Pathology*, 156(4):1363–1380, April 2000.
- Hayashidani S., Tsutsui H., Shiomi T., Ikeuchi M., Matsusaka H., Suematsu N., Wen J., Egashira K., and Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation*, 108(17):2134–2140, October 2003.

- Heckel D., Comtesse N., Brass N., Blin N., Zang K. D., and Meese E. Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Human Molecular Genetics*, 7(12):1859–1872, November 1998.
- Heim M. H. and Thimme R. Innate and adaptive immune responses in HCV infections. *Journal of Hepatology*, 61(1):S14–S25, November 2014.
- Hellerbrand C., Pöppl A., Hartmann A., Schölmerich J., and Lock G. Hfe c282y heterozygosity in hepatocellular carcinoma: evidence for an increased prevalence. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2003.
- Herencia C., Martinez-Moreno J. M., Herrera C., Corrales F., Santiago-Mora R., Espejo I., Barco M., Almaden Y., de la Mata M., Rodriguez-Ariza A., and Munoz-Castaneda J. R. Nuclear translocation of beta-catenin during mesenchymal stem cells differentiation into hepatocytes is associated with a tumoral phenotype. *PLoS ONE*, 7(4): e34656, April 2012.
- Hewagama A., Gorelik G., Patel D., Liyanarachchi P., McCune W. J., Somers E., Gonzalez-Rivera T., Cohort T. M. L., Strickland F., and Richardson B. Overexpression of x-linked genes in t cells from women with lupus. *Journal of Autoimmunity*, 41:60–71, March 2013.
- Heymann F., Trautwein C., and Tacke F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, 8(4):307–318, September 2009.
- Hida K., Hida Y., Amin D. N., Flint A. F., Panigrahy D., Morton C. C., and Klagsbrun M. Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Research*, 64(22):8249–8255, November 2004.
- Ho M.-R., Lou Y.-C., Lin W.-C., Lyu P.-C., Huang W.-N., and Chen C. Human pancreatitis-associated protein forms fibrillar aggregates with a native-like conformation. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44):33566–33576, September 2006.
- Ho S.-R., Wang K., Whisenhunt T. R., Huang P., Zhu X., Kudlow J. E., and Paterson A. J. O-GlcNAcylation enhances FOXO4 transcriptional regulation in response to stress. *FEBS Letters*, 584(1):49–54, November 2009.
- Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., and Harris C. p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015):49–53, July 1991.
- Homayounfar K., Schwarz A., Enders C., Cameron S., Baumhoer D., Ramadori G., Lorf T., Gunawan B., and Sander B. Etiologic influence on chromosomal aberrations in european hepatocellular carcinoma identified by CGH. *Pathology Research and Practice*, 209(6):380–387, June 2013.
- Hoshida Y., Villanueva A., Kobayashi M., Peix J., Chiang D. Y., Camargo A., Gupta S., Moore J., Wrobel M. J., Lerner J., Reich M., Chan J. A., Glickman J. N., Ikeda K., Hashimoto M., Watanabe G., Daidone M. G., Roayaie S., Schwartz M., Thung S., Salvesen H. B., Gabriel S., Mazzaferro V., Bruix J., Friedman S. L., Kumada H., Llovet J. M., and Golub T. R. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359(19):1995–2004, November 2008.

- Hoshida Y., Toffanin S., Lachenmayer A., Villanueva A., Minguez B., and Llovet J. Molecular classification and novel targets in hepatocellular carcinoma: Recent advancements. *Seminars in Liver Disease*, 30(01):035–051, February 2010.
- Housley M. P., Rodgers J. T., Udeshi N. D., Kelly T. J., Shabanowitz J., Hunt D. F., Puigserver P., and Hart G. W. O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24):16283–16292, April 2008a.
- Housley M. P., Udeshi N. D., Rodgers J. T., Shabanowitz J., Puigserver P., Hunt D. F., and Hart G. W. A PGC-1a-o-GlcNAc transferase complex regulates FoxO transcription factor activity in response to glucose. *Journal of Biological Chemistry*, 284(8): 5148–5157, December 2008b.
- Hoyer S. Causes and Consequences of Disturbances of Cerebral Glucose Metabolism in Sporadic Alzheimer Disease: Therapeutic Implications. Springer US, 2004.
- Hurtado-Guerrero R., Dorfmueller H. C., and van Aalten D. M. Molecular mechanisms of o-GlcNAcylation. *Current Opinion in Structural Biology*, 18(5):551–557, October 2008.
- Hussain S. M., Terkivatan T., Zondervan P. E., Lanjouw E., de Rave S., IJzermans J. N. M., and de Man R. A. Focal nodular hyperplasia: Findings at state-of-the-art mr imaging, us, ct, and pathologic analysis. *RadioGraphics*, 2004.
- IARC. A review of human carcinogens. IARC Monographs, 2012.
- Iba K., Durkin M. E., Johnsen L., Hunziker E., Damgaard-Pedersen K., Zhang H., Engvall E., Albrechtsen R., and Wewer U. M. Mice with a targeted deletion of the tetranectin gene exhibit a spinal deformity. *Molecular and Cellular Biology*, 21(22): 7817–7825, November 2001.
- Iba K., Abe Y., Chikenji T., Kanaya K., Chiba H., Sasaki K., Dohke T., Wada T., and Yamashita T. Delayed fracture healing in tetranectin-deficient mice. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 31(4):399–408, April 2013.
- lerardi E., Rosania R., Zotti M., Giorgio F., Prencipe S., Valle N. D., Francesco V. D., and Panella C. From chronic liver disorders to hepatocellular carcinoma: Molecular and genetic pathways. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 2(6):259, 2010.
- INCA. Alcool, 2019. URL https://www.e-cancer.fr/Comprendre-prevenir-depister/Reduire-les-risques-de-cancer/Alcool.
- Indramanee S., Silsirivanit A., Pairojkul C., Wongkham C., and Wongkham S. Aberrant glycosylation in cholangiocarcinoma demonstrated by lectin-histochemistry. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2012.
- Inoue Y., Moriwaki K., Ueda Y., Takeuchi T., Higuchi K., and Asahi M. Elevated o-GlcNAcylation stabilizes FOXM1 by its reduced degradation through GSK-3b inactivation in a human gastric carcinoma cell line, MKN45 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(2):1681–1687, January 2018.
- lovanna J., Orelle B., Keim V., and Dagorn J. C. Messenger rna sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (36):24664–9, 1991.

- Ishizaki Y., Ikeda S., Fujimori M., Shimizu Y., Kurihara T., Itamoto T., Kikuchi A., Oka-jima M., and Asahara T. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. *International Journal of Oncology*, May 2004.
- Issad T., Masson E., and Pagesy P. O-glcnac modification, insulin signaling and diabetic complications. *Diabetes & Metabolism*, 36(6):423–435, December 2010.
- Issad T. O-glcnac glycosylation et regulation de la signalisation cellulaire. *mede-cine/sciences*, 26(8-9):753–759, August 2010.
- Itkonen H. M., Minner S., Guldvik I. J., Sandmann M. J., Tsourlakis M. C., Berge V., Svindland A., Schlomm T., and Mills I. G. O-GlcNAc transferase integrates metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 73(16):5277–5287, May 2013.
- Itkonen H. M., Urbanucci A., Martin S. E., Khan A., Mathelier A., Thiede B., Walker S., and Mills I. G. High OGT activity is essential for MYC-driven proliferation of prostate cancer cells. *Theranostics*, 9(8):2183–2197, 2019.
- Iyer S. P. N. and Hart G. W. Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(27):24608–24616, April 2003.
- J Gong L. J. Glutamine induces heat shock protein 70 expression via o-glcnac modification and subsequent increased expression and transcriptional activity of heat shock factor-1. *Minerva Anestesiologia*, 2011.
- Jacobsen K. T. and Iverfeldt K. O-GlcNAcylation increases non-amyloidogenic processing of the amyloid-beta precursor protein (APP). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 404(3):882–886, January 2011.
- Jamal A.-M., Lipsett M., Sladek R., Laganiere S., Hanley S., and Rosenberg L. Morphogenetic plasticity of adult human pancreatic islets of langerhans. *Cell Death & Differentiation*, 12(7):702–712, April 2005.
- Janevska D., Chaloska-Ivanova V., and Janevski V. Hepatocellular carcinoma: Risk factors, diagnosis and treatment. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2015.
- Jebali J., Fakhfekh E., Morgen M., Srairi-Abid N., Majdoub H., Gargouri A., Ayeb M. E., Luis J., Marrakchi N., and Sarray S. Lebecin, a new c-type lectin like protein from macrovipera lebetina venom with anti-tumor activity against the breast cancer cell line MDA-MB231. *Toxicon*, 86:16–27, August 2014.
- Ji T., Li G., Chen J., Zhao J., Li X., Lin H., Cai X., and Cang Y. Distinct role of interleukin-6 and tumor necrosis factor receptor-1 in oval cell- mediated liver regeneration and inflammation-associated hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, 7(41), August 2016.
- Jia D., Wei L., Guo W., Zha R., Bao M., Chen Z., Zhao Y., Ge C., Zhao F., Chen T., Yao M., Li J., Wang H., Gu J., and He X. Genome-wide copy number analyses identified novel cancer genes in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2011.

- Jiang Q.-L., Zhang S., Tian M., Zhang S.-Y., Xie T., Chen D.-Y., Chen Y.-J., He J., Liu J., Ouyang L., and Jiang X. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Proliferation*, 48(1): 17–28, December 2014.
- Jiang Z., Liu Y., Li C., Chang L., Wang W., Wang Z., Gao X., Ryffel B., Wu Y., and Lai Y. IL-36gamma induced by the TLR3-SLUG-VDR axis promotes wound healing via REG3a. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(12):2620–2629, December 2017.
- Jing D., Kehoe D. E., and Tzanakakis E. S. Expression of reg family proteins in embryonic stem cells and its modulation by wnt/beta-catenin signaling. *Stem Cells and Development*, 19(9):1307–1319, September 2010.
- Jopling C. L. Modulation of hepatitis c virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*, 309(5740):1577–1581, September 2005.
- Jungermann K. and Keitzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annual Review of Nutrition*, 16(1):179–203, July 1996.
- Junttila M. R. and de Sauvage F. J. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature*, 501(7467):346–354, September 2013.
- K. F., M.D. O. H., Takahashi K., H. N., Y. F., T. K., H. Y., and I. S. Non-pathogenic bacteria modulate colonic epithelial gene expression in germ-free mice. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 38(6):626–634, January 2003.
- Kaasik K., Kivimäe S., Allen J. J., Chalkley R. J., Huang Y., Baer K., Kissel H., Burlingame A. L., Shokat K. M., Ptáček L. J., and Fu Y.-H. Glucose sensor o-GlcNAcylation coordinates with phosphorylation to regulate circadian clock. *Cell Metabolism*, 17(2): 291–302, February 2013.
- Kakihana K., Fujioka Y., Suda W., Najima Y., Kuwata G., Sasajima S., Mimura I., Morita H., Sugiyama D., Nishikawa H., Hattori M., Hino Y., Ikegawa S., Yamamoto K., Toya T., Doki N., Koizumi K., Honda K., and Ohashi K. Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease of the gut. *Blood*, 128(16):2083–2088, July 2016.
- Kamigaito T., Okaneya T., Kawakubo M., Shimojo H., Nishizawa O., and Nakayama J. Overexpression of o-GlcNAc by prostate cancer cells is significantly associated with poor prognosis of patients. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 17(1):18–22, December 2013.
- Kan Z., Zheng H., Liu X., Li S., Barber T. D., Gong Z., Gao H., Hao K., Willard M. D., Xu J., Hauptschein R., Rejto P. A., Fernandez J., Wang G., Zhang Q., Wang B., Chen R., Wang J., Lee N. P., Zhou W., Lin Z., Peng Z., Yi K., Chen S., Li L., Fan X., Yang J., Ye R., Ju J., Wang K., Estrella H., Deng S., Wei P., Qiu M., Wulur I. H., Liu J., Ehsani M. E., Zhang C., Loboda A., Sung W. K., Aggarwal A., Poon R. T., Fan S. T., Wang J., Hardwick J., Reinhard C., Dai H., Li Y., Luk J. M., and Mao M. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma. *Genome Research*, 23(9):1422–1433, June 2013.

- Kang K. A., Lee K. H., Chae S., Zhang R., Jung M. S., Lee Y., Kim S. Y., Kim H. S., Joo H. G., Park J. W., Ham Y. M., Lee N. H., and Hyun J. W. Eckol isolated from Ecklonia cavaattenuates oxidative stress induced cell damage in lung fibroblast cells. *FEBS Letters*, 579(28):6295–6304, October 2005.
- Karlmark K. R., Weiskirchen R., Zimmermann H. W., Gassler N., Ginhoux F., Weber C., Merad M., Luedde T., Trautwein C., and Tacke F. Hepatic recruitment of the inflammatory gr1+ monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology*, 50(1):261–274, March 2009.
- Katsumata N., Chakraborty C., Myal Y., Schroedter I. C., Murphy L. J., Shiu R. P., and Friesen H. G. Molecular cloning and expression of peptide 23, a growth hormone-releasing hormone-inducible pituitary protein. *Endocrinology*, 136(4):1332–1339, April 1995.
- Kawashima R., Mochida S., Matsui A., YouLuTuZ Y., Ishikawa K., Toshima K., Yamanobe F., Inao M., Ikeda H., Ohno A., Nagoshi S., Uede T., and Fujiwara K. Expression of osteopontin in kupffer cells and hepatic macrophages and stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: A possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 256(3):527–531, March 1999.
- Kazemi Z., Chang H., Haserodt S., McKen C., and Zachara N. E. O-linked beta-n-acetylglucosamine (o-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3beta-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 285(50): 39096–39107, October 2010.
- Kazumori H., Ishihara S., Fukuda R., and Kinoshita Y. Localization of reg receptor in rat fundic mucosa. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 139(2):101–108, February 2002.
- Keembiyehetty C. N., Krzeslak A., Love D. C., and Hanover J. A. A lipid-droplet-targeted o-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *Journal of Cell Science*, 124(16):2851–2860, August 2011.
- Keembiyehetty C., Love D. C., Harwood K. R., Gavrilova O., Comly M. E., and Hanover J. A. Conditional knock-out reveals a requirement for O-Linked Nacetylglucosaminase (o-GlcNAcase) in metabolic homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*, 290(11):7097–7113, January 2015.
- Keilbaugh S. A. Activation of RegIIIb/g and interferon g expression in the intestinal tract of SCID mice: an innate response to bacterial colonisation of the gut. *Gut*, 54(5): 623–629, May 2005.
- Keim V., Rohr G., Stockert H., and Haberich F. An additional secretory protein in the rat pancreas. *Digestion*, 29(4):242–249, 1984.
- Keim V., Iovanna J.-L., Rohr G., Usadel K. H., and Dagorn J.-C. Characterization of a rat pancreatic secretory protein associated with pancreatitis. *Gastroenterology*, 100 (3):775–782, 1991.
- Kelly W. G., Dahmus M. E., and Hart G. W. Rna polymerase ii is a glycoprotein. modification of the cooh-terminal domain by o-glcnac. *Journal of Biological Chemistry*, 268(14):10416–10424, 1993.

- Kelly W. G. and Hart G. W. Glycosylation of chromosomal proteins: Localization of o-linked n-acetylglucosamine in drosophila chromatin. *Cell*, 57(2):243–251, April 1989.
- Khan S. A., Tavolari S., and Brandi G. Cholangiocarcinoma: Epidemiology and risk factors. *Liver International*, 2019.
- 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. Probing the dynamics of o-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nature Chemical Biology*, 3(6):339–348, May 2007.
- Kim W., Bennett E. J., Huttlin E. L., Guo A., Li J., Possemato A., Sowa M. E., Rad R., Rush J., Comb M. J., Harper J. W., and Gygi S. P. Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Molecular Cell*, 44(2):325–340, October 2011.
- Kimura N., Yonekura H., Okamofo H., and Nagura H. Expression of human regenerating gene mRNA and its product in normal and neoplastic human pancreas. *Cancer*, 70(7):1857–1863, October 1992.
- Klatskin G. Adenocarcinoma of the hepatic duct at its bifurcation within the porta hepatis. *The American Journal of Medicine*, 38(2):241–256, February 1965.
- Knittel T., Kobold D., Saile B., Grundmann A., Neubauer K., Piscaglia F., and Ramadori G. Rat liver myofibroblasts and hepatic stellate cells: Different cell populations of the fibroblast lineage with fibrogenic potential. *Gastroenterology*, 117(5):1205–1221, November 1999.
- Kobayashi S., Akiyama T., Nata K., Abe M., Tajima M., Shervani N. J., Unno M., Matsuno S., Sasaki H., Takasawa S., and Okamoto H. Identification of a receptor for reg (regenerating gene) protein, a pancreatic beta-cell regeneration factor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15):10723–10726, April 2000.
- Kojiro M., Yano H., and Nakashima O. Pathology of early hepatocellular carcinoma: Progression from early to advanced. *Seminars in Surgical Oncology*, 12(3):197–203, May 1996.
- Kokuryo T., Yokoyama Y., and Nagino M. Recent advances in cancer stem cell research for cholangiocarcinoma. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 19(6):606–613, August 2012.
- Kondo Y. Genetic instability and aberrant DNA methylation in chronic hepatitis and cirrhosis. a comprehensive study of loss of heterozygosity and microsatellite instability at 39 loci and DNA hypermethylation on 8 CpG islands in microdissected specimens from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 32(5):970–979, November 2000.
- Konrad R. J., Zhang F., Hale J. E., Knierman M. D., Becker G. W., and Kudlow J. E. Alloxan is an inhibitor of the enzyme o-linked n-acetylglucosamine transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(1):207–212, April 2002.

- Kors S., Geijtenbeek K., Reits E., and Schipper-Krom S. Regulation of proteasome activity by (post-)transcriptional mechanisms. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, July 2019.
- Kreppel L. K. and Hart G. W. Regulation of a cytosolic and nuclear o-glcnac transferase: Role of the tetratricopeptide repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 274 (45):32015–32022, 1999.
- Kreppel L. K., Blomberg M. A., and Hart G. W. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: Cloning and characterization of a unique o-glcnac transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 272(14): 9308–9315, 1997.
- Krzeslak. Elevation of nucleocytoplasmic beta-n-acetylglucosaminidase (o-GlcNAcase) activity in thyroid cancers. *International Journal of Molecular Medicine*, 25(4), March 2010.
- Krzeslak A., Forma E., Bernaciak M., Romanowicz H., and Bryś M. Gene expression of o-GlcNAc cycling enzymes in human breast cancers. *Clinical and Experimental Medicine*, 12(1):61–65, May 2011.
- Kubota Y., Fujioka K., and Takekawa M. WGA-based lectin affinity gel electrophoresis: A novel method for the detection of o-GlcNAc-modified proteins. *PLOS ONE*, 12(7): e0180714, July 2017.
- Kudo M., Finn R. S., Qin S., Han K.-H., Ikeda K., Piscaglia F., Baron A., Park J.-W., Han G., Jassem J., Blanc J. F., Vogel A., Komov D., Evans T. R. J., Lopez C., Dutcus C., Guo M., Saito K., Kraljevic S., Tamai T., Ren M., and Cheng A.-L. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *The Lancet*, 391(10126): 1163–1173, March 2018.
- Kulis M. and Esteller M. DNA Methylation and Cancer. Elsevier, 2010.
- Kulshrestha R., Burton-Jones S., Antoniadi T., Rogers M., Jaunmuktane Z., Brandner S., Kiely N., Manuel R., and Willis T. Deletion of p2 promoter of GJB1 gene a cause of charcot-marie-tooth disease. *Neuromuscular Disorders*, 27(8):766–770, August 2017.
- Kusenda B., Mraz M., Mayer J., and Pospisilova S. MicroRNA BIOGENESIS, FUNC-TIONALITY AND CANCER RELEVANCE. *Biomedical Papers*, 150(2):205–215, December 2006.
- Kwei K. A., Baker J. B., and Pelham R. J. Modulators of sensitivity and resistance to inhibition of PI3k identified in a pharmacogenomic screen of the NCI-60 human tumor cell line collection. *PLoS ONE*, 7(9):e46518, September 2012.
- Laarse S. A. M., Leney A. C., and Heck A. J. R. Crosstalk between phosphorylation and o-glcNAcylation: friend or foe. *The FEBS Journal*, 285(17):3152–3167, May 2018.
- Labokha A. A., Gradmann S., Frey S., Hülsmann B. B., Urlaub H., Baldus M., and Görlich D. Systematic analysis of barrier-forming FG hydrogels from xenopus nuclear pore complexes. *The EMBO Journal*, 32(2):204–218, November 2012.

- Laczy B., Hill B. G., Wang K., Paterson A. J., White C. R., Xing D., Chen Y.-F., Darley-Usmar V., Oparil S., and Chatham J. C. Protein o-GlcNAcylation: a new signaling paradigm for the cardiovascular system. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 296(1):H13–H28, January 2009.
- Lai C.-Y., Liu H., Tin K. X., Huang Y., Yeh K.-H., Peng H. W., Chen H.-D., He J.-Y., Chiang Y.-J., Liu C.-S., Weng S.-Y., Tao M.-H., Yen J. J.-Y., and Yang-Yen H.-F. Identification of UAP1I1 as a critical factor for protein o-GlcNAcylation and cell proliferation in human hepatoma cells. *Oncogene*, 38(3):317–331, August 2018.
- Lai Y., Li D., Li C., Muehleisen B., Radek K. A., Park H. J., Jiang Z., Li Z., Lei H., Quan Y., Zhang T., Wu Y., Kotol P., Morizane S., Hata T. R., Iwatsuki K., Tang C., and Gallo R. L. The antimicrobial protein REG3a regulates keratinocyte proliferation and differentiation after skin injury. *Immunity*, 37(1):74–84, July 2012.
- Lan F.-F., Wang H., Chen Y.-C., Chan C.-Y., Ng S. S., Li K., Xie D., He M.-L., Lin M. C., and Kung H.-F. Hsa-let-7g inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by downregulation of c-myc and upregulation of p16ink4a. *International Journal of Cancer*, 128(2):319–331, March 2010.
- Lasserre C., Christa L., Simon M., Vernier P., and Brechot C. A novel gene (hip) activated in human primary liver cancer. *Cancer research*, 52(18), September 1992.
- Lasserre C., Simon M.-T., Ishikawa H., Diriong S., Nguyen V. C., Christa L., Vernier P., and Brechot C. Structural organization and chromosomal localization of a human gene (HIP/PAP) encoding a c-type lectin overexpressed in primary liver cancer. *European Journal of Biochemistry*, 224(1):29–38, August 1994.
- Lasserre C., Colnot C., Brechot C., and Poirier F. HIP/PAP gene, encoding a c-type lectin overexpressed in primary liver cancer, is expressed in nervous system as well as in intestine and pancreas of the postimplantation mouse embryo. *The American Journal of Pathology*, 154(5):1601–1610, May 1999.
- Lau E. Y. T., Lo J., Cheng B. Y. L., Ma M. K. F., Lee J. M. F., Ng J. K. Y., Chai S., Lin C. H., Tsang S. Y., Ma S., Ng I. O. L., and Lee T. K. W. Cancer-associated fibroblasts regulate tumor-initiating cell plasticity in hepatocellular carcinoma through c-met/FRA1/HEY1 signaling. *Cell Reports*, 15(6):1175–1189, May 2016.
- Laurine E., Gregoire C., Fandrich M., Engemann S., Marchal S., Thion L., Mohr M., Monsarrat B., Michel B., Dobson C. M., Wanker E., Erard M., and Verdier J.-M. Lithostathine quadruple-helical filaments form proteinase k-resistant deposits in creutzfeldt-jakob disease. *Journal of Biological Chemistry*, 278(51):51770–51778, September 2003.
- Laurine E., Manival X., Montgelard C., Bideau C., Berge-Lefranc J.-L., Erard M., and Verdier J.-M. PAP IB, a new member of the reg gene family: Cloning, expression, structural properties, and evolution by gene duplication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Gene Structure and Expression*, 1727(3):177–187, March 2005.
- Lawrance I. C. Ulcerative colitis and crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Human Molecular Genetics*, 10 (5):445–456, March 2001.

- Lazarus M. B., Nam Y., Jiang J., Sliz P., and Walker S. Structure of human o-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature*, 469(7331):564–567, January 2011.
- Le Roy T., Llopis M., Lepage P., Bruneau A., Rabot S., Bevilacqua C., Martin P., Philippe C., Walker F., Bado A., Perlemuter G., A.-M. C.-D., and Gerard P. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut*, 2012.
- Ledee D., Smith L., Bruce M., Kajimoto M., Isern N., Portman M. A., and Olson A. K. c-myc alters substrate utilization and o-GlcNAc protein posttranslational modifications without altering cardiac function during early aortic constriction. *PLOS ONE*, 10(8): e0135262, August 2015.
- Lee J.-S., Chu I.-S., Heo J., Calvisi D. F., Sun Z., Roskams T., Durnez A., Demetris A. J., and Thorgeirsson S. S. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology*, 40(3):667–676, September 2004.
- Lee M. K., Shaffer J. R., Leslie E. J., Orlova E., Carlson J. C., Feingold E., Marazita M. L., and Weinberg S. M. Genome-wide association study of facial morphology reveals novel associations with FREM1 and PARK2. *PLOS ONE*, 12(4):e0176566, April 2017.
- Lefebvre T., Planque N., Leleu D., Bailly M., Caillet-Boudin M.-L., Saule S., and Michalski J.-C. O-glycosylation of the nuclear forms of pax-6 products in quail neuroretina cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85(1):208–218, 2002.
- Lehman D. M., Fu D.-J., Freeman A. B., Hunt K. J., Leach R. J., Johnson-Pais T., Hamlington J., Dyer T. D., Arya R., Abboud H., Goring H. H., Duggirala R., Blangero J., Konrad R. J., and Stern M. P. A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding o-GlcNAc-selective n-acetyl-b-d glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in mexican americans. *Diabetes*, 54(4):1214–1221, March 2005.
- Lehotzky R. E., Partch C. L., Mukherjee S., Cash H. L., Goldman W. E., Gardner K. H., and Hooper L. V. Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17):7722–7727, April 2010a.
- Lehotzky R. E., Partch C. L., Mukherjee S., Cash H. L., Goldman W. E., Gardner K. H., and Hooper L. V. Molecular basis for peptidoglycan recognition by a bactericidal lectin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(17):7722–7727, April 2010b.
- Lei H.-Y. and Chang C.-P. Lectin of concanavalin a as an anti-hepatoma therapeutic agent. *Journal of Biomedical Science*, 16(1):10, 2009.
- Lennard K. S., Goosen R. W., and Blackburn J. M. Bacterially-associated transcriptional remodelling in a distinct genomic subtype of colorectal cancer provides a plausible molecular basis for disease development. *PLOS ONE*, 11(11):e0166282, November 2016.

- Leon D. D., Farzad C., Crutchlow M. F., Brestelli J., Tobias J., Kaestner K. H., and Stoffers D. A. Identification of transcriptional targets during pancreatic growth after partial pancreatectomy and exendin-4 treatment. *Physiological Genomics*, 24(2): 133–143, February 2006.
- Lepreux S. and Desmouliere A. Human liver myofibroblasts during development and diseases with a focus on portal (myo)fibroblasts. *Frontiers in Physiology*, 6, June 2015.
- Ler S. Y., Leung C. H. W., Khin L. W., Lu G.-D., Salto-Tellez M., Hartman M., Iau P. T. C., Yap C. T., and Hooi S. C. HDAC1 and HDAC2 independently predict mortality in hepatocellular carcinoma by a competing risk regression model in a southeast asian population. *Oncology Reports*, 34(5):2238–2250, September 2015.
- Li B., Li H., Hu C.-W., and Jiang J. Structural insights into the substrate binding adaptability and specificity of human o-GlcNAcase. *Nature Communications*, 8(1), September 2017a.
- Li D., Mallory T., and Satomura S. AFP-I3: a new generation of tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, 313(1-2):15–19, November 2001.
- Li M.-D., Ruan H.-B., Hughes M. E., Lee J.-S., Singh J. P., Jones S. P., Nitabach M. N., and Yang X. O-GlcNAc signaling entrains the circadian clock by inhibiting BMAL1/CLOCK ubiquitination. *Cell Metabolism*, 17(2):303–310, February 2013.
- Li Q., Liu J.-L., and Gao Z.-H. REG3-beta plays a key role in IL17ra protumoral effect. *Cancer Research*, 76(7):2050–2050, March 2016.
- Li X., Zhang Z., Li L., Gong W., Lazenby A. J., Swanson B. J., Herring L. E., Asara J. M., Singer J. D., and Wen H. Myeloid-derived cullin 3 promotes STAT3 phosphorylation by inhibiting OGT expression and protects against intestinal inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, 214(4):1093–1109, March 2017b.
- Li Y. H., Liu X., Vanselow J. T., Zheng H., Schlosser A., and Chiu J. C. O-GlcNAcylation of PERIOD regulates its interaction with CLOCK and timing of circadian transcriptional repression. *PLOS Genetics*, 15(1):e1007953, January 2019.
- Lieu H.-T., Batteux F., Simon M.-T., Cortes A., Nicco C., Zavala F., Pauloin A., Tralhao J. G., Soubrane O., Weill B., Bréchot C., and Christa L. HIP/PAP accelerates liver regeneration and protects against acetaminophen injury in mice. *Hepatology*, 42(3): 618–626, 2005.
- Lieu H.-T., Simon M.-T., Nguyen-Khoa T., Kebede M., Cortes A., Tebar L., Smith A. J. H., Bayne R., Hunt S. P., Brechot C., and Christa L. Reg2 inactivation increases sensitivity to fas hepatotoxicity and delays liver regeneration post-hepatectomy in mice. *Hepatology*, 44(6):1452–1464, 2006.
- Lim I. I. P., Bondoc A. J., Geller J. I., and Tiao G. M. Hepatoblastoma the evolution of biology, surgery, and transplantation. *Children*, 2018.
- Lin A.-H., Athukorala A., Gleich G. J., and Lee L.-Y. Cough responses to inhaled irritants are enhanced by eosinophil major basic protein in awake mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 317(1): R93–R97, July 2019.

- Lin S. L., Castaño A. P., Nowlin B. T., Lupher M. L., and Duffield J. S. Bone marrow ly6chigh monocytes are selectively recruited to injured kidney and differentiate into functionally distinct populations. *The Journal of Immunology*, 183(10):6733–6743, October 2009.
- Lin Y.-C., Lin C.-H., Yeh Y.-C., Ho H.-L., Wu Y.-C., Chen M.-Y., and Chou T.-Y. High olinked n-acetylglucosamine transferase expression predicts poor survival in patients with early stage lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 9(57):31032–31044, July 2018.
- ling Dai C., hua Gu J., Liu F., Iqbal K., and Gong C.-X. Neuronal o-GlcNAc transferase regulates appetite, body weight, and peripheral insulin resistance. *Neurobiology of Aging*, 70:40–50, October 2018.
- Litten J. B. and Tomlinson G. E. Liver tumors in children. *The Oncologist*, 2008.
- Liu B., jiao Bian H., and ku Bao J. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters*, 287(1):1–12, January 2010a.
- Liu C., Tao Q., Sun M., Wu J. Z., Yang W., Jian P., Peng J., Hu Y., Liu C., and Liu P. Kupffer cells are associated with apoptosis, inflammation and fibrotic effects in hepatic fibrosis in rats. *Laboratory Investigation*, 90(12):1805–1816, October 2010b.
- Liu F., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Hart G. W., and Gong C.-X. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: A mechanism involved in alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(29):10804–10809, July 2004.
- Liu H., Wang Z., Yu S., and Xu J. Proteasomal degradation of o-GlcNAc transferase elevates hypoxia-induced vascular endothelial inflammatory response†. *Cardiovas-cular Research*, 103(1):131–139, April 2014a.
- Liu H., Yu S., Zhang H., and Xu J. Identification of nitric oxide as an endogenous inhibitor of 26s proteasomes in vascular endothelial cells. *PLoS ONE*, 9(5) :e98486, May 2014b.
- Liu J., Ma Q., Zhang M., Wang X., Zhang D., Li W., Wang F., and Wu E. Alterations of TP53 are associated with a poor outcome for patients with hepatocellular carcinoma: Evidence from a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Cancer*, 48(15):2328–2338, October 2012.
- Liu J., Gao Y., Lorenzo F., Sink S. T., and Mcclain D. Iron downregulates leptin by decreasing CREB o-GlcNAc modification and CREB occupancy of the leptin promoter. *Diabetes*, 67(Supplement 1):1976–P, May 2018.
- Liu J.-L., Cui W., Li B., and Lu Y. Possible roles of reg family proteins in pancreatic islet cell growth. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 8(1):1–10, March 2008.
- Liu Q., Tao T., Liu F., Ni R., Lu C., and Shen A. Hyper-o-GlcNAcylation of YB-1 affects ser102 phosphorylation and promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Experimental Cell Research*, 349(2):230–238, December 2016.
- Liu T.-H., Liu D.-H., Mo C.-J., Sun L., Liu X.-X., Li W., Zhang S., Liu Y.-K., and Guo K. Glycosylation patterns and pha-e-associated glycoprotein profiling associated with early hepatic encephalopathy in chinese hepatocellular carcinoma patients. *American Journal of Translational Research*, 2011.

- Liu X., Wei W., Li X., Shen P., Ju D., Wang Z., Zhang R., Yang F., Chen C., Cao K., Zhu G., Chen H., Chen L., Sui J., Zhang E., Wu K., Wang F., Zhao L., and Xi R. BMI1 and MEL18 promote colitis-associated cancer in mice via REG3b and STAT3. *Gastroenterology*, 153(6):1607–1620, December 2017.
- Liu X., Wang J., Wang H., Yin G., Liu Y., Lei X., and Xiang M. REG3a accelerates pancreatic cancer cell growth under IL-6-associated inflammatory condition: Involvement of a REG3a–JAK2/STAT3 positive feedback loop. *Cancer Letters*, 362(1): 45–60, June 2015.
- Liu Y. and Cao X. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Cellular & Molecular Immunology*, 12(1):1–4, September 2014.
- Livesey F. J., O-Brien J. A., Li M., Smith A. G., Murphy L. J., and Hunt S. P. A schwann cell mitogen accompanying regeneration of motor neurons. *Nature*, 390(6660):614–618, December 1997.
- Llovet J., Bru C., and Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: The BCLC staging classification. *Seminars in Liver Disease*, 19(03):329–338, 1999.
- Llovet J. M., Ricci S., Mazzaferro V., Hilgard P., Gane E., Blanc J.-F., de Oliveira A. C., Santoro A., Raoul J.-L., Forner A., Schwartz M., Porta C., Zeuzem S., Bolondi L., Greten T. F., Galle P. R., Seitz J.-F., Borbath I., Haussinger D., Giannaris T., Shan M., Moscovici M., Voliotis D., and Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 359(4):378–390, July 2008.
- Loncle C., Bonjoch L., Folch-Puy E., Lopez-Millan M. B., Lac S., Molejon M. I., Chuluyan E., Cordelier P., Dubus P., Lomberk G., Urrutia R., Closa D., and Iovanna J. L. IL17 functions through the novel REG3a-JAK2-STAT3 inflammatory pathway to promote the transition from chronic pancreatitis to pancreatic cancer. *Cancer Research*, 75(22):4852–4862, September 2015.
- Loomba R. and Sanyal A. J. The global nafld epidemic. *Nature Reviews Gastroente-rology & Hepatology*, 2013.
- Loonen L. M., Stolte E. H., Jaklofsky M. T., Meijerink M., Dekker J., van Baarlen P., and Wells J. M. REG3gamma-deficient mice have altered mucus distribution and increased mucosal inflammatory responses to the microbiota and enteric pathogens in the ileum. *Mucosal Immunology*, 7(4):939–947, December 2013.
- Lörchner H., Pöling J., Gajawada P., Hou Y., Polyakova V., Kostin S., Adrian-Segarra J. M., Boettger T., Wietelmann A., Warnecke H., Richter M., Kubin T., and Braun T. Myocardial healing requires reg3beta-dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. *Nature Medicine*, 21(4):353–362, March 2015.
- Lu Y., Ponton A., Okamoto H., Takasawa S., Herrera P. L., and Liu J.-L. Activation of the reg family genes by pancreatic-specific IGF-i gene deficiency and after streptozotocin-induced diabetes in mouse pancreas. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 291(1):E50–E58, July 2006.
- Lubas W. A. and Hanover J. A. Functional expression of o-linked glcnac transferase: Domain structure and substrate specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15): 10983–10988, 2000.

- Lubas W. A., Frank D. W., Krause M., and Hanover J. A. O-linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 272(14):9316–9324, April 1997.
- Lucas T., Waisman A., Ranjan R., Roes J., Krieg T., Müller W., Roers A., and Eming S. A. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *The Journal of Immunology*, 184(7):3964–3977, February 2010.
- Ludwig J., Viggiano T. R., McGill D. B., and Oh B. J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clinic Proceedings*, 1980.
- Lumpkin R. J., Gu H., Zhu Y., Leonard M., Ahmad A. S., Clauser K. R., Meyer J. G., Bennett E. J., and Komives E. A. Site-specific identification and quantitation of endogenous sumo modifications under native conditions. *Nature Communications*, 8 (1), October 2017.
- Lunde I. G., Aronsen J. M., Kvaløy H., Qvigstad E., Sjaastad I., Tønnessen T., Christensen G., Grønning-Wang L. M., and Carlson C. R. Cardiac o-GlcNAc signaling is increased in hypertrophy and heart failure. *Physiological Genomics*, 44(2):162–172, January 2012.
- Lurje I., Czigany Z., Bednarsch J., Roderburg C., Isfort P., Neumann U. P., and Lurje G. Treatment strategies for hepatocellular carcinoma a multidisciplinary approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6):1465, March 2019.
- Lv Y., Yang X., Huo Y., Tian H., Li S., Yin Y., and Hao Z. Adenovirus-mediated hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein suppresses dextran sulfate sodium-induced acute ulcerative colitis in rats. *Inflammatory Bowel Diseases*, 18(10):1950–1960, October 2012.
- Lynch T. P., Ferrer C. M., Jackson S. R., Shahriari K. S., Vosseller K., and Reginato M. J. Critical role of o-linked b-n-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14): 11070–11081, January 2012.
- M Rojkind L. B., M A Giambrone. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology*, 1979.
- Ma Z. and Vosseller K. O-GlcNAc in cancer biology. *Amino Acids*, 45(4):719–733, July 2013.
- Ma Z., Vocadlo D. J., and Vosseller K. Hyper-o-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive nf-kappa-b activity in pancreatic cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(21):15121–15130, April 2013.
- Macauley M. S., Shan X., Yuzwa S. A., Gloster T. M., and Vocadlo D. J. Elevation of global o-GlcNAc in rodents using a selective o-GlcNAcase inhibitor does not cause insulin resistance or perturb glucohomeostasis. *Chemistry & Biology*, 17(9):949–958, September 2010.
- Machacek M., Slawson C., and Fields P. E. O-GlcNAc: a novel regulator of immuno-metabolism. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 50(3):223–229, February 2018.

- Magnusson I., Rothman D. L., Katz L. D., Shulman R. G., and Shulman G. I. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. a 13c nuclear magnetic resonance study. *Journal of Clinical Investigation*, 90(4):1323–1327, October 1992.
- Makwana V., Ryan P., Patel B., Dukie S.-A., and Rudrawar S. Essential role of o-GlcNAcylation in stabilization of oncogenic factors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*, 1863(8):1302–1317, August 2019.
- Marchio A., Akil A., Terris B., Dejean A., and Pineau P. Insertion/deletion polymorphisms are convenient and reliable markers to assess chromosomal instability in human tumors. *The International Journal of Biological Markers*, 27(3):232–240, July 2012.
- Marin D. P., Bolin A. P., de Cássia Santos Macedo R., Sampaio S. C., and Otton R. ROS production in neutrophils from alloxan-induced diabetic rats treated in vivo with astaxanthin. *International Immunopharmacology*, 11(1):103–109, January 2011.
- Marotta N. P., Lin Y. H., Lewis Y. E., Ambroso M. R., Zaro B. W., Roth M. T., Arnold D. B., Langen R., and Pratt M. R. O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the protein alpha-synuclein associated with parkinson's disease. *Nature Chemistry*, 7(11):913–920, October 2015.
- Marz-Weiss P., Kunz D., Bimmler D., Berkemeier C., Ozbek S., Dimitriades-Schmutz B., Haybaeck J., Otten U., and Graf R. Expression of pancreatitis-associated protein after traumatic brain injury: A mechanism potentially contributing to neuroprotection in human brain. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 31(8):1141–1149, June 2011.
- Masui T., Ota I., Itaya-Hironaka A., Takeda M., Kasai T., Yamauchi A., Sakuramoto-Tsuchida S., Mikami S., Yane K., Takasawa S., and Hosoi H. Expression of REG III and prognosis in head and neck cancer. *Oncology Reports*, 30(2):573–578, June 2013.
- Matsumura N., Zembutsu H., Yamaguchi K., Sasaki K., Tsuruma T., Nishidate T., Denno R., and Hirata K. Identification of novel molecular markers for detection of gastric cancer cells in the peripheral blood circulation using genome-wide microarray analysis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2(4):705–713, 2011.
- Matsushita M., Endo Y., Taira S., Sato Y., Fujita T., Ichikawa N., Nakata M., and Mizuochi T. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(5):2448–2454, February 1996.
- Matsushita M. Ficolins in complement activation. *Molecular Immunology*, 55(1):22–26, August 2013.
- Matsushita M. and Fujita T. Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunological Reviews*, 180(1):78–85, April 2001.
- Matsuura A., Ito M., Sakaidani Y., Kondo T., Murakami K., Furukawa K., Nadano D., Matsuda T., and Okajima T. O-LinkedN-acetylglucosamine is present on the extracellular domain of notch receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 283(51): 35486–35495, October 2008.

- Matter M. S., Decaens T., Andersen J. B., and Thorgeirsson S. S. Targeting the mTOR pathway in hepatocellular carcinoma: Current state and future trends. *Journal of Hepatology*, 60(4):855–865, April 2014.
- Mazzaferro V., Llovet J. M., Miceli R., Bhoori S., Schiavo M., Mariani L., Camerini T., Roayaie S., Schwartz M. E., Grazi G. L., Adam R., Neuhaus P., Salizzoni M., Bruix J., Forner A., Carlis L. D., Cillo U., Burroughs A. K., Troisi R., Rossi M., Gerunda G. E., Lerut J., Belghiti J., Boin I., Gugenheim J., Rochling F., Hoek B. V., and Majno P. Predicting survival after liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma beyond the milan criteria: a retrospective, exploratory analysis. *The Lancet Oncology*, 10(1):35–43, January 2009.
- McClain D. A., Lubas W. A., Cooksey R. C., Hazel M., Parker G. J., Love D. C., and Hanover J. A. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16):10695–10699, July 2002.
- McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Wong E. W., Chang F., Lehmann B., Terrian D. M., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke J., Evangelisti C., Martelli A. M., and Franklin R. A. Roles of the raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*, 1773(8):1263–1284, August 2007.
- McGreal S. R., Bhushan B., Walesky C., McGill M. R., Lebofsky M., Kandel S. E., Winefield R. D., Jaeschke H., Zachara N. E., Zhang Z., Tan E. P., Slawson C., and Apte U. Modulation of o-GlcNAc levels in the liver impacts acetaminophen-induced liver injury by affecting protein adduct formation and glutathione synthesis. *Toxicological Sciences*, 162(2):599–610, January 2018.
- Medina L., Grove K., and Haltiwanger R. S. SV40 large t antigen is modified with olinked n-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation. *Glycobiology*, 8(4):383–391, April 1998.
- Medveczky P., Szmola R., and Sahin-Toth M. Proteolytic activation of human pancreatitis-associated protein is required for peptidoglycan binding and bacterial aggregation. *Biochemical Journal*, 420(2):335–344, June 2009.
- Mejia E. G. D. and Prisecaru V. I. Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6):425–445, September 2005.
- Mertins P., Qiao J. W., Patel J., Udeshi N. D., Clauser K. R., Mani D. R., Burgess M. W., Gillette M. A., Jaffe J. D., and Carr S. A. Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nature Methods*, 10(7):634–637, June 2013.
- Mertins P., , Mani D. R., Ruggles K. V., Gillette M. A., Clauser K. R., Wang P., Wang X., Qiao J. W., Cao S., Petralia F., Kawaler E., Mundt F., Krug K., Tu Z., Lei J. T., Gatza M. L., Wilkerson M., Perou C. M., Yellapantula V., lin Huang K., Lin C., McLellan M. D., Yan P., Davies S. R., Townsend R. R., Skates S. J., Wang J., Zhang B., Kinsinger C. R., Mesri M., Rodriguez H., Ding L., Paulovich A. G., Fenyö D., Ellis M. J., and Carr S. A. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature*, 534(7605):55–62, May 2016.

- Mi W., Gu Y., Han C., Liu H., Fan Q., Zhang X., Cong Q., and Yu W. O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease*, 1812(4):514–519, April 2011.
- Michalopoulos G. K. Liver regeneration. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2):286–300, 2007.
- Migita K., Miyazoe S., Maeda Y., Daikoku M., Abiru S., Ueki T., Yano K., Nagaoka S., Matsumoto T., Nakao K., Hamasaki K., Yatsuhashi H., Ishibashi H., and Eguchi K. Cytokine gene polymorphisms in japanese patients with hepatitis b virus infection—association between tgf-b polymorphisms and hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, 42(4):505–510, April 2005.
- Mikami S., Ota I., Masui T., Uchiyama T., Okamoto H., Kimura T., Takasawa S., and Kitahara T. Resveratrol-induced REG III expression enhances chemo and radiosensitivity in head and neck cancer in xenograft mice. *Oncology Reports*, April 2019.
- Miki T., Holst O., and Hardt W.-D. The bactericidal activity of the c-type lectin RegIII-beta against gram-negative bacteria involves binding to lipid a. *Journal of Biological Chemistry*, 287(41):34844–34855, August 2012.
- Minde D. P., Anvarian Z., Rudiger S. G., and Maurice M. M. Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Molecular Cancer*, 10(1):101, 2011.
- Mizanur R. M., Jaipuri F. A., and Pohl N. L. One-step synthesis of labeled sugar nucleotides for ProteinO-GlcNAc modification studies by chemical function analysis of an archaeal protein. *Journal of the American Chemical Society*, 127(3):836–837, January 2005.
- Mohamedi Y., Fontanil T., Cobo T., Cal S., and Obaya A. J. New insights into ADAMTS metalloproteases in the central nervous system. *Biomolecules*, 10(3):403, March 2020.
- Moinzadeh P., Breuhahn K., Stutzer H., and Schirmacher P. Chromosome alterations in human hepatocellular carcinomas correlate with aetiology and histological grade results of an explorative cgh meta-analysis. *British Journal of Cancer*, 92(5):935–941, March 2005.
- Monga S. P. beta-catenin signaling and roles in liver homeostasis, injury, and tumorigenesis. *Gastroenterology*, 148(7):1294–1310, June 2015.
- Moniaux N., Song H., Darnaud M., Garbin K., Gigou M., Mitchell C., Samuel D., Jamot L., Amouyal P., Amouyal G., Brechot C., and Faivre J. Human hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein cures fas-induced acute liver failure in mice by attenuating free-radical damage in injured livers. *Hepatology*, 53(2): 618–627, December 2010.
- Moniaux N., Darnaud M., Garbin K., Santos A. D., Guettier C., Samuel D., Amouyal G., Amouyal P., Brechot C., and Faivre J. The reg3alpha (HIP/PAP) lectin suppresses extracellular oxidative stress in a murine model of acute liver failure. *PLOS ONE*, 10 (5):e0125584, May 2015.

- Morris M., Knudsen G. M., Maeda S., Trinidad J. C., Ioanoviciu A., Burlingame A. L., and Mucke L. Tau post-translational modifications in wild-type and human amyloid precursor protein transgenic mice. *Nature Neuroscience*, 18(8):1183–1189, July 2015.
- Motoo Y., Itoh T., Su S. B., Nakatani M. T., Watanabe H., Okai T., and Sawabu N. Expression of pancreatitis-associated protein (pap) mrna in gastrointestinal cancers. *International Journal of Pancreatology*, Volume 23:11–16, February 1998.
- Mukherjee S., Partch C. L., Lehotzky R. E., Whitham C. V., Chu H., Bevins C. L., Gardner K. H., and Hooper L. V. Regulation of c-type lectin antimicrobial activity by a flexible n-terminal prosegment. *Journal of Biological Chemistry*, 284(8):4881–4888, December 2008.
- Mukherjee S., Zheng H., Derebe M. G., Callenberg K. M., Partch C. L., Rollins D., Propheter D. C., Rizo J., Grabe M., Jiang Q.-X., and Hooper L. V. Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal c-type lectin. *Nature*, 505(7481):103–107, November 2013.
- Multigner L., Caro A. D., Lombardo D., Campese D., and Sarles H. Pancreatic stone protein, a phosphoprotein which inhibits calcium carbonate precipitation from human pancreatic juice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 110(1): 69–74, January 1983.
- Murugaiah V., Tsolaki A. G., and Kishore U. Collectins: Innate immune pattern recognition molecules. pages 75–127, 2020.
- Muthusamy S., Hong K. U., Dassanayaka S., Hamid T., and Jones S. P. E2f1 transcription factor regulates o-linked n-acetylglucosamine (o-GlcNAc) transferase and o-GlcNAcase expression. *Journal of Biological Chemistry*, 290(52):31013–31024, November 2015.
- Myers A. Susceptibility locus for alzheimer's disease on chromosome 10. *Science*, 290 (5500) :2304–2305, December 2000.
- Nadesalingam J., Dodds A. W., Reid K. B. M., and Palaniyar N. Mannose-binding lectin recognizes peptidoglycan via theN-acetyl glucosamine moiety, and inhibits ligand-induced proinflammatory effect and promotes chemokine production by macrophages. *The Journal of Immunology*, 175(3):1785–1794, July 2005.
- Nagaraj R., Sharpley M. S., Chi F., Braas D., Zhou Y., Kim R., Clark A. T., and Banerjee U. Nuclear localization of mitochondrial TCA cycle enzymes as a critical step in mammalian zygotic genome activation. *Cell*, 168(1-2):210–223.e11, January 2017.
- Nagaraj S. H. and Reverter A. A boolean-based systems biology approach to predict novel genes associated with cancer: Application to colorectal cancer. *BMC Systems Biology*, 5(1), February 2011.
- Nahon P. and Zucman-Rossi J. Single nucleotide polymorphisms and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 57(3):663–674, September 2012.

- Nakata K., Nagai E., Ohuchida K., Aishima S., Hayashi A., Miyasaka Y., Yu J., Mizumoto K., Tanaka M., and Tsuneyoshi M. REG4 is associated with carcinogenesis in the 'intestinal' pathway of intraductal papillary mucinous neoplasms. *Modern Pathology*, 22(3):460–468, January 2009.
- Nalpas B., IchaÃ-P., Jamot L., Carbonell N., Rudler M., Mathurin P., Durand F., Gerken G., Manns M., Trautwein C., Larrey D., Radenne S., Duvoux C., Leroy V., Bernuau J., Faivre J., Moniaux N., Brechot C., Amouyal G., Amouyal P., and Samuel D. A proof of concept, phase II randomized european trial, on the efficacy of ALF-5755, a novel extracellular matrix-targeted antioxidant in patients with acute liver diseases. *PLOS ONE*, 11(3):e0150733, March 2016.
- Namikawa K., Okamoto T., Suzuki A., Konishi H., and Kiyama H. Pancreatitis-associated protein-III is a novel macrophage chemoattractant implicated in nerve regeneration. *Journal of Neuroscience*, 26(28):7460–7467, July 2006.
- Namikawa K., Fukushima M., Murakami K., Suzuki A., Takasawa S., Okamoto H., and Kiyama H. Expression of reg/PAP family members during motor nerve regeneration in rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 332(1):126–134, June 2005.
- Nanashima N., Asano J., Hayakari M., Nakamura T., Nakano H., Yamada T., Shimizu T., Akita M., Fan Y., and Tsuchida S. Nuclear localization of STAT5a modified withO-LinkedN-acetylglucosamine and early involution in the mammary gland of hirosaki hairless rat. *Journal of Biological Chemistry*, 280(52):43010–43016, October 2005.
- Narushima Y., Unno M., ichi Nakagawara K., Mori M., Miyashita H., Suzuki Y., Noguchi N., Takasawa S., Kumagai T., Yonekura H., and Okamoto H. Structure, chromosomal localization and expression of mouse genes encoding type III reg, RegIIIalpha, RegIIIbeta, RegIIIgamma. *Gene*, 185(2):159–168, February 1997.
- Nata K., Liu Y., Xu L., Ikeda T., Akiyama T., Noguchi N., Kawaguchi S., Yamauchi A., Takahashi I., Shervani N. J., Onogawa T., Takasawa S., and Okamoto H. Molecular cloning, expression and chromosomal localization of a novel human REG family gene, REG III. *Gene*, 340(1):161–170, September 2004.
- national des MICIO. URL http://www.observatoire-crohn-rch.fr.
- Nault J. C. and Rossi J. Z. Molecular classification of hepatocellular adenomas. *International Journal of Hepatology*, 2013:1–7, 2013.
- Nault J. C., Mallet M., Pilati C., Calderaro J., Bioulac-Sage P., Laurent C., Laurent A., Cherqui D., Balabaud C., and Zucman-Rossi J. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nature Communications*, 4(1), July 2013.
- NCBI. Mouse gene map for chr 6 compared with human, 2010. URL https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/homology/maps/mouse/chr6/.
- NCT00071409. Safety and efficacy of ingap-peptide in patients with type 1 diabetes. *ClinicalTrials.gov*, 2004.
- NCT00071422. Safety and efficacy of ingap-peptide in patients with type 2 diabetes. *ClinicalTrials.gov*, 2004.

- NCT00995540. Tolerability, safety, and efficacy study of ingap peptide to treat type 1 diabetes mellitus in adults. *ClinicalTrials.gov*, 2011.
- NCT02204397. Study of tolerability and safety of adding ustekinumab to ingap peptide for 12 weeks in adult patients with td1 melitis. *ClinicalTrials.gov*, 2017.
- Nelson W. J. Convergence of wnt, b-catenin, and cadherin pathways. *Science*, 303 (5663):1483–1487, March 2004.
- Netter F. H. Atlas d'anatomie humaine 5e edition. Elsevier BV, 2011.
- Newell C., Johnsen V. L., Yee N. C., Xu W. J., Klein M. S., Khan A., Rho J. M., and Shearer J. Ketogenic diet leads to o-GlcNAc modification in the BTBRTtf/j mouse model of autism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease*, 1863(9):2274–2281, September 2017.
- Ngoh G. A., Facundo H. T., Zafir A., and Jones S. P. O-GlcNAc signaling in the cardio-vascular system. *Circulation Research*, 107(2):171–185, July 2010a.
- Ngoh G. A., Watson L. J., Facundo H. T., and Jones S. P. Augmented o-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids*, 40(3):895–911, August 2010b.
- Nigri J., Gironella M., Bressy C., Vila-Navarro E., Roques J., Lac S., Bontemps C., Kozaczyk C., Cros J., Pietrasz D., Maréchal R., Laethem J.-L. V., Iovanna J., Bachet J.-B., Folch-Puy E., and Tomasini R. PAP/REG3a favors perineural invasion in pancreatic adenocarcinoma and serves as a prognostic marker. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(22):4231–4243, June 2017.
- Nili G.-Y. E., Saito Y., Egger G., and Jones P. A. Cancer epigenetics: Modifications, screening, and therapy. *Annual Review of Medicine*, 59(1):267–280, February 2008.
- Nishida N. and Goel A. Genetic and epigenetic signatures in human hepatocellular carcinoma :a systematic review. *Current Genomics*, 12(2):130–137, April 2011.
- Nishida N., Kudo M., Nishimura T., Arizumi T., Takita M., Kitai S., Yada N., Hagiwara S., Inoue T., Minami Y., Ueshima K., Sakurai T., Yokomichi N., Nagasaka T., and Goel A. Unique association between global DNA hypomethylation and chromosomal alterations in human hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, 8(9):e72312, September 2013.
- Nishimune H., Vasseur S., Wiese S., Birling M.-C., Holtmann B., Sendtner M., Iovanna J. L., and Henderson C. E. Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signal-ling intermediate in the CNTF survival pathway. *Nature Cell Biology*, 2(12):906–914, November 2000.
- Nolte D. and Muller U. Human o-glcnac transferase (ogt): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in xq13.1. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society*, 13(1), January 2002.
- Nordenstedt H., White D. L., and El-Serag H. B. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease*, 2010.

- O-Donnell M. C., Ackerman S. J., Gleich G. J., and Thomas L. L. Activation of basophil and mast cell histamine release by eosinophil granule major basic protein. *The Journal of Experimental Medicine*, 157(6):1981–1991, June 1983.
- O-Donnell N., Zachara N. E., Hart G. W., and Marth J. D. Ogt-dependent x-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Molecular and Cellular Biology*, 24(4):1680–1690, January 2004.
- O-Shea J. J., Schwartz D. M., Villarino A. V., Gadina M., McInnes I. B., and Laurence A. The JAK-STAT pathway: Impact on human disease and therapeutic intervention. *Annual Review of Medicine*, 66(1):311–328, January 2015.
- Ogawa H., Fukushima K., Naito H., Funayama Y., Unno M., ichi Takahashi K., Kitayama T., Matsuno S., Ohtani H., Takasawa S., Okamoto H., and Sasaki I. Increased expression of HIP/PAP and regenerating gene III in human inflammatory bowel disease and a murine bacterial reconstitution model. *Inflammatory Bowel Diseases*, 9(3): 162–170, May 2003.
- Ogawa M. and Okajima T. Structure and function of extracellular o-GlcNAc. *Current Opinion in Structural Biology*, 56:72–77, June 2019.
- Ogawa M., Sawaguchi S., Kawai T., Nadano D., Matsuda T., Yagi H., Kato K., Furukawa K., and Okajima T. ImpairedO-LinkedN-acetylglucosaminylation in the endoplasmic reticulum by mutated epidermal growth factor (EGF) domain-specificO-LinkedN-acetylglucosamine transferase found in adams-oliver syndrome. *Journal of Biological Chemistry*, 290(4):2137–2149, December 2014.
- Ohata M., Lin M., Satre M., and Tsukamoto H. Diminished retinoic acid signaling in hepatic stellate cells in cholestatic liver fibrosis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 272(3):G589–G596, March 1997.
- Olsen J. V., Vermeulen M., Santamaria A., Kumar C., Miller M. L., Jensen L. J., Gnad F., Cox J., Jensen T. S., Nigg E. A., Brunak S., and Mann M. Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science Signaling*, 3(104):ra3–ra3, January 2010.
- Olszewski N. E., West C. M., Sassi S. O., and Hartweck L. M. O-GlcNAc protein modification in plants: Evolution and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*, 1800(2):49–56, February 2010.
- Orimo A., Gupta P. B., Sgroi D. C., Arenzana-Seisdedos F., Delaunay T., Naeem R., Carey V. J., Richardson A. L., and Weinberg R. A. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 121(3):335–348, May 2005.
- Ortiz E. M., Dusetti N. J., Vasseur S., Malka D., Bödeker H., Dagorn J., and Iovanna J. L. The pancreatitis-associated protein is induced by free radicals in AR4-2j cells and confers cell resistance to apoptosis. *Gastroenterology*, 114(4):808–816, April 1998.
- Ortiz-Meoz R. F., Jiang J., Lazarus M. B., Orman M., Janetzko J., Fan C., Duveau D. Y., Tan Z.-W., Thomas C. J., and Walker S. A small molecule that inhibits OGT activity in cells. *ACS Chemical Biology*, 10(6):1392–1397, March 2015.

- Ota H., Itaya-Hironaka A., Yamauchi A., Sakuramoto-Tsuchida S., Miyaoka T., Fujimura T., Tsujinaka H., Yoshimoto K., ichi Nakagawara K., Tamaki S., Takasawa S., and Kimura H. Pancreatic beta cell proliferation by intermittent hypoxia via up-regulation of reg family genes and HGF gene. *Life Sciences*, 93(18-19):664–672, November 2013.
- Oue N., Mitani Y., Aung P. P., Sakakura C., Takeshima Y., Kaneko M., Noguchi T., Nakayama H., and Yasui W. Expression and localization of reg IV in human neoplastic and non-neoplastic tissues: Reg IV expression is associated with intestinal and neuroendocrine differentiation in gastric adenocarcinoma. *The Journal of Pathology*, 207 (2):185–198, 2005.
- P. K. G., Taylor A., Primrose J. N., Langeberg W. J., Kelsh M. A., Mowat F. S., Alexander D. D., Choti M. A., and Poston G. Survival after liver resection in metastatic colorectal cancer: review and meta-analysis of prognostic factors. *Clinical Epidemiology*, 2012.
- Pacharra S., Hanisch F.-G., Mühlenhoff M., Faissner A., Rauch U., and Breloy I. The lecticans of mammalian brain perineural net are o-mannosylated. *Journal of Proteome Research*, 12(4):1764–1771, March 2013.
- Parikh A., Stephan A.-F., and Tzanakakis E. S. Regenerating proteins and their expression, regulation, and signaling. *BioMolecular Concepts*, 3(1), January 2012.
- Park E. J., Lee J. H., Yu G.-Y., He G., Ali S. R., Holzer R. G., H. O. C., H. T., and Karin M. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing il-6 and tnf expression. *Cell*, 2010a.
- Park S., Pak J., Jang I., and Cho J. Inhibition of mTOR affects protein stability of OGT. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2):208–212, October 2014.
- Park S. Y., Kim H. S., Kim N. H., Ji S., Cha S. Y., Kang J. G., Ota I., Shimada K., Konishi N., Nam H. W., Hong S. W., Yang W. H., Roth J., Yook J. I., and Cho J. W. Snail1 is stabilized by o-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *The EMBO Journal*, 29(22):3787–3796, October 2010b.
- Peinado H., Olmeda D., and Cano A. Snail, zeb and bhlh factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, 7(6):415–428, May 2007.
- Perez-Cervera Y., Harichaux G., Schmidt J., Debierre-Grockiego F., Dehennaut V., Bieker U., Meurice E., Lefebvre T., and Schwarz R. T. Direct evidence of o-GlcNAcylation in the apicomplexan toxoplasma gondii: a biochemical and bioinformatic study. *Amino Acids*, 40(3):847–856, July 2010.
- Pez F., Lopez A., Kim M., Wands J. R., de Fromentel C. C., and Merle P. Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: Molecular targets for the development of innovative anticancer drugs. *Journal of Hepatology*, 59(5):1107–1117, November 2013.
- Phoomak C., Vaeteewoottacharn K., Sawanyawisuth K., Seubwai W., Wongkham C., Silsirivanit A., and Wongkham S. Mechanistic insights of o-GlcNAcylation that promote progression of cholangiocarcinoma cells via nuclear translocation of NF-kb. *Scientific Reports*, 6(1), June 2016.

- Phoomak C., Silsirivanit A., Park D., Sawanyawisuth K., Vaeteewoottacharn K., Wongkham C., Lam E. W.-F., Pairojkul C., Lebrilla C. B., and Wongkham S. O-GlcNAcylation mediates metastasis of cholangiocarcinoma through FOXO3 and MAN1a1. *Oncogene*, 37(42):5648–5665, June 2018.
- Phoomak C., Park D., Silsirivanit A., Sawanyawisuth K., Vaeteewoottacharn K., Detarya M., Wongkham C., Lebrilla C. B., and Wongkham S. O-GlcNAc-induced nuclear translocation of hnRNP-k is associated with progression and metastasis of cholangiocarcinoma. *Molecular Oncology*, 13(2):338–357, January 2019.
- Pineau P., Marchio A., Battiston C., Cordina E., Russo A., Terris B., Qin L.-X., Turlin B., Tang Z.-Y., Mazzaferro V., and Dejean A. Chromosome instability in human hepatocellular carcinoma depends on p53 status and aflatoxin exposure. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 653(1-2):6–13, May 2008.
- Pittenger G. L., Taylor-Fishwick D. A., Johns R. H., Burcus N., Kosuri S., and Vinik A. I. Intramuscular injection of islet neogenesis-associated protein peptide stimulates pancreatic islet neogenesis in healthy dogs. *Pancreas*, 34(1):103–111, January 2007.
- Pralhad T., Madhusudan S., and Rajendrakumar K. Concept, mechanisms and therapeutics of angiogenesis in cancer and other diseases. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 55(8):1045–1053, August 2003.
- Prives C. and Manfredi J. J. The p53 tumor suppressor protein: meeting review. *Genes & Development*, 7(4):529–534, April 1993.
- Puig P. L., Legoix P., Bluteau O., Belghiti J., Franco D., Binot F., Monges G., Thomas G., Bioulac-Sage P., and Zucman-Rossi J. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*, 120(7):1763–1773, June 2001.
- Qiao Y., Zhang X., Zhang Y., Wang Y., Xu Y., Liu X., Sun F., and Wang J. High glucose stimulates tumorigenesis in hepatocellular carcinoma cells through AGER-dependent o-GlcNAcylation of c-jun. *Diabetes*, 65(3):619–632, January 2016.
- Qiu H., Liu F., Tao T., Zhang D., Liu X., Zhu G., Xu Z., Ni R., and Shen A. Modification of p27 with o-linked n-acetylglucosamine regulates cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, 56(1):258–271, May 2016.
- Qiu Y.-S., Liao G.-J., and Jiang N.-N. REG3a overexpression suppresses gastric cancer cell invasion, proliferation and promotes apoptosis through Pl3k/akt signaling pathway. *International Journal of Molecular Medicine*, February 2018.
- Qu B., Liu B.-R., Du Y.-J., Chen J., Cheng Y.-Q., Xu W., and Wang X.-H. Wnt/b-catenin signaling pathway may regulate the expression of angiogenic growth factors in hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*, 7(4):1175–1178, January 2014.
- Qu L.-S., Jin F., Guo Y.-M., Liu T.-T., Xue R.-Y., Huang X.-W., Xu M., Chen T.-Y., Ni Z.-P., and Shen X.-Z. Nine susceptibility loci for hepatitis b virus-related hepatocellular carcinoma identified by a pilot two-stage genome-wide association study. *Oncology Letters*, 11(1):624–632, November 2015.

- Quiroga A. V., Barrio D. A., and Añón M. C. Amaranth lectin presents potential antitumor properties. *LWT Food Science and Technology*, 60(1):478–485, January 2015.
- Rafaeloff R., Barlow S. W., Rosenberg L., and Vinik A. I. Expression of reg gene in the syrian golden hamster pancreatic islet regeneration model. *Diabetologia*, 38(8): 906–913, August 1995.
- Rafaeloff R., Pittenger G. L., Barlow S. W., Qin X. F., Yan B., Rosenberg L., Duguid W. P., and Vinik A. I. Cloning and sequencing of the pancreatic islet neogenesis associated protein (INGAP) gene and its expression in islet neogenesis in hamsters. *Journal of Clinical Investigation*, 99(9):2100–2109, May 1997.
- Ramachandran P., Matchett K. P., Dobie R., Wilson-Kanamori J. R., and Henderson N. C. Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 17(8):457–472, June 2020.
- rarecarenet consortium. Information network on rare cancer, 2016. URL http://www.rarecarenet.eu/rarecarenet/.
- Rastogi A. Changing role of histopathology in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 24(35):4000–4013, September 2018.
- Ratziu V., Bellentani S., Cortez-Pinto H., Day C., and Marchesini G. A position statement on nafld/nash based on the easl 2009 special conference. *Journal of Hepatology*, 2010.
- Raz A. and Nakahara S. Biological modulation by lectins and their ligands in tumor progression and metastasis. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 8(1):22–36, January 2008.
- Reading N. G., Forbes A., Nunnerley H. B., and Williams R. Hepatic haemangioma: A critical review of diagnosis and management. *An International Journal of Medicine*, 1988.
- Rebbani K., Marchio A., Ezzikouri S., Afifi R., Kandil M., Bahri O., Triki H., Feydi A. E. E., Dejean A., Benjelloun S., and Pineau P. Tp53 r72p polymorphism modulates dna methylation in hepatocellular carcinoma. *Molecular Cancer*, 14(1), April 2015.

Re

be

- C., Raveneau M., Chevriaux A., Lakomy D., Sberna A.-L., Costa A., Besse de G., Athias A., Steinmetz E., Lobaccaro J. M. A., Alves G., Menicacci A., Vachenc S., Solary E., Gambert P., and Masson D. Induction of transglutaminase 2 by a liver x receptor/retinoic acid receptor a pathway increases the clearance of apoptotic cells by human macrophages. *Circulation Research*, 105(4):393–401, August 2009.
- Rebouissou S., Amessou M., Couchy G., Poussin K., Imbeaud S., Pilati C., Izard T., Balabaud C., Bioulac-Sage P., and Zucman-Rossi J. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature*, 457(7226): 200–204, November 2008.

- Rehermann B. Natural killer cells in viral hepatitis. *Cellular and Molecular Gastroente-rology and Hepatology*, 1(6):578–588, November 2015.
- Rexach J. E., Rogers C. J., Yu S.-H., Tao J., Sun Y. E., and Hsieh-Wilson L. C. Quantification of o-glycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable mass tags. *Nature Chemical Biology*, 6(9):645–651, July 2010.
- 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. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Science Signaling*, 4(164):rs3–rs3, March 2011.
- Roessler S., Long E. L., Budhu A., Chen Y., Zhao X., Ji J., Walker R., Jia H.-L., Ye Q.-H., Qin L.-X., Tang Z.-Y., He P., Hunter K. W., Thorgeirsson S. S., Meltzer P. S., and Wang X. W. Integrative genomic identification of genes on 8p associated with hepatocellular carcinoma progression and patient survival. *Gastroenterology*, 142 (4):957–966.e12, April 2012.
- Rombouts K. and Carloni V. The fibrotic microenvironment as a heterogeneity facet of hepatocellular carcinoma. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 6(1), September 2013.
- Roncalli M. Methylation framework of cell cycle gene inhibitors in cirrhosis and associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 36(2):427–432, August 2002.
- Roos M. D. and Hanover J. A. Structure of o-linked GlcNAc transferase: Mediator of glycan-dependent signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271(2):275–280, May 2000.
- Ropero S. and Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular Oncology*, 1(1):19–25, March 2007.
- Rosty C., Christa L., Kuzdzal S., Baldwin W., Zahurak M., Carnot F., Chan D., Canto M., Lillemoe K., Cameron J., Yeo C., Hruban R., and Goggins M. Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatitis-associated protein i as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology. *Cancer Research*, 15(62):1868–1875, March 2002.
- Roth C., Chan S., Offen W. A., Hemsworth G. R., Willems L. I., King D. T., Varghese V., Britton R., Vocadlo D. J., and Davies G. J. Structural and functional insight into human o-GlcNAcase. *Nature Chemical Biology*, 13(6):610–612, March 2017.
- Rozanski W., Krzeslak A., Forma E., Brys M., Blewniewski M., Wozniak P., and Lipinski M. Prediction of bladder cancer based on urinary content of mgea5 and ogt mrna level. *Clinical laboratory*, 2012.
- Ruan H.-B., Han X., Li M.-D., Singh J. P., Qian K., Azarhoush S., Zhao L., Bennett A. M., Samuel V. T., Wu J., Yates J. R., and Yang X. O-GlcNAc transferase/host cell factor c1 complex regulates gluconeogenesis by modulating pgc-1-alpha stability. *Cell Metabolism*, 16(2):226–237, August 2012.
- Ruba A. and Yang W. O-GlcNAc-ylation in the nuclear pore complex. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 9(2):227–233, April 2016.

- Ryu I.-H. and Do S.-I. Denitrosylation of s-nitrosylated OGT is triggered in LPS-stimulated innate immune response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(1):52–57, April 2011.
- Saito Y. Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-cpg-binding proteins and dna methylation status on cpg islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Hepatology*, 33(3):561–568, March 2001.
- Saito Y., Kanai Y., Nakagawa T., Sakamoto M., Saito H., Ishii H., and Hirohashi S. Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *International Journal of Cancer*, 105(4):527–532, April 2003.
- Sakabe K., Wang Z., and Hart G. W. b-n-acetylglucosamine (o-GlcNAc) is part of the histone code. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(46):19915–19920, November 2010.
- Sakabe K. and Hart G. W. O-GlcNAc transferase regulates mitotic chromatin dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 285(45):34460–34468, August 2010.
- Sakaidani Y., Nomura T., Matsuura A., Ito M., Suzuki E., Murakami K., Nadano D., Matsuda T., Furukawa K., and Okajima T. O-linked-n-acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell–matrix interactions. *Nature Communications*, 2(1), September 2011.
- Salvucci M., Lemoine A., Saffroy R., Azoulay D., Lepere B., Gaillard S., Bismuth H., Reynes M., and Debuire B. Microsatellite instability in european hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 18(1):181–187, January 1999.
- Sapisochin G., Goldaracena N., Laurence J. M., Dib M., Barbas A., Ghanekar A., Cleary S. P., Lilly L., Cattral M. S., Marquez M., Selzner M., Renner E., Selzner N., McGilvray I. D., Greig P. D., and Grant D. R. The extended toronto criteria for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma: A prospective validation study. *Hepatology*, 64(6):2077–2088, June 2016.
- Saponaro C., Gaggini M., and Gastaldelli A. Nonalcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: Common pathophysiologic mechanisms. *Current Diabetes Reports*, 2015.
- Sarles H., Dagorn J., Giorgi D., and Bernard I. Renaming pancreatic stone protein as 'lithostathine'. *Gastroenterology*, 99(3):900–901, September 1990.
- Schiesser M., Bimmler D., Frick T. W., and Graf R. Conformational changes of pancreatitis-associated protein (PAP) activated by trypsin lead to insoluble protein aggregates. *Pancreas*, 22(2):186–192, March 2001.
- Schimpl M., Zheng X., Borodkin V. S., Blair D. E., Ferenbach A. T., Schüttelkopf A. W., Navratilova I., Aristotelous T., Albarbarawi O., Robinson D. A., Macnaughtan M. A., and van Aalten D. M. F. O-GlcNAc transferase invokes nucleotide sugar pyrophosphate participation in catalysis. *Nature Chemical Biology*, 8(12):969–974, October 2012.
- Schirm M., Kalmokoff M., Aubry A., Thibault P., Sandoz M., and Logan S. M. Flagellin from listeria monocytogenes is glycosylated with b-o-linked n-acetylglucosamine. *Journal of Bacteriology*, 186(20):6721–6727, October 2004.

- Schlageter M., Terracciano L. M., D'Angelo S., and Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 20(43):15955, 2014.
- Schmitz K. J., Wohlschlaeger J., Lang H., Sotiropoulos G. C., Malago M., Steveling K., Reis H., Cicinnati V. R., Schmid K. W., and Baba H. A. Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis c virus infection. *Journal of Hepatology*, 48(1):83–90, January 2008.
- Schouppe D., Ghesquière B., Menschaert G., Vos W. H. D., Bourque S., Trooskens G., Proost P., Gevaert K., and Damme E. J. V. Interaction of the tobacco lectin with histone proteins. *Plant Physiology*, 155(3):1091–1102, January 2011.
- Schulze K., Nault J.-C., and Villanueva A. Genetic profiling of hepatocellular carcinoma using next-generation sequencing. *Journal of Hepatology*, 65(5):1031–1042, November 2016.
- Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: Collagens and glycoproteins. *Seminars in Liver Disease*, 10(01):1–10, February 1990.
- Schuppan D. and Schattenberg J. M. Non-alcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28: 68–76, July 2013.
- Seki E. and Schwabe R. F. Hepatic inflammation and fibrosis: Functional links and key pathways. *Hepatology*, 61(3):1066–1079, January 2015.
- Shafi R., Iyer S. P. N., Ellies L. G., O-Donnell N., Marek K. W., Chui D., Hart G. W., and Marth J. D. The o-GlcNAc transferase gene resides on the x chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11):5735–5739, May 2000.
- Sharma N. S., Gupta V. K., Dauer P., Kesh K., Hadad R., Giri B., Chandra A., Dudeja V., Slawson C., Banerjee S., Vickers S. M., Saluja A., and Banerjee S. O-GlcNAc modification of sox2 regulates self-renewal in pancreatic cancer by promoting its stability. *Theranostics*, 9(12):3410–3424, 2019.
- Shervani N. J., Takasawa S., Uchigata Y., Akiyama T., Nakagawa K., Noguchi N., Takada H., Takahashi I., Yamauchi A., Ikeda T., Iwamoto Y., Nata K., and Okamoto H. Autoantibodies to REG, a beta-cell regeneration factor, in diabetic patients. *European Journal of Clinical Investigation*, 34(11):752–758, November 2004.
- Shi Y., Tomic J., Wen F., Shaha S., Bahlo A., Harrison R., Dennis J. W., Williams R., Gross B. J., Walker S., Zuccolo J., Deans J. P., Hart G. W., and Spaner D. E. Aberrant o-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 24(9): 1588–1598, July 2010.
- Shi Z., An N., Zhao S., Li X., Bao J. K., and Yue B. S. In silicoanalysis of molecular mechanisms of legume lectin-induced apoptosis in cancer cells. *Cell Proliferation*, 46(1):86–96, January 2013.
- Shiga K., Hara M., Nagasaki T., Sato T., Takahashi H., and Takeyama H. Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth. *Cancers*, 7(4):2443–2458, December 2015.

- Shimizu M. and Tanaka N. IL-8-induced o-GlcNAc modification via GLUT3 and GFAT regulates cancer stem cell-like properties in colon and lung cancer cells. *Oncogene*, 38(9):1520–1533, October 2018.
- Shin J. H. and Seeley R. J. Reg3 proteins as gut hormones? *Endocrinology*, 160(6): 1506–1514, May 2019.
- Shirabe K., Mano Y., Muto J., Matono R., Motomura T., Toshima T., Takeishi K., Uchiyama H., Yoshizumi T., Taketomi A., Morita M., Tsujitani S., Sakaguchi Y., and Maehara Y. Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma. *Surgery Today*, 42(1):1–7, November 2011.
- Shuaib A., Hartwell A., Kiss-Toth E., and Holcombe M. Multi-compartmentalisation in the mapk signalling pathway contributes to the emergence of oscillatory behaviour and to ultrasensitivity. *PLOS ONE*, May 2016.
- Si-Tayeb K., Lemaigre F. P., and Duncan S. A. Organogenesis and development of the liver. *Developmental Cell*, 18(2):175–189, February 2010.
- Sieghart W., Fuereder T., Schmid K., Cejka D., Werzowa J., Wrba F., Wang X., Gruber D., Rasoul-Rockenschaub S., Peck-Radosavljevic M., and Wacheck V. Mammalian target of rapamycin pathway activity in hepatocellular carcinomas of patients undergoing liver transplantation. *Transplantation*, 83(4):425–432, February 2007.
- Simon M.-T., Pauloin A., Normand G., Lieu H.-T., Mouly H., Pivert G., Carnot F., Tralhao J. G., Brechot C., and Christa L. HIP/PAP stimulates liver regeneration after partial hepatectomy and combines mitogenic and anti-apoptotic functions through the PKA signaling pathway. *The FASEB Journal*, 17(11):1441–1450, August 2003.
- Singh J. P., Zhang K., Wu J., and Yang X. O-GlcNAc signaling in cancer metabolism and epigenetics. *Cancer Letters*, 356(2):244–250, January 2015.
- Singleton K. D. and Wischmeyer P. E. Glutamine induces heat shock protein expression via o-glycosylation and phosphorylation of HSF-1 and sp1. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 32(4):371–376, July 2008.
- Skorobogatko Y., Landicho A., Chalkley R. J., Kossenkov A. V., Gallo G., and Vosseller K. O-linked beta-n-acetylglucosamine (o-GlcNAc) site thr-87 regulates synapsin i localization to synapses and size of the reserve pool of synaptic vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 289(6):3602–3612, November 2013.
- Slawson C., Pidala J., and Potter R. Increased n-acetyl-beta-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(2):147–157, September 2001.
- Smyth I., Du X., Taylor M. S., Justice M. J., Beutler B., and Jackson I. J. The extracellular matrix gene frem1 is essential for the normal adhesion of the embryonic epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(37):13560–13565, September 2004.
- Sobin L. H. and Compton C. C. TNM seventh edition: What's new, what's changed. *Cancer*, 116(22):5336–5339, July 2010.

- Song M., Kim H.-S., Park J.-M., Kim S.-H., Kim I.-H., Ryu S. H., and Suh P.-G. o-GlcNAc transferase is activated by CaMKIV-dependent phosphorylation under potassium chloride-induced depolarization in NG-108-15 cells. *Cellular Signalling*, 20 (1):94–104, January 2008.
- song Wang E., ping Zhang X., bin Yao H., Wang G., wen Chen S., wei Gao W., jun Yao H., rui Sun Y., hua Xi C., and dong Ji Y. Tetranectin knockout mice develop features of parkinson disease. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(2):277–287, 2014.
- Soulié M., Beseme O., Nicol L., Henry J., Pinet F., Richard V., and Mulder P. O-GlcNAcase inhibition by thiamet g opposes acute cardiac decompensation in rats with chronic heart failure. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 11(2): 229, April 2019.
- Specht S., Saeftel M., Arndt M., Endl E., Dubben B., Lee N. A., Lee J. J., and Hoerauf A. Lack of eosinophil peroxidase or major basic protein impairs defense against murine filarial infection. *Infection and Immunity*, 74(9):5236–5243, September 2006.
- Spector L. G. and Birch J. The epidemiology of hepatoblastoma. *Pediatric Blood and Cancer*, 2012.
- Sprenger H., Kaufmann A., Garn H., Lahme B., Gemsa D., and Gressner A. M. Differential expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in transforming rat hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*, 30(1):88–94, January 1999.
- Starr C. M. Primary sequence and heterologous expression of nuclear pore glycoprotein p62. *The Journal of Cell Biology*, 110(6):1861–1871, June 1990.
- Steenackers A., Stichelen S. O.-V., Baldini S. F., Dehennaut V., Toillon R.-A., Bourhis X. L., Yazidi-Belkoura I. E., and Lefebvre T. Silencing the nucleocytoplasmic o-GlcNAc transferase reduces proliferation, adhesion, and migration of cancer and fetal human colon cell lines. *Frontiers in Endocrinology*, 7, May 2016.
- Stelter C., Kappeli R., Konig C., Krah A., Hardt W.-D., Stecher B., and Bumann D. Salmonella-induced mucosal lectin RegIIIbeta kills competing gut microbiota. *PLoS ONE*, 6(6):e20749, June 2011.
- Stern M. C., Umbach D. M., Yu M. C., London S. J., Zhang Z. Q., and Taylor J. A. Hepatitis b, aflatoxin b(1), and p53 codon 249 mutation in hepatocellular carcinomas from guangxi, people's republic of china, and a meta-analysis of existing studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2001.
- Stichelen S. O.-V., Drougat L., Dehennaut V., Yazidi-Belkoura I. E., Guinez C., Mir A.-M., Michalski J.-C., Vercoutter-Edouart A.-S., and Lefebvre T. Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin d expression. *Oncogenesis*, 1(12):e36–e36, December 2012.
- Su H., Yang J.-R., Xu T., Huang J., Xu L., Yuan Y., and Zhuang S.-M. MicroRNA-101, down-regulated in hepatocellular carcinoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity. *Cancer Research*, 69(3):1135–1142, January 2009.

- Sümegi M., Hunyadi-Gulyás É., Medzihradszky K. F., and Udvardy A. 26s proteasome subunits are o-linked n-acetylglucosamine-modified in drosophila melanogaster. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312(4):1284–1289, December 2003.
- Tachibana K., Marquardt H., Yokoya S., and Friesen H. G. Growth hormone-releasing hormone stimulates and somatostatin inhibits the release of a novel protein by cultured rat pituitary cells. *Molecular Endocrinology*, 2(10):973–978, October 1988.
- Tacke F. and Zimmermann H. W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of Hepatology*, 60(5):1090–1096, May 2014.
- Tai H.-C., Khidekel N., Ficarro S. B., Peters E. C., and Hsieh-Wilson L. C. Parallel identification of O-GlcNAc-modified proteins from cell lysates. *Journal of the American Chemical Society*, 126(34):10500–10501, September 2004.
- Takahashi K. and Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4):663–676, August 2006.
- Takasawa S. Regenerating gene (REG) product and its potential clinical usage. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20(5):541–550, December 2015.
- Takayama R., Nakagawa H., Sawaki A., Mizuno N., Kawai H., Tajika M., Yatabe Y., Matsuo K., Uehara R., ichiro Ono K., Nakamura Y., and Yamao K. Serum tumor antigen REG4 as a diagnostic biomarker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Gastroenterology*, 45(1):52–59, September 2009.
- Takigawa Y. and Brown A. Wnt signaling in liver cancer. *Current Drug Targets*, 9(11): 1013–1024, November 2008.
- Talamini R., Polesel J., Montella M., Maso L. D., Crispo A., Tommasi L. G., Izzo F., Crovatto M., La Vecchia C., and Franceschi S. Food groups and risk of hepatocellular carcinoma: A multicenter case-control study in italy. *International Journal of Cancer*, 2006.
- Tan P.-S., Nakagawa S., Goossens N., Venkatesh A., Huang T., Ward S. C., Sun X., Song W.-M., Koh A., Canasto-Chibuque C., Deshmukh M., Nair V., Mahajan M., Zhang B., Fiel M. I., Kobayashi M., Kumada H., and Hoshida Y. Clinicopathological indices to predict hepatocellular carcinoma molecular classification. *Liver International*, 36(1):108–118, June 2015.
- Tanaka K., Hara M., Sakamoto T., Higaki Y., Mizuta T., Eguchi Y., Yasutake T., Ozaki I., Yamamoto S., K. ANDOnohara, Kawazoe S., Hirohisa Shigematsu H., and Koizumi S. Inverse association between coffee drinking and the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in japan. *Cancer Science*, 2007.
- Tao H.-Q., He X.-J., Ma Y.-Y., Wang H.-J., Xia Y.-J., Ye Z.-Y., and Zhao Z.-S. Evaluation of REG4 for early diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Human Pathology*, 42 (10):1401–1409, October 2011.
- Tarbet H. J., Toleman C. A., and Boyce M. A sweet embrace: Control of protein—protein interactions by o-linked beta-n-acetylglucosamine. *Biochemistry*, 57(1):13–21, November 2017.

- Tarhuni A., Guyot E., Rufat P., Sutton A., Bourcier V., Grando V., Ganne-Carrié N., Ziol M., Charnaux N., Beaugrand M., Moreau R., Trinchet J.-C., Mansouri A., and Nahon P. Impact of cytokine gene variants on the prediction and prognosis of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Journal of Hepatology*, 61(2):342–350, August 2014.
- Taylor-Fishwick D. A., Bowman A., Korngiebel-Rosique M., and Vinik A. I. Pancreatic islet immunoreactivity to the reg protein INGAP. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 56(2):183–191, October 2007.
- TCGA. The results shown here are in whole or part based upon data generated by the tcga research network: https://www.cancer.gov/tcga.
- Teng Y., Gao M., Wang J., Kong Q., Hua H., Luo T., and Jiang Y. Inhibition of eif-2a dephosphorylation enhances trail-induced apoptosis in hepatoma cells. *Cell Death & Disease*, 5(2):e1060–e1060, February 2014.
- Teoh N. C., Dan Y. Y., Swisshelm K., Lehman S., Wright J. H., Haque J., Gu Y., and Fausto N. Defective DNA strand break repair causes chromosomal instability and accelerates liver carcinogenesis in mice. *Hepatology*, 47(6):2078–2088, June 2008.
- Terazono K., Yamamoto H., Takasawa S., Shiga K., Yonemura Y., Tochino Y., and Okamoto H. A novel gene activated in regenerating islets. *Journal of Biological Chemistry*, 263(5):2111–2114, 1988.
- Terazono K., Uchiyama Y., Ide M., Watanabe T., Yonekura H., Yamamoto H., and Okamoto H. Expression of reg protein in rat regenerating islets and its co-localization with insulin in the beta cell secretory granules. *Diabetologia*, 33(4):250–252, April 1990.
- Testino G., Leone S., and Borro P. Alcohol and hepatocellular carcinoma: A review and a point of view. *World Journal of Gastroenterology*, 2014.
- Togni R., Bagla N., Muiesan P., Miquel R., O-Grady J., Heaton N., Knisely A. S., Portmann B., and Quaglia A. Microsatellite instability in hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver in patients older than 60 years. *Hepatology Research*, 39(3):266–273, March 2009.
- Toh T. B., Lim J. J., and Chow E. K.-H. Epigenetics of hepatocellular carcinoma. *Clinical and Translational Medicine*, 8(1), May 2019.
- Toleman C. A. The histone acetyltransferase NCOAT contains a zinc finger-like motif involved in substrate recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 281(7):3918–3925, January 2006.
- Toleman C., Paterson A. J., Whisenhunt T. R., and Kudlow J. E. Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with ActivableO-GlcNAcase and HAT activities. *Journal of Biological Chemistry*, 279(51):53665–53673, October 2004.
- Toleman C., Paterson A. J., Shin R., and Kudlow J. E. Streptozotocin inhibits o-GlcNAcase via the production of a transition state analog. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 340(2):526–534, February 2006.

- Tornillo L., Carafa V., Sauter G., Moch H., Minola E., Gambacorta M., Vecchione R., Bianchi L., and Terracciano L. M. Chromosomal alterations in hepatocellular nodules by comparative genomic hybridization: High-grade dysplastic nodules represent early stages of hepatocellular carcinoma. *Laboratory Investigation*, 82(5):547–554, May 2002.
- Torre L. A., Bray F., Siegel R. L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., and Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2):87–108, February 2015.
- Torres C. R. and Hart G. W. Topography and polypeptide distribution of terminal nacetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. evidence for olinked glcnac. *Journal of Biological Chemistry*, 259(5):3308–3317, 1984.
- Totoki Y., Tatsuno K., Covington K. R., Ueda H., Creighton C. J., Kato M., Tsuji S., Donehower L. A., Slagle B. L., Nakamura H., Yamamoto S., Shinbrot E., Hama N., Lehmkuhl M., Hosoda F., Arai Y., Walker K., Dahdouli M., Gotoh K., Nagae G., Gingras M.-C., Muzny D. M., Ojima H., Shimada K., Midorikawa Y., Goss J. A., Cotton R., Hayashi A., Shibahara J., Ishikawa S., Guiteau J., Tanaka M., Urushidate T., Ohashi S., Okada N., Doddapaneni H., Wang M., Zhu Y., Dinh H., Okusaka T., Kokudo N., Kosuge T., Takayama T., Fukayama M., Gibbs R. A., Wheeler D. A., Aburatani H., and Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nature Genetics*, 46(12):1267–1273, November 2014.
- Trapannone R., Rafie K., and van Aalten D. M. F. O-GlcNAc transferase inhibitors: current tools and future challenges. *Biochemical Society Transactions*, 44(1):88–93, February 2016.
- Traxinger R. R. and Marshall S. Coordinated regulation of glutamine :fructose-6-phosphate amidotransferase activity by insulin, glucose, and glutamine. role of hexosamine biosynthesis in enzyme regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 266(16): 10148–10154, 1991.
- Trinidad J. C., Barkan D. T., Gulledge B. F., Thalhammer A., Sali A., Schoepfer R., and Burlingame A. L. Global identification and characterization of BothO-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11 (8):215–229, May 2012.
- Tsuchida C., Sakuramoto-Tsuchida S., Taked M., Itaya-Hironaka A., Yamauchi A., Misu M., Shobatake R., Uchiyama T., Makino M., Pujol-Autonell I., Vives-Pi M., Ohbayashi C., and Takasawa S. Expression of REG family genes in human inflammatory bowel diseases and its regulation. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 12:198–205, December 2017.
- Turano E., Busetto G., Marconi S., Guzzo F., Farinazzo A., Commisso M., Bistaffa E., Angiari S., Musumeci S., Sotgiu S., and Bonetti B. Neurotoxicity and synaptic plasticity impairment of n-acetylglucosamine polymers: implications for alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 36(5):1780–1791, May 2015.
- Unno M., Yonekura H., Nakagawara K., Watanabe T., Miyashita H., Moriizumi S., Okamoto H., Itoh T., and Teraoka H. Structure, chromosomal localization, and expression of mouse reg genes, reg i and reg ii. a novel type of reg gene, reg ii, exists in the mouse genome. *Journal of Biological Chemistry*, 268(21):15974–82, 1993.

- Vaccaro M. I., Ropolo A., Grasso D., Calvo E. L., Ferreria M., Iovanna J. L., and Lanosa G. Pancreatic acinar cells submitted to stress activate TNF-alpha gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268(2):485–490, February 2000.
- Vaishnava S., Yamamoto M., Severson K. M., Ruhn K. A., Yu X., Koren O., Ley R., Wakeland E. K., and Hooper L. V. The antibacterial lectin RegIlla promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science*, 334(6053): 255–258, October 2011.
- Valla D. Adenomatose du foie, 2008. URL https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=54272.
- van Ampting M. T. J., Loonen L. M. P., Schonewille A. J., Konings I., Vink C., Iovanna J., Chamaillard M., Dekker J., van der Meer R., Wells J. M., and Bovee-Oudenhoven I. M. J. Intestinally secreted c-type lectin reg3b attenuates salmonellosis but not listeriosis in mice. *Infection and Immunity*, 80(3):1115–1120, January 2012.
- van Beelen Granlund A., Ostvik A. E., Brenna O., Torp S. H., Gustafsson B. I., and Sandvik A. K. REG gene expression in inflamed and healthy colon mucosa explored by in situ hybridisation. *Cell and Tissue Research*, 352(3):639–646, March 2013.
- Vanderford N. L., Andrali S. S., and Özcan S. Glucose induces MafA expression in pancreatic beta cell lines via the hexosamine biosynthetic pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 282(3):1577–1584, December 2006.
- Varshney S. and Stanley P. EOGT and o-GlcNAc on secreted and membrane proteins. *Biochemical Society Transactions*, 45(2):401–408, April 2017.
- Vasseur S., Folch-Puy E., Hlouschek V., Garcia S., Fiedler F., Lerch M. M., Dagorn J. C., Closa D., and Iovanna J. L. p8 improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein i. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8):7199–7207, December 2003.
- Vauthey J.-N., Dixon E., Abdalla E. K., Helton W. S., Pawlik T. M., Taouli B., Brouquet A., and Adams R. B. Pretreatment assessment of hepatocellular carcinoma: expert consensus statement. *HPB*, 12(5):289–299, June 2010.
- Vicente-Salar N., Santana A., Reig J. A., and Roche E. Differentiation of embryonic stem cells using pancreatic bud-conditioned medium gives rise to neuroectoderm-derived insulin-secreting cells. *Cellular Reprogramming*, 13(1):77–84, February 2011.
- Viterbo D., Bluth M. H., Mueller C. M., and Zenilman M. E. Mutational characterization of pancreatitis-associated protein 2 domains involved in mediating cytokine secretion in macrophages and the nf-kappa-b pathway. *The Journal of Immunology*, 181(3): 1959–1968, July 2008a.
- Viterbo D., Bluth M. H., yao Lin Y., Mueller C. M., Wadgaonkar R., and Zenilman M. E. Pancreatitis-associated protein 2 modulates inflammatory responses in macrophages. *The Journal of Immunology*, 181(3):1948–1958, July 2008b.

- Vyas S. K., Leyland H., Gentry J., and Arthur M. J. Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture. *Gastroenterology*, 109(3): 889–898, September 1995.
- Wagner S. A., Beli P., Weinert B. T., Nielsen M. L., Cox J., Mann M., and Choudhary C. A proteome-wide, quantitative survey of in vivo ubiquitylation sites reveals widespread regulatory roles. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(10):M111.013284, September 2011.
- Wahl D. R., Stenmark M. H., Tao Y., Pollom E. L., Caoili E. M., Lawrence T. S., Schipper M. J., and Feng M. Outcomes after stereotactic body radiotherapy or radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 34(5):452–459, February 2016.
- Wang B., Yeh C.-B., Lein M.-Y., Su C.-M., Yang S.-F., Liu Y.-F., and Tang C.-H. Effects of HMGB1 polymorphisms on the susceptibility and progression of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Medical Sciences*, 13(4):304–309, 2016a.
- Wang J., Wang Z., Yuan J., Wang J., and Shen X. The positive feedback between ACSL4 expression and o-GlcNAcylation contributes to the growth and survival of hepatocellular carcinoma. *Aging*, 12(9):7786–7800, May 2020a.
- Wang J., Leclercq I., Brymora J. M., Xu N., Ramezani–Moghadam M., London R. M., Brigstock D., and George J. Kupffer cells mediate leptin-induced liver fibrosis. *Gastroenterology*, 137(2):713–723.e1, August 2009.
- Wang J., Zhou H., Han Y., Liu X., Wang M., Wang X., Yin G., Li X., and Xiang M. SOCS3 methylation in synergy with reg3a overexpression promotes cell growth in pancreatic cancer. *Journal of Molecular Medicine*, 92(12):1257–1269, July 2014.
- Wang K., Lim H. Y., Shi S., Lee J., Deng S., Xie T., Zhu Z., Wang Y., Pocalyko D., Yang W. J., Rejto P. A., Mao M., Park C.-K., and Xu J. Genomic landscape of copy number aberrations enables the identification of oncogenic drivers in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 58(2):706–717, July 2013.
- Wang L., Fouts D. E., Stärkel P., Hartmann P., Chen P., Llorente C., DePew J., Moncera K., Ho S. B., Brenner D. A., Hooper L. V., and Schnabl B. Intestinal REG3 lectins protect against alcoholic steatohepatitis by reducing mucosa-associated microbiota and preventing bacterial translocation. *Cell Host & Microbe*, 19(2):227–239, February 2016b.
- Wang S., Huang X., Sun D., Xin X., Pan Q., Peng S., Liang Z., Luo C., Yang Y., Jiang H., Huang M., Chai W., Ding J., and Geng M. Extensive crosstalk between o-GlcNAcylation and phosphorylation regulates akt signaling. *PLoS ONE*, 7(5): e37427, May 2012.
- Wang X., Lin Y., Liu S., Zhu Y., Lu K., Broering R., and Lu M. O-glcnacylation modulates hbv replication through regulating cellular autophagy at multiple levels. *The FASEB Journal*, September 2020b.
- Wang Y. Interleukin-1b gene polymorphisms associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis c virus infection. *Hepatology*, 37(1):65–71, January 2003.

- Wang Y., Jacovetti C., Li B., Siddique T., Xiong X., Yin H., Wang M., Zhao H., and Liu J.-L. Coordinated age-dependent and pancreatic-specific expression of mouse 2reg3a, and reg3b genes. *Growth Factors*, 29(2-3):72–81, March 2011.
- Wang Z., Udeshi N. D., Slawson C., Compton P. D., Sakabe K., Cheung W. D., Shabanowitz J., Hunt D. F., and Hart G. W. Extensive crosstalk between o-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Science Signaling*, 3(104):ra2–ra2, January 2010.
- Wang Z., Pandey A., and Hart G. W. Dynamic interplay between O-Linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(8):1365–1379, May 2007.
- Watanabe T., Yonemura Y., Yonekura H., Suzuki Y., Miyashita H., Sugiyama K., Moriizumi S., Unno M., Tanaka O., and Kondo H. Pancreatic beta-cell replication and amelioration of surgical diabetes by reg protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(9):3589–3592, April 1994.
- Wei Y., Fabre M., Branchereau S., Gauthier F., Perilongo G., and Buendia M.-A. Activation of beta-catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas. *Oncogene*, 19(4):498–504, January 2000.
- Weis W. I., Drickamer K., and Hendrickson W. A. Structure of a c-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature*, 360(6400):127–134, November 1992.
- Wells L., Gao Y., Mahoney J. A., Vosseller K., Chen C., Rosen A., and Hart G. W. DynamicO-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3):1755–1761, November 2001.
- Wells L., Kreppel L. K., Comer F. I., Wadzinski B. E., and Hart G. W. O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 279(37):38466–38470, July 2004.
- Wells L., Slawson C., and Hart G. W. The e2f-1 associated retinoblastomasusceptibility gene product is modified by o-GlcNAc. *Amino Acids*, 40(3):877–883, August 2010.
- wen Li W., ying Yu J., long Xu H., and ku Bao J. Concanavalin a : A potential antineoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(2):282–286, October 2011.
- Whelan S. A., Lane M. D., and Hart G. W. Regulation of the o-linked beta-nacetylglucosamine transferase by insulin signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31):21411–21417, 2008.
- Whisenhunt T. R., Yang X., Bowe D. B., Paterson A. J., Tine B. A. V., and Kudlow J. E. Disrupting the enzyme complex regulating o-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology*, 16(6):551–563, February 2006.
- Wilhelm S. M., Adnane L., Newell P., Villanueva A., Llovet J. M., and Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both raf and VEGF and

- PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(10): 3129–3140, October 2008.
- Woosley B., Xie M., Wells L., Orlando R., Garrison D., King D., and Bergmann C. Comprehensive glycan analysis of recombinant aspergillus niger endo-polygalacturonase c. *Analytical Biochemistry*, 354(1):43–53, July 2006.
- Wu L.-M., Yang Z., Zhou L., Zhang F., Xie H.-Y., Feng X.-W., Wu J., and Zheng S.-S. Identification of histone deacetylase 3 as a biomarker for tumor recurrence following liver transplantation in HBV-associated hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*, 5(12): e14460, December 2010.
- Wu Y., Quan Y., Liu Y., Liu K., Li H., Jiang Z., Zhang T., Lei H., Radek K. A., Li D., Wang Z., Lu J., Wang W., Ji S., Xia Z., and Lai Y. Hyperglycaemia inhibits REG3a expression to exacerbate TLR3-mediated skin inflammation in diabetes. *Nature Communications*, 7(1), November 2016.
- Xia. Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 4q in hepatocellular carcinoma using high-throughput SNP array. *Oncology Reports*, 23(2), December 2009.
- Xie H., Bae H., Noh J., Eun J., Kim J., Jung K., J R., Ahn Y., Kim S., Lee S., Yoo N., Lee J., Park W., and Nam S. Mutational analysis of JAK1 gene in human hepatocellular carcinoma. *Neoplasma*, 56(2):136–140, 2009.
- Xie M.-J., Motoo Y., Iovanna J. L., Su S.-B., Ohtsubo K., Matsubara F., and Sawabu N. Overexpression of pancreatitis-associated protein (pap) in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*, 48(3):459–464, 2003.
- Xiong X., Wang X., Li B., Chowdhury S., Lu Y., Srikant C. B., Ning G., and Liu J.-L. Pancreatic islet-specific overexpression of reg3beta protein induced the expression of pro-islet genes and protected the mice against streptozotocin-induced diabetes mellitus. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(4): E669–E680, April 2011.
- Xiong X., Li Q., Cui W., Gao Z.-H., and Liu J.-L. Deteriorated high-fat diet-induced diabetes caused by pancreatic beta-cell-specific overexpression of reg3beta gene in mice. *Endocrine*, 54(2):360–370, June 2016.
- Xu L., Wang R., Ziegelbauer J., Wu W. W., Shen R.-F., Juhl H., Zhang Y., Pelosof L., and Rosenberg A. S. Transcriptome analysis of human colorectal cancer biopsies reveals extensive expression correlations among genes related to cell proliferation, lipid metabolism, immune response and collagen catabolism. *Oncotarget*, 8(43), August 2017a.
- Xu Q.-W., Zhao W., Wang Y., Sartor M. A., Han D.-M., Deng J., Ponnala R., Yang J.-Y., Zhang Q.-Y., Liao G.-Q., Qu Y.-M., Li L., Liu F.-F., Zhao H.-M., Yin Y.-H., Chen W.-F., Zhang Y., and Wang X.-S. An integrated genome-wide approach to discover tumor-specific antigens as potential immunologic and clinical targets in cancer. *Cancer Research*, 72(24):6351–6361, November 2012.
- Xu Q., Fu R., Yin G., Liu X., Liu Y., and Xiang M. Microarray-based gene expression profiling reveals genes and pathways involved in the oncogenic function of REG3a on pancreatic cancer cells. *Gene*, 578(2):263–273, March 2016.

- Xu W., Zhang X., lin Wu J., Fu L., Liu K., Liu D., Chen G. G., san Lai P. B., Wong N., and Yu J. O-GlcNAc transferase promotes fatty liver-associated liver cancer through inducing palmitic acid and activating endoplasmic reticulum stress. *Journal of Hepatology*, 67(2):310–320, August 2017b.
- Xu X., D-Hoker J., Stange G., Bonne S., Leu N. D., Xiao X., Casteele M. V. D., Mellitzer G., Ling Z., Pipeleers D., Bouwens L., Scharfmann R., Gradwohl G., and Heimberg H. beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell*, 132(2):197–207, January 2008.
- Yang W., Yan H.-X., Chen L., Liu Q., He Y.-Q., Yu L.-X., Zhang S.-H., Huang D.-D., Tang L., Kong X.-N., Chen C., Liu S.-Q., Wu M.-C., and Wang H.-Y. Wnt b-catenin signaling contributes to activation of normal and tumorigenic liver progenitor cells. *Cancer Research*, 68(11):4287–4295, June 2008a.
- 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. Nf-kappa-b activation is associated with its o-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(45):17345–17350, November 2008b.
- Yang W. H., Kim J. E., Nam H. W., Ju J. W., Kim H. S., Kim Y. S., and Cho J. W. Modification of p53 with o-linked n-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nature Cell Biology*, 8(10):1074–1083, September 2006.
- Yang X. and Qian K. Protein o-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(7):452–465, May 2017.
- Yang X., Zhang F., and Kudlow J. E. Recruitment of o-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3a. *Cell*, 110(1):69–80, July 2002.
- Yang Y., Yin X., Yang H., and Xu Y. Histone demethylase LSD2 acts as an e3 ubiquitin ligase and inhibits cancer cell growth through promoting proteasomal degradation of OGT. *Molecular Cell*, 58(1):47–59, April 2015.
- Yang Y. R., Song M., Lee H., Jeon Y., Choi E.-J., Jang H.-J., Moon H. Y., Byun H.-Y., Kim E.-K., Kim D. H., Lee M. N., Koh A., Ghim J., Choi J. H., Lee-Kwon W., Kim K. T., Ryu S. H., and Suh P.-G. O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell*, 11(3):439–448, February 2012.
- Ye Y., Xiao L., Wang S.-J., Yue W., Yin Q.-S., Sun M.-Y., Xia W., Shao Z.-Y., and Zhang H. Up-regulation of REG3a in colorectal cancer cells confers proliferation and correlates with colorectal cancer risk. *Oncotarget*, 7(4), December 2015.
- Yi W., Clark P. M., Mason D. E., Keenan M. C., Hill C., Goddard W. A., Peters E. C., Driggers E. M., and Hsieh-Wilson L. C. Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism. *Science*, 337(6097):975–980, August 2012.
- Yokoya S. and Frisen H. G. Human growth hormone (gh)-releasing factor stimulates and somatostatin inhibits the release of rat gh variants. *Endocrinology*, 119(5): 2097–2105, November 1986.
- Yoshikawa H., Matsubara K., Qian G.-S., Jackson P., Groopman J. D., Manning J. E., Harris C. C., and Herman J. G. Socs-1, a negative regulator of the jak/stat pathway,

- is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nature Genetics*, 28(1):29–35, May 2001.
- Younossi Z. M., Koenig A. B., Abdelatif D., Fazel Y., Henry L., and Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*, 2016.
- Yu L.-X., Yan H.-X., Liu Q., Yang W., Wu H.-P., Dong W., Tang L., Lin Y., He Y.-Q., Zou S.-S., Wang C., Zhang H.-L., Cao G.-W., Wu M.-C., and Wang H.-Y. Endotoxin accumulation prevents carcinogen-induced apoptosis and promotes liver tumorigenesis in rodents. *Hepatology*, 52(4):1322–1333, August 2010.
- Yuan R.-H. Opposite roles of human pancreatitis-associated protein and REG1a expression in hepatocellular carcinoma: Association of pancreatitis-associated protein expression with low-stage hepatocellular carcinoma, b-catenin mutation, and favorable prognosis. *Clinical Cancer Research*, 11(7):2568–2575, April 2005.
- Yuzwa S. A., Macauley M. S., Heinonen J. E., Shan X., Dennis R. J., He Y., Whitworth G. E., Stubbs K. A., McEachern E. J., Davies G. J., and Vocadlo D. J. A potent mechanism-inspired o-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nature Chemical Biology*, 4(8):483–490, June 2008.
- Yuzwa S. A., Shan X., Macauley M. S., Clark T., Skorobogatko Y., Vosseller K., and Vocadlo D. J. Increasing o-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. *Nature Chemical Biology*, 8(4):393–399, February 2012.
- Zachara N. E., O-Donnell N., Cheung W. D., Mercer J. J., Marth J. D., and Hart G. W. DynamicO-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. *Journal of Biological Chemistry*, 279(29):30133–30142, May 2004.
- Zakim D. and Boyer T. D. Hepatology: A Textbook of Liver Disease. Elsevier BV, 2003.
- Zeisberg M., Yang C., Martino M., Duncan M. B., Rieder F., Tanjore H., and Kalluri R. Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *Journal of Biological Chemistry*, 2007.
- Zelensky A. N. and Gready J. E. The c-type lectin-like domain superfamily. *FEBS Journal*, 272(24):6179–6217, December 2005.
- 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., Fu Y., Weng Z., Kuznetsov V. A., Sung W.-K., Ruan Y., Dang C. V., and Wei C.-L. Global mapping of c-myc binding sites and target gene networks in human b cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (47):17834–17839, November 2006.
- Zenilman M. Ectopic expression of reg protein: a marker of colorectal mucosa at risk for neoplasia,. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 1(2):194–202, April 1997.
- Zenilman M., Magnuson T., Swinson K., Egan J., Perfetti R., and Shuldiner A. Pancreatic thread protein is mitogenic to pancreatic-derived cells in culture. *Gastroente-rology*, 110(4):1208–1214, April 1996.

- Zenilman M. E., Tuchman D., hu Zheng Q., Levine J., and Delany H. Comparison of reg i and reg III levels during acute pancreatitis in the rat. *Annals of Surgery*, 232 (5):646–652, November 2000.
- Zhan P., Ji Y.-N., and Yu L.-K. Tp53 mutation is associated with a poor outcome for patients with hepatocellular carcinoma: evidence from a meta-analysis. *Hepatobiliary Surgery and Nutrition*, 2(5), 2013.
- Zhang D., Cai Y., Chen M., Gao L., Shen Y., and Huang Z. OGT-mediated o-GlcNAcylation promotes NF-kb activation and inflammation in acute pancreatitis. *Inflammation Research*, 64(12):943–952, September 2015a.
- Zhang F., Su K., Yang X., Bowe D. B., Paterson A. J., and Kudlow J. E. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell*, 115(6):715–725, December 2003.
- Zhang H.-B., Luo H.-C., Xin X.-J., and Zeng A.-Z. Up-regulated reg proteins induced by interleukin-22 treatment ameliorate acute liver injury in rat model. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(1), 2015b.
- Zhang H., Zhai Y., Hu Z., Wu C., Qian J., Jia W., Ma F., Huang W., Yu L., Yue W., Wang Z., Li P., Zhang Y., Liang R., Wei Z., Cui Y., Xie W., Cai M., Yu X., Yuan Y., Xia X., Zhang X., Yang H., Qiu W., Yang J., Gong F., Chen M., Shen H., Lin D., Zeng Y.-X., He F., and Zhou G. Genome-wide association study identifies 1p36.22 as a new susceptibility locus for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis b virus carriers. *Nature Genetics*, 42(9):755–758, August 2010.
- Zhang M., Wang J., and Guo J. Role of regenerating islet-derived protein 3a in gastrointestinal cancer. *Frontiers in Oncology*, 9, December 2019a.
- Zhang M., Zhou W., Zhao S., Li S., Yan D., and Wang J. Eckol inhibits reg3a-induced proliferation of human SW1990 pancreatic cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, August 2019b.
- Zhang P., You S., Wang C., and Ma T. O-GlcNAcylation enhances the invasion of thyroid anaplastic cancer cells partially by Pl3k/akt1 pathway. *OncoTargets and Therapy*, page 3305, November 2015c.
- Zhang W. and Liu H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12(1):9–18, March 2002.
- Zhang X., Qiao Y., Wu Q., Chen Y., Zou S., Liu X., Zhu G., Zhao Y., Chen Y., Yu Y., Pan Q., Wang J., and Sun F. The essential role of YAP o-GlcNAcylation in high-glucose-stimulated liver tumorigenesis. *Nature Communications*, 8(1), May 2017a.
- Zhang Y., Qu Y., Niu T., Wang H., and Liu K. O -GlcNAc modification of sp1 mediates hyperglycaemia-induced ICAM-1 up-regulation in endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(1):79–84, February 2017b.
- Zhang Z., Costa F. C., Tan E. P., Bushue N., DiTacchio L., Costello C. E., Mc-Comb M. E., Whelan S. A., Peterson K. R., and Slawson C. O-LinkedN-acetylglucosamine (o-GlcNAc) transferase and O-GlcNAcase interact with mi2beta protein at the Agamma-globin promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 291(30): 15628–15640, May 2016.

- Zhao D., Kim Y.-H., Jeong S., Greenson J. K., Chaudhry M. S., Hoepting M., Anderson E. R., van den Brink M. R., Peled J. U., Gomes A. L., Slingerland A. E., Donovan M. J., Harris A. C., Levine J. E., Ozbek U., Hooper L. V., Stappenbeck T. S., Heul A. V., Liu T.-C., Reddy P., and Ferrara J. L. Survival signal REG3alpha prevents crypt apoptosis to control acute gastrointestinal graft-versus-host disease. *Journal of Clinical Investigation*, 128(11):4970–4979, September 2018.
- Zhao J., Wang J., Wang H., and Lai M. Reg proteins and their roles in inflammation and cancer of the human digestive system. *Advances in Clinical Chemistry*, pages 153–173, 2013.
- Zheng H., Sugawara A., Okamoto H., Takasawa S., Takahashi H., Masuda S., and Takano Y. Expression profile of the REG gene family in colorectal carcinoma. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(1):106–115, January 2011.
- Zhong J., Martinez M., Sengupta S., Lee A., Wu X., Chaerkady R., Chatterjee A., O-Meally R. N., Cole R. N., Pandey A., and Zachara N. E. Quantitative phosphoproteomics reveals crosstalk between phosphorylation and O-GlcNAc in the DNA damage response pathway. *PROTEOMICS*, 15(2-3):591–607, January 2015.
- Zhou L., Huang Y., Li J., and Wang Z. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Medical Oncology*, 27(2):255–261, March 2009.
- Zhou L., Zhang R., Wang L., Shen S., Okamoto H., Sugawara A., Xia L., Wang X., Noguchi N., Yoshikawa T., Uruno A., Yao W., and Yuan Y. Upregulation of REG ialpha accelerates tumor progression in pancreatic cancer with diabetes. *International Journal of Cancer*, 127(8):1795–1803, August 2010.
- Zhou X., Lu J., and Zhu H. Correlation between the expression of hTERT gene and the clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma. *Oncology Letters*, 11 (1):111–115, November 2015.
- Zhu G., Tao T., Zhang D., Liu X., Qiu H., Han L., Xu Z., Xiao Y., Cheng C., and Shen A. O-GlcNAcylation of histone deacetylases 1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer progression. *Glycobiology*, 26(8):820–833, April 2016.
- Zhu G., Qian M., Lu L., Chen Y., Zhang X., Wu Q., Liu Y., Bian Z., Yang Y., Guo S., Wang J., Pan Q., and Sun F. O-GlcNAcylation of YY1 stimulates tumorigenesis in colorectal cancer cells by targeting SLC22a15 and AANAT. *Carcinogenesis*, January 2019a.
- Zhu Q., Zhou L., Yang Z., Lai M., Xie H., Wu L., Xing C., Zhang F., and Zheng S. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Medical Oncology*, 29(2):985–993, April 2011.
- Zhu W.-Z., El-Nachef D., Yang X., Ledee D., and Olson A. K. O-GlcNAc transferase promotes compensated cardiac function and protein kinase a o-GlcNAcylation during early and established pathological hypertrophy from pressure overload. *Journal of the American Heart Association*, 8(11), June 2019b.
- Zucman-Rossi J., Villanueva A., Nault J.-C., and Llovet J. M. Genetic landscape and biomarkers of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 149(5):1226–1239.e4, October 2015.

ÉCOLE DOCTORALE



Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Titre: Modulation de la carcinogenèse hépatique par une protéine de l'immunité innée REG3A

Mots clés: foie, carcinome hépatocellulaire, modification post-traductionnelle, glycosylation, lectine, REG3A

Résumé : Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est la tumeur primitive la plus fréquente dans le foie se développant essentiellement sur un foie cirrhotique. Le CHC est au 6ème rang en termes d'incidence et au 2nd en termes de mortalité. La compréhension imparfaite des mécanismes impliqués dans le CHC empêche le développement de traitements efficaces contre ce cancer.

Notre étude a porté sur les effets d'une lectine humaine de type C, REG3A, sur la carcinogenèse hépatique. Il s'agit d'une protéine secrétée de 16 kDa liant certains poly-oligosaccharides agissant par voie autocrine et paracrine sur différents organes inflammatoires et tumoraux. REG3A déploie des activités biologiques variées dans la prolifération et la survie des cellules, le contrôle de l'inflammation et du stress oxydatif.

Son rôle dans la carcinogenèse est controversé. Nous montrons que la surexpression de REG3A retarde l'apparition du CHC dans deux modèles murins de carcinogenèse chimique et génétique. Nous montrons que cet effet de REG3A est associé à une réduction significative des protéines O-GlcNAcylées. Nous décrivons comment la O-GlcNAcylation via REG3A déséquilibre la balance stabilité / dégradation de l'oncogène c-Myc, favorise la dégradation de c-Myc et freine le développement tumoral dans les modèles étudiés. Au total, notre étude révèle un lien entre cette lectine, la O-GlcNAcylation et le contrôle tumoral. Les mécanismes par lesquels REG3A régule la O-GlcNAcylation des protéines restent cependant à élucider.

Title: Modulation of liver carcinogenesis by an innate immune protein REG3A

Keywords: liver, hepatocellular carcinoma, Post-translational modification, glycosylation, lectin, REG3A

Abstract: The hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common hepatic tumor, developing mainly on a cirrhotic background. HCC is the 6th most commonly occurring and the 2nd most deadly cancer in the world. Little is known about the mechanisms involved in HCC making it difficult to develop effective treatments against this aggressive cancer. Our study investigated the effects of a human C-type lectin, REG3A, on hepatic carcinogenesis. REG3A is a secreted 16 kDa protein, which binds specific poly/oligosaccharides targets and acts on various inflamed and cancerous organs in autocrine and paracrine manner. REG3A displays several biological activities in cell growth and survival, protection against inflammation and oxidative stress. Its role in carcinogenesis is still controversial.

We demonstrated that the overexpression of REG3A delayed the onset of HCC in two murine models of chemical and genetic carcinogenesis. We showed that the slow-down effect of REG3A was associated with a significant reduction of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAcylation) proteins. We described how this phenomenon unbalances the stability / degradation of the c-Myc oncogene, promotes c-Myc degradation and slows tumor development at least in our experimental models. Overall, our study reveals a link between O-GlcNAcylation and carcinogenesis. However, the mechanisms by which REG3A O-GlcNAcylation regulates remain elucidated.