HAL
open science

Connexion des désordres métaboliques à l'émergence tumorale : régulation de l'acide gras synthase (FAS) par O-GlcNAcylation et mTOR au cours de la prolifération cellulaire hépatique

Sadia Raab

To cite this version:

Sadia Raab. Connexion des désordres métaboliques à l'émergence tumorale : régulation de l'acide gras synthase (FAS) par O-GlcNAcylation et mTOR au cours de la prolifération cellulaire hépatique. Biologie moléculaire. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS102 . tel-03654174

HAL Id: tel-03654174

https://theses.hal.science/tel-03654174

Submitted on 28 Apr 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.

Université de Lille, Sciences et technologies

Ecole Doctorale Biologie-Santé (ED 446)

Thèse de doctorat d'Université

Présentée par

Sadia RAAB

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lille, Sciences et technologies

Spécialité Biochimie et Biologie Cellulaire

Connexion des désordres métaboliques à l'émergence tumorale : régulation de l'acide gras synthase (FAS) par *O*-GlcNAcylation et mTOR au cours de la prolifération cellulaire hépatique

Thèse préparée au sein de l'unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF) de Lille et soutenue publiquement le 16 Décembre 2021 devant le jury composé de :

Présidente : **Dr. Patricia NAGNAN-LE MEILLOUR**
Univ. Lille, Faculté des Sciences et Technologies, CNRS UMR 8576 (UGSF), USC INRA 1409, Lille

Rapporteurs : **Dr. Fabienne FOUFELLE**
Univ. Paris, Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, Paris

Dr. Tarik ISSAD
Univ. Paris, Institut Cochin, INSERM U1016/CNRS UMR 8101 Paris

Examinateurs : **Dr. Ganna PANASYUK**
Univ. Paris, Institut Necker-Enfants Malades, INSERM U1151/CNRS UMR 8253, Paris

Dr. Nicolas JONCKHEERE
Univ. Lille, CHU Lille, INSERM U1277/UMR 9020 (CANTHER), Lille

Directeur de thèse : **Pr. Tony LEFEBVRE**
Univ. Lille, Faculté des Sciences et Technologies, CNRS UMR 8576 (UGSF), Lille

« Pour réussir, votre désir de réussite doit être plus grand que votre peur de l'échec »

Bill Cosby

A la mémoire de mon grand-père,

A mes parents,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, dirigée par le **Dr. Yann GUERARDEL**, de m'avoir accueillie durant ces années ainsi que l'ensemble du **personnel** y travaillant.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres de mon jury, la présidente **Patricia NAGNAN-LE MEILLOUR**, les rapporteurs Dr. **Fabienne FOUFELLE** et Dr. **Tarik ISSAD** et les examinateurs Dr. **Ganna PANASYUK** et Dr. **Nicolas JONCKHEERE** pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et pour l'intérêt qu'ils y ont porté. Je remercie tout particulièrement le Dr. **Fabienne FOUFELLE** pour sa bienveillance et ses précieux conseils donnés lors de mes deux comités de suivi individuel ainsi que de nous avoir orienté vers l'équipe du Dr. **Ganna PANASYUK,** avec qui on a fait une super belle collaboration que je tiens également à remercier pour ça. Je remercie nos autres collaborateurs Dr. **Vanessa Dehennaut-Lefebvre**, Dr **Julien Thévenet** et Dr. **Alexis Gadault** pour l'élaboration de la partie *in vivo* et **Dr. Fabrice Bray** pour la spectrométrie de masse.

J'aimerais tout particulièrement exprimer ma gratitude envers mon directeur de thèse le **Pr. Tony LEFEBVRE**. Avant de te remercier en tant que mon directeur de thèse, je souhaiterais tout d'abord te remercier en tant que mon enseignant de Biochimie. T'es un professeur formidable et très passionné ! Merci aussi de m'avoir proposé un sujet de recherche pour mon stage de Master 2 qui s'est terminé avec succès, grâce à ton aide, pour entamer une thèse sous ta direction. Je te remercie pour ton encadrement, ton aide, tes précieux conseils et surtout pour le temps que tu m'as consacré tout au long de ces années et plus encore lors de la rédaction de ce mémoire. Je te remercie infiniment de m'avoir laissé la possibilité de prendre des initiatives, ta confiance m'a permis de grandir et de travailler en toute autonomie. Je souhaiterais également te remercier pour m'avoir proposé au poste d'ATER ça m'a vraiment émue. Merci pour tout ce que tu m'as appris et pour ces merveilleuses années. J'apprécie ta sympathie quotidienne, ta gentillesse, et tes qualités humaines et professionnelles. Grâce à toi, j'ai pu atteindre l'objectif de ma venue en France que je considère maintenant comme mon deuxième pays. Vraiment merci beaucoup Tony !

Tous mes sincères remerciements à tous les membres de mon équipe, grâce à qui j'ai passé de supers bons moments. **Annick**, vous êtes partie en retraite au moment où je suis arrivée au laboratoire mais je vous remercie pour les connaissances que j'ai acquises avec vous en vous ayant comme enseignante. Je vous remercie également pour votre sympathie à mon égard lors des différents repas d'équipe. **Ikram,** merci pour vos conseils lors de nos réunions et au cours de mes différentes présentations. J'apprécie vos questions et réflexions. Merci également pour votre bonne humeur et pour les fois où

vous m'avez rassurée et cru en moi. **Anne-Sophie**, merci pour ta gentillesse, tes conseils et ta disponibilité, notamment pour le FACS. J'apprécie ton organisation lors du travail. **Stéphan**, on parle de Stéphan et on pense à la « biomol » ! J'apprécie tes connaissances scientifiques dans ce domaine, merci pour le temps que tu m'as consacré notamment durant ma première année pour m'initier à la PCR et RT-q-PCR. Merci pour ta sympathie et bonne humeur et aussi de m'avoir encouragée à parler en anglais même avec mon accent. **Quentin**, on t'a vite intégré dans l'équipe et ce grâce à ta gentillesse et sympathie. T'es quelqu'un qui bosse bien. Merci pour ta disponibilité et conseils. Je te souhaite une très bonne continuation. **Marlène**, t'es une personne formidable ! Merci pour ton aide, tes conseils, ta sympathie ainsi que pour les moments qu'on a partagés ensemble. Je te souhaite une merveilleuse retraite. **Awatef**, merci pour ta gentillesse, ton écoute et ton amitié. On a passé de supers moments au laboratoire notamment les week-ends. Je te souhaite une très bonne réussite pour ta thèse et aussi un heureux mariage. **Jodie et Christer**, merci pour votre sympathie. Je vous souhaite la bienvenue dans l'équipe et beaucoup de réussite pour la thèse. **Dimitri et Ferdinand**, je vous souhaite aussi la bienvenue dans l'équipe et beaucoup de courage pour l'année du M2 et surtout pour le grand jury. **Céline**, je te remercie pour l'aide que tu m'as apportée notamment en microscopie. Tu es une personne très sérieuse et qui sait ce qu'elle fait. J'admire ton organisation lors du travail ainsi que tes compétences. **Angélina**, **Mathieu**, **Audrey** et **Vincent**, merci pour les discussions qu'on a partagées et pour votre sympathie. Je vous souhaite beaucoup de réussite pour la thèse. **Moyira, Mariama, Anne-Sophie Roy et Maïté**, vous n'êtes plus là, mais je souhaite vous remercier pour les bons moments qu'on avait passés ensemble durant mon M2. Je vous souhaite beaucoup de réussite ! **Ninon**, merci pour les bons moments qu'on a partagés ensemble. Merci pour ta disponibilité, ton aide et tes conseils. J'admire tes capacités scientifiques et plus encore d'avoir géré ta thèse et un enfant en même temps. Bravo ! Je te souhaite une bonne continuation. **Vanessa**, merci pour ta sympathie à mon égard et merci de nous avoir reçu chez toi, avec bienveillance, pour le repas d'équipe. On avait passé un super bon moment. J'espère que notre demande de post-doc sera acceptée. Ça serait un plaisir pour moi de travailler avec toi. **Agnès**, **Mathieu**, **Fabrice**, **Fred Chirat**, **Isabelle**, **Nao**, **Laurence** et **Martine** merci pour votre sympathie et gentillesse à mon égard. **Corentin**, merci pour ta gentillesse et pour l'aide que tu m'as apportée en m'initiant à la microscopie. **Hammou** et **Dave**, merci pour votre disponibilité quand je vous sollicitais pour des problèmes informatiques. **Hammou**, je te remercie plus particulièrement pour ta gentillesse et les moments de discussions qu'on avait partagés ensemble parfois en tachelhith ! Enfin, un grand merci à mes collègues enseignants qui m'ont initiée à l'enseignement et m'ont appris beaucoup de choses lors de mes interventions en TD/TP durant mes deux années de monitorat ou encore durant mon poste d'ATER : **Sandrine**, **Isabelle**, **Sophie, Cécile**, **Robert**, **Renaud**, **Florence**, **Marie-Ange** et **Xavier**.

Cette thèse a également été permise grâce à ma famille qui a toujours été présente pour moi.

Tonton Samir et **tonton Kader**, merci pour votre aide notamment la première année de mon arrivée en France. **Tonton Yazid**, merci beaucoup pour tes conseils et ta confiance en moi. Merci aussi à tontons **Makhlouf et Omar** qui m'ont soutenue. **Tata Kam**, merci pour l'importance tu m'as donnée, ta bienveillance ainsi que tes conseils. **Tata Zhira**, merci pour tes conseils. Je te souhaite le bonheur auprès de ton mari et de mon cousin **Yanis** que je remercie pour sa gentillesse à mon égard. **Hano**, j'apprécie ton courage et ta personnalité. Merci pour tes conseils et ta disponibilité pour moi surtout les deux premières années de mon arrivée en France. **Wiwih**, merci pour l'aide que tu m'as apportée et pour ta confiance en moi. Merci aussi à ma **belle-famille** qui s'intéresse à l'avancement de ma thèse plus particulièrement **Younes**, merci pour ton encouragement, tu ne cesses de me dire de ne jamais baisser les bras et surtout de continuer mon aventure dans le domaine de la recherche. Un petit mot pour toi **tonton Lakhdar**, merci pour l'aide que tu m'as apportée. Merci pour les fois où vous nous avez invités chez vous, on avait passé de supers bon moments. J'apprécie tout ce que tu fais en tant que professeur et en dehors de l'université, je trouve que tu t'en sors super bien. Bravo ! Merci aussi à mes copines **Jiji**, **Hanane** et **Louiza** qui ont toujours confiance en moi. Je vous souhaite beaucoup de réussite.

Mes parents et frères et sœurs, que j'aime beaucoup, m'ont toujours soutenue. Vous êtes loin de moi mais très proche de mon cœur, vous me manquez énormément**. Maman et Papa (Yemma d Vava)**, merci pour votre confiance qui m'a toujours poussée en avant. Merci d'avoir soutenu ma venue en France. Merci de l'amour que vous me portez et de votre envie de me voir en bonne santé et heureuse dans ma vie. Votre présence et vos conseils me rassurent et me permettent de réussir. Je vous souhaite une longue et heureuse vie. Je vous aime beaucoup ! Je suis chanceuse d'avoir deux frères et deux sœurs. **Karima**, ma sœur ainée avec un grand cœur. Merci pour tout ce que tu as fait pour moi, ta présence, ta disponibilité, ton aide et ton soutien m'ont toujours rassurée. Je te souhaite beaucoup de bonheur auprès de ton mari et de ma nièce **Elyne** que j'aime beaucoup. **Nadia**, comme on a qu'un an (et demi) de différence, on a été élevées comme des jumelles. On avait souvent les mêmes fringues et on a suivi le même parcours. A mi-chemin, je t'ai quittée, mais pas avec mon cœur, pour venir en France et réaliser mon rêve de faire une thèse. Merci pour les bons moments qu'on a partagés ensemble. Merci d'avoir été disponible pour moi. J'espère que tu ne vas pas tarder à me rejoindre et rejoindre ton fiancé en France. Je te souhaite beaucoup de réussite. **Zidane et Idir**, mes frères adorés, je suis fière de vous. Merci pour l'importance que vous me donnez. Merci pour nos discussions, y compris téléphoniques. Continuez à persévérer à l'école (maintenant vous êtes grands, donc bossez bien à l'université), jouez au foot et continuez d'être sportifs. J'en suis sûre qu'un jour vous allez rejoindre votre sœur en France et ça me fera plaisir.

Papi Hocine, merci pour ton soutien notamment à mon arrivée en France. **Papi Said (**akirhem rebbi nchallah**)**, je suis sûre que tu serais fier de moi aujourd'hui. Merci pour l'aide que tu m'avais apportée notamment lors de ma venue en France. Je suis contente d'avoir pu partager de supers bons moments avec toi. Ton image avec ton beau sourire est gravée dans ma tête. **Mamie Jiga**, t'es une personne formidable, merci pour ton amour, ton aide, tes conseils et tes dou3a. Je te souhaite une longue vie et une très bonne santé.

Nordine, mon mari, mon chéri que j'aime beaucoup ! Je me suis éloignée de toi pendant les deux premières années de ma venue en France mais c'était pour la bonne raison. Merci pour ta compréhension. Je suis très contente que tu m'aies rejointe. Ta présence à mes coté et ton soutien me rassurent. Merci pour ces fois où tu m'as épaulée et encouragée. Merci pour ta patience et les moments, bons ou mauvais, que tu as partagés avec moi. Merci pour ton écoute même quand je te parle de mon projet que tu ne comprends pas bien, mais t'as appris quand même à bien prononcer *O*-GlcNAcylation. Merci pour ton amour qui continue à remplir ma vie de bonheur. J'espère qu'on réussira notre vie ensemble. Je t'embrasse très fort.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué d'une façon ou d'une autre à la réussite de mon projet, un grand merci à vous.

Table des matières

Partie 1 : Métabolisme et devenir des acides gras dans la cellule 25

1. La lipogenèse _____ 25

1.1. Elongation et désaturation des acides gras 25
1.2. Synthèse des triglycérides 26
1.3. Sécrétion des VLDL 26

2. Fatty Acid Synthase, FAS _____ 29

2.1. Caractéristiques générales 29
2.2. Les différents domaines de la FAS 31
2.3. Régulation de l'expression de la FAS 34
2.3.1. Au niveau transcriptionnel 34
2.3.1.1. Sterol Responsive Element Binding Protein (SREBP) 34
2.3.1.1.1. *Processus de maturation de SREBP et sa régulation* 35
2.3.1.2. Carbohydrate Responsive Element Binding Protein (ChREBP) 37
2.3.1.2.1. *Régulation de ChREBP* 38
2.3.1.3. Liver X Receptor (LXR) 39
2.3.1.4. Remodelage de la chromatine 40
2.3.1.5. Régulation par les microARNs 40
2.3.2. Au niveau post-traductionnel 41
2.3.2.1. Phosphorylation de la FAS 41
2.3.2.2. *S*-nitrosylation de la FAS 42
2.3.2.3. Ubiquitinylation de la FAS 42
2.3.2.4. Acétylation de la FAS 42
2.3.2.5. SUMOylation de la FAS 42
2.3.2.6. *O*-GlcNAcylation de la FAS 42
2.4. Les multiples rôles de la FAS 43
2.4.1. Rôles physiologiques 43
2.4.2. De la physiologie à la pathologie 44
2.4.3. FAS et cancer 45
2.4.3.1. Dérégulation de la FAS dans le cancer 46
2.4.3.1.1. Par les voies de signalisation 46
2.4.3.1.2. Par modifications post-traductionnelles 46
2.4.3.1.3. Par le microenvironnement tumoral 47
2.4.3.1.4. Polymorphisme de *FASN* 47
2.4.3.2. FAS comme cible thérapeutique 48
2.4.3.3. Mécanisme d'action de la FAS dans le cancer 48

Partie 2 : La O-β-N-Acétyl-glucosaminylation (O-GlcNAcylation) 51

1. Caractéristiques générales _____ 51

2. La voie de biosynthèse des hexosamines (HBP, hexosamine biosynthetic pathway) _____ 53

3. Les enzymes de la *O*-GlcNAcylation _____ 56

3.1. OGT (EC 2.4.1.255) 56
3.1.1. Découverte et localisation subcellulaire 56
3.1.2. Du gène à la protéine 57
3.1.3. Activité enzymatique 59
3.1.4. Activité protéolytique 60
3.1.5. Régulation post-traductionnelle 61
3.2. OGA (EC 3.2.1.169) 63
3.2.1. Découverte et caractéristiques générales 63
3.2.2. Du gène à la protéine 63
3.2.3. Activité enzymatique 65

3.2.4. Régulation post-traductionnelle 66

4. Inhibiteurs des enzymes de *O*-GlcNAcylation ____ 67

5. Homéostasie de la *O*-GlcNAcylation ____ 71

6. Fonctions biologiques régulées par *O*-GlcNAcylation ____ 73

6.1. Senseur de stress et survie cellulaire 74
6.2. Régulation transcriptionnelle et épigénétique 76
6.3. Régulation de la traduction 77
6.4. Régulation de la signalisation cellulaire 79
6.5. Développement embryonnaire 81
6.6. Neuroprotection 82

7. *O*-GlcNAcylation et pathologies ____ 82

7.1. Le diabète 83
7.2. Les maladies neurodégénératives 85
7.3. Les maladies cardiovasculaires 88
7.4. Le cancer 90
6.4.1. Reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses 90
7.4.2. Fonctions de la O-GlcNAcylation dans le cancer 92
7.4.2.1. Régulation du métabolisme 92
7.4.2.2. Régulation de la croissance et de la survie 93
7.4.2.3. Régulation de l'invasion, métastase et angiogenèse 94
7.4.3. La O-GlcNAcylation comme outil de diagnostic 95
7.4.4. La O-GlcNAcylation comme cible thérapeutique 96
6.4.5. Le carcinome hépatocellulaire (CHC) 97
6.4.5.1. Epidémiologie et facteurs de risque 97
6.4.5.2. Altérations génétiques, survenue et classification du CHC 99
6.4.5.3. Diagnostic, pronostic et prise en charge des patients 102
6.4.5.4. Augmentation de la lipogenèse dans le CHC 105
6.4.54.5. La *O*-GlcNAcylation dans le CHC 105

Partie 3 : La voie de signalisation mTOR 106

1. Caractéristiques générales ____ 106

2. Fonctions régulées par mTOR ____ 108

2.1. Synthèse protéique 108
2.2. Synthèse lipidique 109
2.3. Synthèse nucléotidique et homéostasie énergétique 109
2.4. Inhibition de l'autophagie 109

3. Régulation de l'activité de mTOR ____ 110

4. mTOR dans le cancer ____ 112

Partie 4 : La prolifération cellulaire 113

1. Les phases du cycle cellulaire ____ 114

2. Les points de contrôles du cycle cellulaire ____ 115

3. Régulation du cycle cellulaire par les complexes cycline-CDK ____ 115

3.1. La transition G0/G1 116
3.2. La transition G1/S 117
3.2.1. Inhibition de la transition G1/S 118
3.3. La transition G2/M 119
3.4. La transition métaphase/anaphase 120

4. Dérégulation du cycle cellulaire et cancer ____ 120

4.1. La dérégulation des acteurs du cycle cellulaire 121

4.1.1. p53 et Mdm2 121
4.1.2. pRb et p16 121
4.1.3. CDKs et leurs enzymes activatrices 121
4.1.4. Cyclines 122

5. Cycle cellulaire et métabolisme _____ 122
5.1. Implication du métabolisme dans le cycle cellulaire 123
5.1.1. Métabolisme du glucose 123
5.1.2. Métabolisme des lipides 123
5.1.3. Acétyl-CoA 124
5.1.4. O-GlcNAcylation 124
5.1.5. Le ratio ATP/AMP 125
5.2. Implication des acteurs du cycle cellulaire dans le métabolisme 128
5.2.1. Les cyclines de type D 128
5.2.2. CDK/pRB/E2F 129

***Objectifs des travaux de thèse*.....131**

***Travaux personnels :*.....133**

Partie 1 : La double régulation de l'expression de l'acide gras synthase (FAS) par la *O*-GlcNAc transférase (OGT) et la voie mTOR au cours de la prolifération cellulaire hépatique _____ 133
1. Contexte de l'étude 133
2. Résultats 134
2.1. Lien moléculaire entre la FAS et OGT 134
2.2. Corrélation positive entre l'expression de la FAS et l'activation de la voie mTOR dans différents modèles 136
2.3. L'expression de la FAS est dépendante de l'activité de l'OGT dans des cellules stimulées par le sérum 139
2.4. L'expression de la FAS est dépendante de l'activation de la voie mTOR au cours de la phase G1 du cycle cellulaire 142
2.5. Le blocage de l'activité FAS affecte l'expression de l'OGT et l'activation de la voie mTOR 144
3. Publication I 145
4. Résultats supplémentaires (non publiés) 163
4.1. Palmitoylation de l'OGT 163
4.2. Interaction FAS et mTOR 163

Partie 2 : Etude de l'expression de la FAS et de l'OGT dans les tissus cancéreux humains hépatiques _____ 164
1. Contexte de l'étude 164
2. Résultats 165
3. Publication II 168

Partie 3 : Localisation des sites de *O*-GlcNAcylation de la FAS (résultats préliminaires)_____ 180

Discussion _____ 181

Conclusion et perspectives_____ 184

Avant-propos

Cette thèse de doctorat a été menée au sein de l'Unité de Glycobiologie structurale et fonctionnelle (UGSF-UMR CNRS 8576) à Villeneuve d'Ascq dans l'équipe « Régulation des mécanismes moléculaires et cellulaires par *O*-GlcNAcylation » sous la direction du directeur de l'équipe, le Pr. Tony Lefebvre.

Cette thèse a été financée par l'Université de Lille et la Région Hauts-de-France et a fait l'objet de publications, et de communications orales et par affiches présentées ci-dessous.

Publications :

Sadia Raab, Alexis Gadault, Ninon Very, Amélie Decourcelle, Steffi Baldini, Céline Schulz, Marlène Mortuaire, Quentin Lemaire, Stéphan Hardivillé, Vanessa Dehennaut, Ikram El Yazidi-Belkoura, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Ganna Panasyuk, and Tony Lefebvre (2021). Dual regulation of fatty acid synthase (FASN) expression by *O*-GlcNAc transferase (OGT) and mTOR pathway in proliferating liver cancer cells. *Cellular and Molecular Life Science.* 2021 Jul;78(13):5397-5413

Sadia Raab, Ninon Very, Belinda Duchene, Pierre Rybarczyl, Nicolas Jonckheere, Ikram El Yazidi-Belkoura, and Tony Lefebvre (2022). Evaluation of the expression of fatty acid synthase and *O*-GlcNAc transferase in patients with liver cancer by exploration of transcriptome databases and experimental approaches. *Oncology letters. Sous-presse*

Sadia Raab et Tony Lefebvre (2021). L'acide gras synthase, une enzyme multi-FAS-ettes. *Médecine et sciences. Soumis pour publication*

Communications orales :

Sadia Raab « Connection of metabolic disorders to cancer emergence : dual regulation of fatty acid synthase (FAS) expression by *O*-GlcNAcylation and mTOR during hepatic cell proliferation » 20ème journée André Verbert (JAV) (session en anglais), 27 novembre 2020. Lille, France

Sadia Raab « Connection of metabolic disorders to cancer emergence : dual regulation of fatty acid synthase (FAS) expression by *O*-GlcNAcylation and mTOR during hepatic cell proliferation » Journée scientifique de l'UMR 8576 (présentation en anglais), 25 Juin 2021. Villeneuve d'Ascq, France

Communications par affiche:

Sadia Raab, Ninon Very, Steffi Baldini, Stéphan Hardivillé, Marlène Mortuaire, Ikram El Yazidi-Belkoura, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Tony Lefebvre « Connection of metabolic disorders to tumor

emergence: regulation of fatty acid synthase by *O*-GlcNAcylation during cell proliferation » 30th Joint Glycobiology Meeting, 27-29 Octobre 2019. Lille, France.

Sadia Raab, Alexis Gadault, Ninon Very, Amélie Decourcelle, Céline Schulz, Julien Thévenet, Stéphan Hardivillé, Quentin Lemaire, Marlène Mortuaire, Vanessa Dehennaut, Ikram El Yazidi-Belkoura, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Ganna Panasyuk, and Tony Lefebvre « Regulation of fatty acid synthase by *O*-GlcNAcylation and mTOR during cell proliferation » Journée annuelle de l'axe 1 du Cancéropôle Nord-Ouest, 3 Novembre 2020. Réunion digitale

Sadia Raab, Alexis Gadault, Ninon Very, Amélie Decourcelle, Céline Schulz, Julien Thévenet, Stéphan Hardivillé, Quentin Lemaire, Marlène Mortuaire, Vanessa Dehennaut, Ikram El Yazidi-Belkoura, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Ganna Panasyuk, and Tony Lefebvre « Regulation of fatty acid synthase by *O*-GlcNAcylation and mTOR during cell proliferation » Journée annuelle de l'axe 1 du Cancéropôle Nord-Ouest, 13-15 Octobre 2021.

Distinctions :

Prix de la meilleure communication orale : 20ème Journée André Verbert (conférence annuelle des doctorants) « session en anglais », 11 décembre 2020. Lille, France.

Résumé

Une caractéristique des cellules cancéreuses est la reprogrammation métabolique. En ce sens, l'acide gras synthase (FAS, *Fatty Acid Synthase*), enzyme de biosynthèse des acides gras, est plus active dans les cellules cancéreuses. Récemment, il a été montré qu'au travers de l'augmentation du flux de la voie des hexosamines (HBP, *Hexosamine Biosynthetic Pathway*) dont le produit final est l'UDP-GlcNAc, les cellules cancéreuses élèvent leurs niveaux de *O*-GlcNAcylation, une modification réversible des protéines nucléocytoplasmiques et mitochondriales. Elle est régulée par deux enzymes antagonistes : l'OGT (*O*-GlcNAc transférase), qui transfère le résidu GlcNAc à partir de l'UDP-GlcNAc sur le groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine des protéines cibles, et l'OGA (*O*-GlcNAcase) qui l'hydrolyse. La synthèse d'UDP-GlcNAc fait intervenir différents nutriments tels que le Glc (glucose) et plus largement les monosaccharides, l'ensemble des acides aminés, la Gln (glutamine) en particulier, les acides gras et l'UTP. Par conséquent, l'UDP-GlcNAc est un véritable senseur nutritionnel au carrefour des différents métabolismes. Un déséquilibre alimentaire se traduit par des anomalies de *O*-GlcNAcylation des protéines, certaines associées aux maladies neurodégénératives et cardiovasculaires, au diabète de type 2 ou aux cancers, en particulier ceux liés aux troubles métaboliques.

Les travaux de l'équipe sur la lipogenèse hépatique ont montré que la FAS est *O*-GlcNAcylée de manière nutrition dépendante. La *O*-GlcNAcylation de la FAS résulte en une réduction de sa dégradation protéasomale et par conséquent en une augmentation de son expression et de son activité. La FAS et l'OGT sont toutes deux plus exprimées dans les tissus tumoraux en comparaison aux tissus sains et semblent être impliquées de manière active dans les mécanismes de tumorigenèse. Certains cancers dont le cancer hépatique sont intimement dépendants des conditions nutritionnelles, un déséquilibre alimentaire ou une pathologie métabolique favorisant leur incidence. Selon GLOBOCAN (*in the world*, 2020), le cancer hépatique représente le 6ème cancer par sa fréquence (905.677 nouveaux cas/an) et est classé 3ème en termes de mortalité (830.180 décès/an), après le cancer du poumon et le cancer colorectal. L'équipe a également montré une régulation réciproque entre la *O*-GlcNAcylation et la voie mTOR. Ainsi, l'objectif de ma thèse a été de mieux comprendre le lien entre *O*-GlcNAcylation, voie mTOR (elle-même dépendante de la nutrition) et expression de la FAS au cours de la prolifération cellulaire, et de relier ces éléments à l'émergence du cancer hépatique. Nous proposons que la suractivation de l'axe mTOR/OGT/FAS dans un contexte de dérégulation nutritionnelle soit un facteur lié à la cancérisation.

Par diverses approches, nous avons montré que la FAS et l'OGT co-localisent majoritairement au niveau cytoplasmique. Cette interaction se fait de manière cycle cellulaire-dépendante tout en suivant l'expression même de la FAS. Nous montrons que l'expression de la FAS dépend de l'OGT lors de la stimulation par le sérum. Le niveau de la FAS est également corrélé avec l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR dans les cellules cancéreuses hépatiques, dans des foies de souris obèses et dans un modèle murin d'activation chronique de la voie mTOR.

Nos résultats indiquent que la FAS est sous le double contrôle nutritionnel de l'OGT et de mTOR. En retour, le blocage de la FAS réduit les niveaux d'OGT et de *O*-GlcNAcylation, ainsi que l'activation de mTOR, mettant en évidence une régulation réciproque entre ces acteurs.

L'hyperactivité de la FAS et de la voie mTOR expliquerait comment en partie certaines pathologies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type 2 soient un terreau propice à l'émergence tumorale hépatique. Une meilleure sensibilisation à ces facteurs de risque permettrait de réduire et de mieux prévenir ces types de cancer en constante augmentation dans nos sociétés.

Abstract

One of the cancer hallmarks is metabolic reprogramming. In this sense, Fatty Acid Synthase (FAS), the enzyme responsible for the biosynthesis of fatty acids, is more heavily active in cancer cells. More recently, it has been shown that by increasing the flux of the hexosamine biosynthetic pathway (HBP) which provides UDP-GlcNAc, cancer cells raise their levels of *O*-GlcNAcylation. *O*-GlcNAcylation is a reversible modification of nucleocytoplasmic and mitochondrial proteins managed by two antagonistic enzymes: OGT (*O*-GlcNAc transferase), that transfers the GlcNAc monosaccharide from UDP-GlcNAc to serine and threonine residues of target proteins, and OGA (*O*-GlcNAcase) that removes it. The synthesis of UDP-GlcNAc involves various metabolic precursors such as glucose and more generally monosaccharides, all amino-acids with glutamine in particular, fatty acids and UTP. Therefore, UDP-GlcNAc is a metabolic sensor at the crossroads of carbohydrates, fats, proteins and nucleotides metabolisms. As a result, nutritional imbalance results in protein *O*-GlcNAcylation abnormalities, some associated with neurodegenerative and cardiovascular diseases, type 2 diabetes, or cancer, especially those related to metabolic disorders.

My team showed that FAS is *O*-GlcNAcylated in a nutrition-dependent manner. The *O*-GlcNAcylation of FAS promotes its expression and its activity by preventing its proteasomal degradation. FAS and OGT are more heavily expressed in tumors when compared to healthy tissues and both enzymes seem to be involved in tumorigenesis. Certain cancers, including hepatic cancer, are closely dependent on nutritional conditions, a dietary imbalance or metabolic pathology favoring their incidence. According to GLOBOCAN (in the world, 2020), hepatic cancer is ranked 6th in terms of frequency (905.677 new cases per year) and 3rd in terms of mortality (830.180 deaths per year), behind lung and colorectal cancers.

My team also showed a reciprocal regulation between *O*-GlcNAcylation and the PI3K/AKT/mTOR pathway. Thus, the goal of my thesis was to better understand the link between *O*-GlcNAcylation, mTOR pathway (itself intimately dependent on nutrition) and FAS expression during cell proliferation and the relationship with the emergence of hepatic cancer.

We propose that the axis mTOR/OGT/FAS is a key-actor linked to cancerization in a nutrient deregulated context.

By using biochemical and microscopy approaches, we showed that FAS co-localizes with OGT in the cytoplasm and, to a lesser extent, in the membrane fraction. This interaction occurs in a cell cycle-dependent manner, following the pattern of FAS expression. Moreover, we showed that FAS expression depends on OGT upon serum stimulation. The level of FAS also correlates with the

activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway in hepatic cell lines, and in livers of obese mice and in a chronically activated insulin and mTOR signaling mouse model (PTEN-*null* mice). These results indicate that FAS is under a dual control of *O*-GlcNAcylation and mTOR pathway. In turn, blocking FAS with the small-molecule inhibitor C75 reduces both OGT and *O*-GlcNAcylation levels, and mTOR activation, highlighting a reciprocal regulation between these actors

The exacerbation of the activity of FAS and mTOR signaling pathway could explain in part how certain metabolic pathologies such as obesity and type 2 diabetes can promote the emergence of hepatic tumors. Better awareness of these risk factors would reduce and better prevent these types of cancer which are constantly increasing in our societies.

Abréviations et nomenclature

3'UTR: 3'-untranslated transcribed region

4E-BP1: eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1

5'TOP: 5'terminal oligopyrimidine tract

5hmC: 5-hydroxyméthylCytosine

5mC: 5-méthylCytosine

A

AA: acides aminés

Ac_4-5S-GlcNAc: 2-acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-5-thio-α-D-glucopyranose

ACC: acétyl-CoA carboxylase

ACLY: ATP citrate lyase

ACP: acyl carrier protein

ACSL: long-chain-acyl-CoA synthase

ADN: acide désoxyribonucléique

AFP: alpha-fœto- protéine

AG: acide gras

AGCL: acide gras à longue chaîne

AGI: acide gras insaturé

AGPAT: acylglycérol-3-phosphate acyltransférase

AKT: protéine kinase B - sérine/thréonine kinase

ALAT: alanine aminotransférase

AMP: adénosine monophosphate

AMPc: adénosine monophosphate cyclique

AMPK: AMP-activated protein kinase

APC/C: anaphase promoting complex/cyclosome

APC: adenomatous polyposis coli

APP: amyloid precursor protein

AR: androgen receptor

ARNm: acide ribonucléique messager

AS160: AKT substrate of 160 kDa

ASH: alcoholic steatohepatitis

ATF4: activating transcription factor 4

ATG13: autophagy-related protein 13

ATM: ataxia telangiectasia mutated

ATP: adénosine triphosphate

Aβ: amyloïdes β

B

BADGP: benzyl-2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyranoside

BAP1: protéine 1 associée à BRCA

BCAA: branched-chain amino-acids

BCLC: Barcelona clinic liver cancer

bHLH/ZIP: basic helix-loop-helix/leucine zipper

BRCA: breast cancer gene

BTAF1: B-TFIID TATA-Box binding protein associated factor 1

BTB/POZ: bric-à-brac tramtra TCA broad complex/pox viruses and zinc fingers

BZX: benzoxazolinone

C

C/EBP β: CCAAT/enhancer-binding protein β

CAD: carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamoylase, dihydro-orotase

CaMKII: calcium-/calmodulin-dependent kinase II

CAP2: adenylyl catalase-associated protein 2

CAR T: chimeric antigen receptor T

CAZy: carbohydrate active enzyme

C-cat: carboxy (C)-terminal-catalytic domain

Cdc25A: cell division cycle 25A

CDI: catalytic domain I

CDII: catalytic domain II

CDK: cyclin-dependent kinase

CHC: carcinome hépatocellulaire

Chk1: checkpoint kinase 1

CHOP: C/EBP homologous protein

ChoRE: carbohydrate responsive element

ChREBP: carbohydrate responsive element binding protein

CK: cycle de Krebs

CKI: cyclin-dependent kinase

c-Met: tyrosine-protein kinase Met

COPII: coat protein II

COX: cytochrome c oxydase

CRTC2: CREB regulated transcription coactivator 2

CSE: cellules souches embryonnaires

CTCs: cellules tumorales circulantes

CTD: C-terminal domain

ctDNA: circulating tumor DNA

CTLA4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

Cys: cystéine

D

DAG: diacylglycérol

DCP: des-γ-carboxyprothrombin

DEP: dishevelled, Egl-10 and pleckstrin domain

DEPTOR: DEP domain containing mTOR interacting protein

DGAT: diacylglycérol *O*-acyltransférase

DGAT2: diacylglycérol *O*-acyltransférase 2

DH: déshydratase

DNL: *de novo* lipogenesis

DON: 6-diazo-5-oxo-L-norleucine

DT1: diabète de type 1

DT2: diabète de type 2

E

E2F1: E2F transcription factor 1

E3 β-TrCP1: β-transducin repeats-containing protein 1

EC: enzyme commission

EC_{50}: half maximal effective concentration

ECOG: eastern cooperative oncology group

EGF: epidermal growth factor

EGFR: epidermal growth factor-receptor

eIF2α: eukaryotic initiation factor 2-alpha

eIF4E: eukaryotic initiation factor 4E

ELOVL: elongation of very long chain fatty acids

EMT: epithelial-mesenchymal transition

EOGT: EGF-domain specific OGT

ER: énoyl réductase

ETA: embolisation transartérielle

ETC: electron transport chain

F

FAS: fatty acid synthase

FBXW7: F-box and WD repeat domain-containing 7

FH: fumarate hydratase

FoxO1: forkhead box protein O1

FRB: FKBP12-rapamycin binding domain

Fru-1,6-bisP: fructose-1,6-bisphosphate

Fru-6-P: fructose-6-phosphate

G

G1-pm: G1-post mitotique

G1-ps: G1-pré-S

G3P: glycérol-3-Phosphate

GALC: galactosylcéramidase

GEPIA: gene expression interactive analysis

GFAT: glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase

GFP: green fluorescent protein

GH84: glycoside hydrolase family 84

Glc: glucose

Glc-6-P: glucose-6-phosphate

Glc-6-PD: glucose-6-phosphate déshydrogénase

GlcNAc-6-P: N-acétylglucosamine-6-phosphate

GlcNAc PM: GlcNAc phosphomutase

$GlcNH_2$: glucosamine

$GlcNH_2$-6-P AcT: glucosamine-6-phosphate acétyltransférase

$GlcNH_2$-6-P: glucosamine-6-phosphate

Gln: glutamine

Glu: glutamate

GLUT: glucose transporter

GP73: protéine golgienne de 73 kDa

GPAT: glycérol-3-phosphate acyltransférase

GPC3: glypican-3

GPCR: G-protein coupled receptor

GS: glutamine synthase

GSK3β: glycogène synthase kinase 3β

GT-B: glycosyl transférase de type B

GβL: G protein β subunit-like

H

HAT: histone acétyl-transférase

HbA1c: hémoglobine glyquée A1c

HBP: hexosamine biosynthetic pathway

HBV: hepatitis B virus

HCD: higher-energy collision dissociation

HCF-1: host cell factor-1

HCV: hepatitis C virus

HDAC: histones désacétylase

HER2: human epidermal growth factor receptor 2

HexC: hexosaminidase C

HIF1α: hypoxia-inducible-factor-1 α

HK2: hexokinase 2

HNF4 α: facteur nucléaire 4 alpha hépatocytaire

HOX: homeobox

HSF1: heat shock factor 1

HSP: heat shock protein

I

I/R: ischémie/reperfusion

IC50: half-maximal inhibitory concentration

IHC: immunohistochimie

IHH: immortalized human hepatocyte

IKK: inhibitory kappa B kinase

IL6: interleukine 6

IMC: indice de masse corporelle

Insig: insulin-induced gene

Int-D: intervening domain

IRM: imagerie par résonnance magnétique

IRS: insulin receptor substrate

IκBα: inhibitory κB α

K

KAT: lysine acetyl-transférase

Kd: dissociation constant

KD: knockdown

KO: knockout

KR: keto-acylreductase

KS: Keto-acylsynthase

L

LC-MS/MS: liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry

L-OGA: long-OGA

LPA: acide lysophosphatidique

LPS: lipopolysaccharides

LSD2: lysine-specific histone déméthylase 2

LXR: liver x receptor

LXRE: LXR responsive-element

M

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MAT: malonyl/acétyltransférase

MCM: minichromosome maintenance

MDH: malate déshydrogénase

Mdm2: murine double minute-2

miARNs: microARNs

Min6: mouse-insulinoma-6

mLST8: mammalien lethal with SEC13 protein 8

MLX: max-like protein X

mOGT: mitochondrial OGT

mPTP: mitochondrial permeability transition pore

MPTs: modifications post-traductionnelles

MSI: microsatellite instability

mSIN1: MAPKAP1) mitogen-activated protein kinase-associated protein 1

MTHFD2: methylene tetrahydrofolate dehydrogenase 2

mTOR: mammalian/mechanistic target of rapamycin

mTORC1: mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1

mTORC2: mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 2

MTP: microsomal triglyceride transfer protein

MTS: mitochondrial targeting sequence

MUC2: mucine 2

N

NADP: nicotinamide adénine dinucléotide-phosphate

NAGK: N-acétylglucosamine kinase

NASH: non-alcoholic steatohepatitis

N-Cat: amino (N)-terminal-catalytic domain

ncOGT: nucleocytoplasmic OGT

NEBD: nuclear envelope breackdown

NeuroD1: neurogenic differenciation 1

NFTs: neurofibrillary tangles

NIK: NF-κB-inducing kinase

NLS: nuclear localization signal

NO: oxyde nitrique

N-Ras: neuroblastoma Ras viral oncogene homolog

NRF1: nuclear respiratory factor 1

O

OA: okadaic acid

OGA: *O*-β-D-N-acétylglucosaminidase ou *O*-GlcNAcase

***O*-GlcNAcylation:** *O*-β-N-Acétyl-glucosaminylation

OGT: polypeptide *O*-β-D-N-acétylglucosaminyl-transférase ou *O*-GlcNAc transferase

OSMI: OGT small molecule inhibitor

P

p38MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase

p70S6K: ribosomal protein S6 kinase

PA: acide phosphatidique

PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1

PAP: phosphatase acide phosphatidique

PD-1: programmed cell death 1

PDK1: phosphoinositide-dependent kinase-1

PD-L1: programmed death-ligand 1

PDX1: pancreatic and duodenal homeobox 1

PEG: polyéthylène glycol

PERK: PKR-like ER protein kinase

PFK1: phosphofructokinase-1

PFK2: phosphofructokinase-2

PFKFB3: 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3

PGC-1α: Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator 1-α

PGK1: phosphoglycérate kinase-1

pH: potential d'hydrogène

PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase

PIKK: phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase

PIP2: phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

PIP3: phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

PK: pyruvate kinase

PKA: protéine kinase A

PKM2: pyruvate kinase M2

PLA: proximity ligation assay

PLB: phospholamban

PP1: protéine phosphatase 1

PP2A: protéine phosphatase 2A

PPAR: peroxisome proliferator-activated receptor

PPO: PIP-binding activity of OGT

PPP: pentoses-phosphate pathway

PRAS40: proline-rich AKT substrate 40 KDa

pRb: protéine du rétinoblastome

PRC2: complexe répresseur polycomb 2

pré-miARNs: miARNs précurseurs

pri-miARNs: miARNs primaires

PTEN: phosphatase and tensin homolog

PVS/T: proline-valine-sérine/thréonine

R

RAPTOR: regulatory-associated protein of mTOR

RE: *reticulum* endoplasmique

Rheb: Ras homolog enriched in brain

RICTOR: RPTOR independent/rapamycin insensitive companion of mTOR complex 2

ROS: reactive oxygen species

RSEM: RNA-Seq by expression maximization

RT-qPCR: real-time polymerase chain reaction

RXR: retinoid x receptor

S

S1P: site-1 protease

S2P: site-2 protease

SCAP: SREBP cleavage-activating protein

SCD: stéaroyl-CoA désaturase

SDH: succinate déshydrogénase

Ser: sérine

SERCA2a: sarcoplasmic/endoplasmic *reticulum* Ca^{2+} ATPase

SMPD4: sphingomyéline phosphodiestérase 4

SNPs: single nucleotide polymorphisms

S-OGA: short-OGA

sOGT: short OGT

Sp1: specificity protein 1

SRE: serum responsive element

SREBP: sterol responsive element binding protein

STAT5: signal transducer and activator of transcription 5

STZ: streptozotocine

SUMO: small ubiquitin-related modifier

T

TAAs: tumor-associated antigens

TBP: TATA binding protein

TE: thioestérase

TET: ten-eleven-translocation

TG: triglycérides

Thr: thréonine

TIM-3: T-cell immunoglobulin and mucin domain-3

TNF-α: tumor necrosis factor-α

TOR: the target of rapamycin

TP53: tumor protein p53

TPR: tetratricopeptide repeats

TSC1/2: tuberous sclerosis complex 1/2

U

UDP: uridine diphosphate

UDP-GlcNAc PPase: UDP-N-acétylglucosamine pyrophosphorylase

UDP-GlcNAc: UDP-N-acétylglucosamine

ULK1: unc-51-like autophagy-activating kinase 1

UPR: unfolded protein response

USF1: upstream stimulatory factor-1

USP2a: ubiquitin-specific protease-2a

UTP: uridine triphosphate

V

Val: valine

VDAC: voltage-dependent anion channel

VLDL: very low density lipoproteins

W

WB: Western blot

X

Xbp1s: transcription factor spliced X-box binding protein 1

XLID: x-linked intellectual disability

Xu-5-P: xylulose-5-phosphate

β-TrCP1: β-transducin repeats-containing protein 1

Table des figures et des tableaux

Figure 1 : **Schéma général de la lipogenèse et rôles physiologiques de la FAS**

Figure 2 : **Distribution tissulaire de la FAS.**

Figure 3 : Structure de la FAS.

Figure 4 : Le cycle catalytique de la FAS.

Figure 5 : Processus de maturation des facteurs de transcription SREBPs.

Figure 6 : Activation du facteur de transcription ChREBP.

Figure 7 : **Régulation de la FAS et implication dans le processus tumoral.**

Figure 8 : **La *O*-GlcNAcylation.**

Figure 9 : Voie de biosynthèse des hexosamines.

Figure 10 : Régulation de l'OGT en fonction des conditions nutritionnelles

Figure 11: Gène, structure et isoformes de l'OGT humaine.

Figure 12 : Mécanisme catalytique de l'OGT.

Figure 13 : Clivage protéolytique de HCF-1 par l'OGT.

Figure 14 : Modifications post-traductionnelles identifiées sur l'OGT.

Figure 15: Gène, structure et isoformes de l'OGA humaine.

Figure 16: **Activité catalytique de l'OGA**.

Figure 17: **Modifications post-traductionnelles identifiées sur l'OGA**.

Figure 18 : Les principales fonctions cellulaires régulées par *O*-GlcNAcylation.

Figure 19 : Régulation de la réponse au stress par *O*-GlcNAcylation.

Figure 20 : Régulation de la transcription, de la traduction et des évènements épigénétiques par *O*-GlcNAcylation.

Figure 21 : Régulation de la signalisation cellulaire par *O*-GlcNAcylation.

Figure 22 : Régulation du développement par *O*-GlcNAcylation.

Figure 23 : La *O*-GlcNAcylation régule le phénotype cancéreux.

Figure 24 : Implication de la *O*-GlcNAcylation dans le diabète de Type 2.

Figure 25 : Implication de la *O*-GlcNAcylation dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

Figure 26 : Implication de la *O*-GlcNAcylation dans les maladies cardiovasculaires.

Figure 27 : Dérégulation métabolique des cellules cancéreuses.

Figure 28 : La *O*-GlcNAcylation régule le phénotype cancéreux.

Figure 29 : Incidence, mortalité et facteurs du risque du carcinome hépatocellulaire (CHC).

Figure 30 : Mise en place du carcinome hépatocellulaire.

Figure 31 : Pronostic et traitements du CHC.

Figure 32 : Structure de mTORC1 et mTORC2.

Figure 33 : Les fonctions de mTOR.

Figure 34 : Activation de la voie mTOR.

Figure 35 : **Les différentes phases du cycle cellulaire ainsi que leur régulation.**

Figure 36 : **Activation de la phase G1 du cycle cellulaire.**

Figure 37 : **Régulation de pRb et progression du cycle cellulaire en phase G1.**

Figure 38 : **Surveillance de la transition G1/S.**

Figure 39 : **Surveillance de la réplication de l'ADN en phase G2.**

Figure 40 : **Dérégulation des acteurs du cycle cellulaire dans le cancer.**

Figure 41 : **Rôle du métabolisme dans le cycle cellulaire.**

Figure 42 : **Rôle des acteurs du cycle cellulaire dans la régulation du métabolisme.**

Figure 43 : **Régulation hypothétique de la FAS par *O*-GlcNAcylation et la voie mTOR au cours de la prolifération cellulaire hépatique.**

Figure 44 : **Lien moléculaire entre FAS et OGT.**

Figure 45 : **Lien entre FAS, *O*-GlcNAcylation et mTOR chez les souris obèses *ob/ob versus* contrôles C57Bl6**.

Figure 46 : **Lien entre FAS, *O*-GlcNAcylation et mTOR chez les souris PTEN KO *versus* souris WT**.

Figure 47 : **L'expression de la FAS est dépendante de l'activité catalytique de l'OGT dans les cellules stimulées par le sérum**.

Figure 48 : **L'expression de la FAS est dépendante de l'activation de la voie mTOR au cours de la phase G1 du cycle cellulaire**.

Figure 49 : **L'expression de l'OGT et l'activation de la voie mTOR sont dépendantes de l'activité de la FAS**.

Figure 50 : **Analyse de la palmitoylation potentielle de l'OGT.**

Figure 51 : **Visualisation de l'interaction FAS-mTOR dans des cellules HepG2 asynchrones.**

Figure 52 : Analyse de données transcriptomiques de la FAS et de l'OGT.

Figure 53 : Analyse de l'expression de la FAS et de l'OGT dans les lignées cancéreuses hépatiques.

Figure 54 : Analyse de l'expression de la FAS et de l'OGT dans des tissus cancéreux humains hépatiques.

Figure 55 : **Représentation schématique des différentes activités de la FAS.**

Tableau 1 : Les inhibiteurs de l'OGT.

Tableau 2 : Les inhibiteurs de l'OGA.

Tableau 3 : Les inhibiteurs des enzymes de la voie des hexosamines.

Tableau 4 : Les différentes classes du CHC.

Généralités

Partie 1 : Métabolisme et devenir des acides gras dans la cellule

1. La lipogenèse

La lipogenèse, voie de biosynthèse *de novo* des AG (acides gras) à partir des glucides, est principalement hépatique et adipocytaire. Néanmoins, en fonction de certaines conditions physiologiques, d'autres organes prennent part à ce processus, c'est le cas des glandes mammaires en période de lactation (Suburu et al., 2014).

La lipogenèse est conditionnée par les apports nutritionnels notamment en glucose, principal fournisseur en atomes de carbone au cours de la lipogenèse (Hudgins et al., 1996). Le glucose est métabolisé en pyruvate, produit final de la glycolyse, qui entre dans la mitochondrie pour être activé en acétyl-CoA. La navette citrate-pyruvate permet à l'acétyl-CoA d'être exporté vers le cytosol, compartiment de la lipogenèse. Une fois dans le cytosol, le citrate est clivé par ACLY (ATP (adénosine triphosphate) citrate lyase) pour donner l'oxaloacétate et l'acétyl-CoA, précurseur de la lipogenèse. L'acétyl-CoA est carboxylé par ACC (acétyl-CoA carboxylase) pour former le malonyl-CoA. Le malonyl-CoA et l'acétyl-CoA sont les deux substrats de l'acide gras synthase plus connue sous l'abréviation FAS ou FAS pour *Fatty Acid Synthase* en anglais, la deuxième enzyme de la lipogenèse derrière ACC.

La synthèse des acides gras nécessite également un coenzyme réduit qui est le NADP (nicotinamide adénine dinucléotide-phosphate) H,H^+ provenant de deux sources principales: la voie des pentoses phosphates (PPP pour pentoses-phosphate pathway) et la décarboxylation du malate par l'enzyme malique MDH (malate déshydrogénase) au cours de la régénération de l'oxaloacétate par la navette citrate-pyruvate (**Fig. 1**).

1.1. Elongation et désaturation des acides gras

Le palmitate (C16 :0) est le premier AG saturé synthétisé de manière endogène par la FAS. Le palmitate peut suivre deux destinées.

Le premier devenir du palmitate passe par la synthèse d'acides gras saturés plus longs grâce à l'intervention d'élongases, enzymes d'élongation des AG à très longues chaines ELOVL (elongation of very long chain fatty acids) liées à la membrane du RE (*reticulum* endoplasmique). Six protéines de la famille ELOVL sont identifiées chez les mammifères et sont classées en deux groupes : les isoformes 1, 3 et 6 permettent l'élongation des acides gras saturés et monoinsaturés alors que les AG polyinsaturés sont allongés par les isoformes 2, 4 et 5 (Jakobsson et al., 2006). L'élongation se fait par condensation

successive de malonyl-CoA avec l'acyl-CoA puis par une réaction de réduction par le NADPH,H^+. Le premier AG saturé synthétisé à partir du palmitate est l'acide stéarique (C18 :0).

Le palmitate peut également poursuivre son métabolisme vers la synthèse d'acides gras insaturés grâce aux SCD (stéaroyl-CoA désaturases), enzymes également liées à la membrane du RE. Deux isoformes (SCD1 et SCD5) ont été identifiées chez l'homme alors qu'on en retrouve quatre chez la souris (SCD1-SCD4). Une surexpression de SCD1 dans les cellules du cancer du sein a été montrée en corrélation avec une augmentation de l'invasion et de la migration des cellules cancéreuses (Angelucci et al., 2018). Dans la même étude, les auteurs ont montré que le KD (knockdown) de SCD5 promeut la mort par nécrose des cellules cancéreuses mammaires MCF-7.

1.2. Synthèse des triglycérides

Dans la circulation, les AGI (acides gras insaturés) ou les AGCL (acide gras à longue chaîne) sont majoritairement liés à l'albumine. Plusieurs étapes sont impliquées dans leur assimilation. Ceci inclut la dissociation des AG de l'albumine, leur transport au travers de la membrane des hépatocytes, leur liaison aux protéines intracellulaires et leur estérification sous forme d'acyl-CoA grâce à l'ACSL (long-chain-acyl-CoA synthase). Les AG sont aussi une source principale de TG (triglycérides) (Donnelly et al., 2005). Ainsi, les chaines d'acyl-CoA sont condensées au G3P (glycérol-3-phosphate) par GPAT (glycérol-3-phosphate acyltransférase), enzyme mitochondriale et microsomale pour former le LPA (acide lysophosphatidique) qui, après une seconde réaction d'acylation, génère le PA (acide phosphatidique). Cette réaction est catalysée par AGPAT (acylglycérol-3-phosphate acyltransférase), enzyme également liée à la membrane du RE. Le PA peut alors être déphosphorylé par PAP (phosphatase acide phosphatidique) pour former le DAG (diacylglycérol). Le DAG participe à la synthèse des phospholipides et des triglycérides. Cette dernière réaction est catalysée par DGAT (diacylglycérol *O*-acyltransférase) (Alves-Bezerra and Cohen, 2017).

1.3. Sécrétion des VLDL

Les VLDL (very low density lipoproteins) sont des particules lipoprotéiques par lesquelles les acides gras estérifiés sont exportés du foie vers les tissus périphériques comme le muscle squelettique en vue de leur oxydation et le tissu adipeux où ils constituent une forme de réserve énergétique. L'assemblage des VLDL se fait dans le RE suivant deux étapes. Il débute par l'incorporation d'une petite quantité de TG à une apolipoprotéine, apoB100, pour former une pré-particule VLDL. Cette étape est catalysée par l'enzyme MTP (microsomal triglyceride transfer protein). La deuxième étape consiste en la fusion des pré-particules de VLDL avec les particules riches en triglycérides. C'est sous cette forme que les TG sont exportés vers les tissus périphériques (Cohen and Fisher, 2013).

Les AG et leurs dérivés activés acyl-CoA agissent non seulement comme substrats pour la synthèse et l'oxydation des lipides dans un contexte de mise en réserve énergétique, mais ils sont également impliqués dans une large gamme de processus intracellulaires parmi lesquels la palmitoylation des protéines, la biosynthèse des membranes biologiques, la signalisation et la prolifération cellulaire (Faergeman and Knudsen, 1997).

Dans le présent mémoire, je vais me focaliser sur le rôle des AG dans la prolifération cellulaire par l'étude du rôle de la FAS, enzyme clé de biosynthèse des acides gras, dans la prolifération cellulaire hépatique.

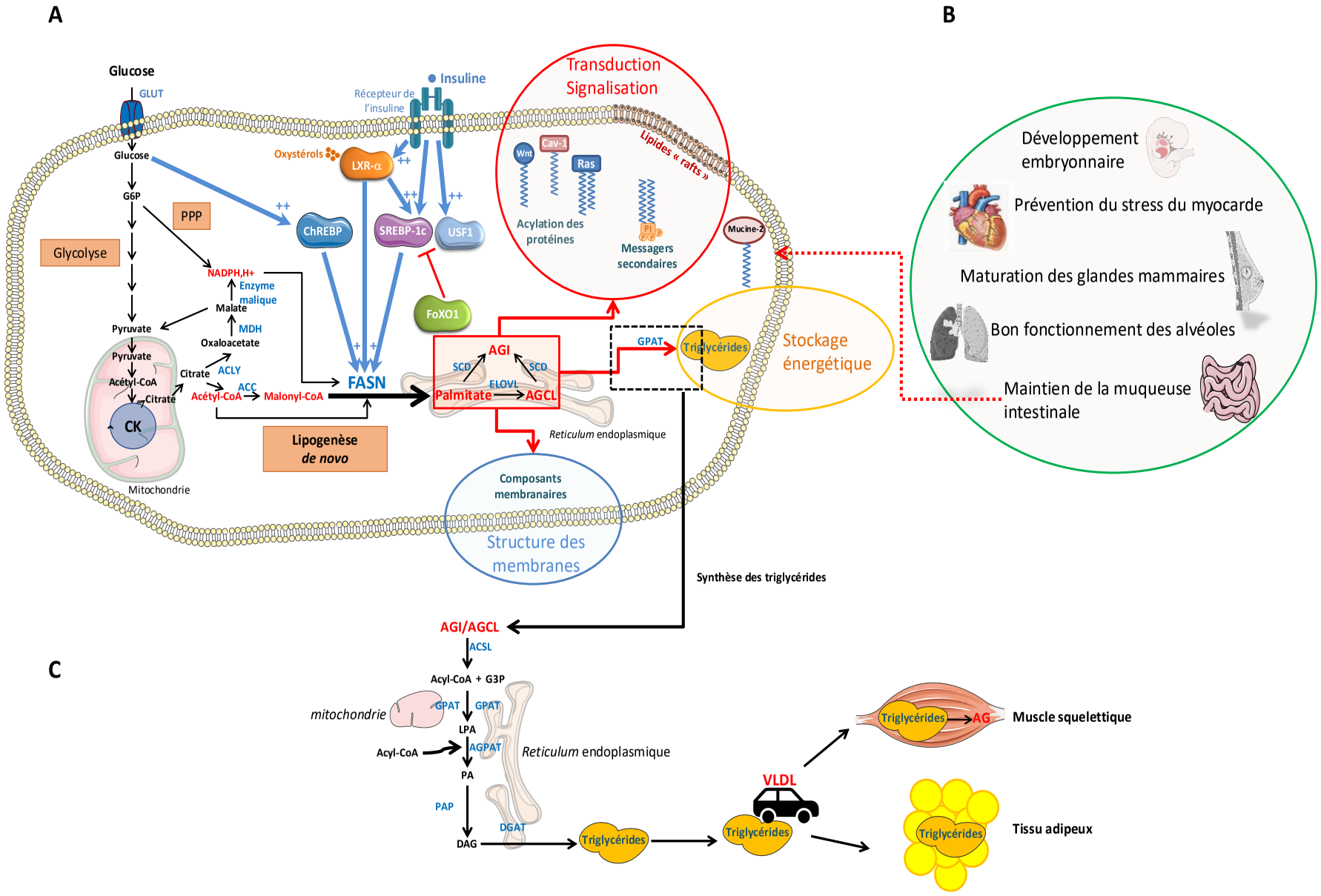

A
B
C
Glucose
GLUT
Glucose
G6P
Glycolyse
PPP
Pyruvate
Pyruvate
Acétyl-CoA
Citrate
CK
Mitochondrie
NADPH,H+
Enzyme malique
Malate
MDH
Oxaloacetate
Citrate
ACLY
Acétyl-CoA
ACC
Malonyl-CoA
Lipogenèse de novo
Insuline
Récepteur de l'insuline
Oxystérols
LXR-α
ChREBP
SREBP-1c
USF1
FoXO1
FASN
AGI
SCD
SCD
Palmitate
ELOVL
AGCL
GPAT
Triglycérides
Stockage énergétique
Reticulum endoplasmique
Composants membranaires
Structure des membranes
Transduction Signalisation
Lipides « rafts »
Wnt
Cav-1
Ras
Acylation des protéines
Messagers secondaires
Mucine-2
Développement embryonnaire
Prévention du stress du myocarde
Maturation des glandes mammaires
Bon fonctionnement des alvéoles
Maintien de la muqueuse intestinale
Synthèse des triglycérides
AGI/AGCL
ACSL
Acyl-CoA + G3P
mitochondrie
GPAT
GPAT
LPA
Acyl-CoA
AGPAT
Reticulum endoplasmique
PA
PAP
DGAT
DAG
Triglycérides
VLDL
Triglycérides
Triglycérides
AG
Muscle squelettique
Triglycérides
Tissu adipeux

Figure 1 : **Schéma général de la lipogenèse et rôles physiologiques de la FAS**. **(A)** La FAS est exprimée au niveau transcriptionnel en réponse au glucose et à l'insuline qui activent respectivement les facteurs de transcription ChREBP, SREBP et USF1. LXR-α contrôle également directement et indirectement (*via* SREBP) la transcription de la FAS, alors que FoxO1 la réprime. L'entrée du glucose dans la cellule est facilitée par un transporteur de la famille GLUT (glucose transporter). Après phosphorylation en G6P, plusieurs voies s'offrent au glucose parmi lesquelles la glycolyse et la voie des pentoses-phosphates. La glycolyse produit le pyruvate qui, au niveau de la mitochondrie, donne l'acétyl-CoA puis le citrate. Le citrate est alors exporté vers le cytosol grâce à la navette citrate-pyruvate pour produire de nouveau l'acétyl-CoA, substrat de l'ACC qui à son tour forme le malonyl-CoA. L'acétyl-CoA et le malonyl-CoA sont les deux substrats de la FAS qui pour fabriquer les acides gras nécessite également le NADPH,H^+ (*N.B.* c'est la forme activée de l'acide palmitique en palmitoyl-CoA qui permet son utilisation ultérieure, ceci vaut d'ailleurs pour tous les acides gras). Après désaturation et/ou élongation grâce à SCD et ELOVL respectivement, on obtient d'autres types d'acides gras, entre autres estérifiés par la GPAT en triglycérides en vue de leur stockage. Une partie des acides gras synthétisés sert à la fabrication des composants membranaires essentiels à la cellule notamment au cours de la division cellulaire qui *in fine* nécessite le doublement de la surface membranaire. A ce propos, en fonction de la nature des acides gras produits, en l'occurrence ici acides gras à chaînes longues et saturées (en association avec le cholestérol), certaines zones de la membrane limitent leur fluidité : il s'agit des radeaux lipidiques (lipides « rafts ») ou DRMs. L'acide palmitique et d'autres acides gras modifient certaines protéines telles que Ras, Cav-1 et Wnt indispensables à leur adressage final : il s'agit des réactions d'acylation faisant partie des lipidations (MPTs (modifications post-traductionnelles) basées sur le greffage de structures lipidiques). Les acides gras peuvent également participer à la fabrication de messagers secondaires tels que le PIP3. Ces dernières fonctions participent à la transduction du signal et à la signalisation cellulaire. **(B)** Hormis son rôle dans la synthèse des acides gras et le stockage de l'énergie, la FAS participe à de multiples autres fonctions biologiques. **(C)** synthèse des TG et empaquetage sous forme de VLDL.

2. Fatty Acid Synthase, FAS

2.1. Caractéristiques générales

La FAS (EC 2.3.1.85) est l'enzyme qui catalyse la synthèse des acides gras à partir des substrats acétyl-CoA et malonyl-CoA et le cosubstrat NADPH,H^+ selon l'équation générale :

$$\text{Acétyl-CoA} + n\ \text{Malonyl-CoA} + 2n\ \text{NADPH},H^+ \longrightarrow H_3C\text{-}(CH_2\text{-}CH_2)_n\text{-}COOH + n{+}1\ \text{HScoA} + n\ CO_2 + n{-}1\ H_2O$$

Les acides gras ainsi formés comportent le plus souvent, mais pas exclusivement, un nombre pair de carbones, l'acide palmitique (C16, soit n=7) étant le produit de longueur maximale fabriqué par la FAS. Comme décrit ci-dessus, les acides gras plus longs sont générés par l'activité d'élongases ELOVL résidentes du RE.

La FAS est une protéine cytoplasmique soluble ou associée en partie à la membrane plasmique et, plus précisément, au niveau des lipides rafts *via* son interaction avec la cavéoline (Di Vizio et al., 2008). Madigan et collaborateurs ont également localisé la FAS au noyau : le rôle de la FAS nucléaire est inconnu et d'ailleurs cette observation reste sujette à caution (Madigan et al., 2014). Bien qu'il soit généralement admis que la FAS soit plus exprimée en particulier dans le foie, le tissu adipeux et la glande mammaire en période de lactation (Jayakumar et al., 1995), c'est une enzyme ubiquitaire exprimée dans quasiment tous les tissus à des niveaux très variables (**Fig. 2**).

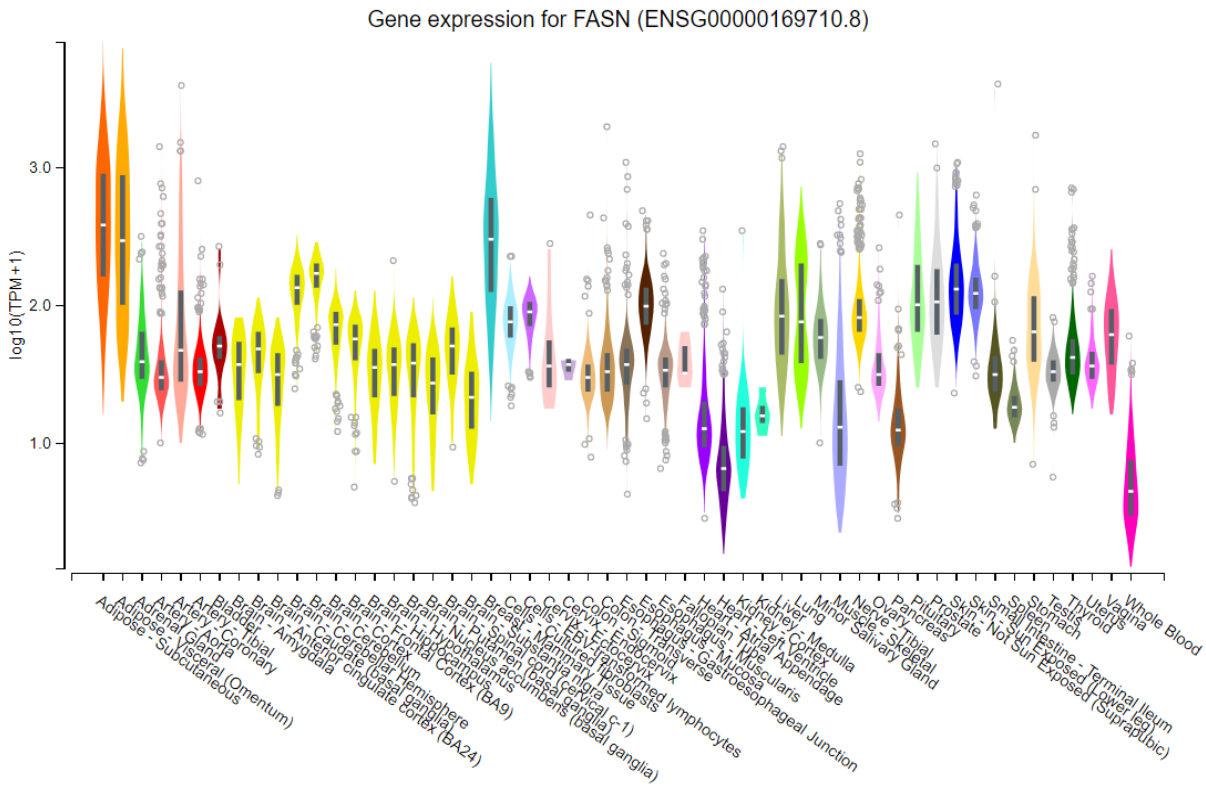


Figure 2 : **Distribution tissulaire de la FAS**. Bien qu'il soit admis que la FAS soit plus abondante dans le tissu adipeux, la glande mammaire ou le foie, l'enzyme est exprimée dans pratiquement tous les tissus de l'organisme. Figure produite sur GTEx (GTEx Portal).

Chez les mammifères, et les levures, la FAS est un très long polypeptide (2.511 acides aminés chez l'Homme) portant à lui seul l'ensemble des activités catalytiques nécessaires à la fabrication des acides gras (**Fig. 3B**) : il s'agit de la FAS de type I, un seul gène codant une protéine dotée de 7 activités catalytiques. Chez les plantes, champignons, procaryotes et mitochondries, ces activités catalytiques sont portées par des protéines individuelles agissant en complexe : on parle de FAS de type II. Chez les animaux, la FAS est uniquement active sous forme d'homodimère (Stoops et al., 1979) associé en tête-bêche (Stoops and Wakil, 1981) ou en tête-tête comme décrit plus tard (Witkowski et al., 2004) (**Fig. 3B**). Chaque sous-unité de 273 kDa porte sept activités catalytiques travaillant de manière séquentielle et coordonnée.

On retrouve trois domaines catalytiques dans la partie N-terminale - β-cétoacylsynthase (KS pour *keto-acylsynthase* en anglais), malonyl/acétyltransférase (MAT) et déshydratase (DH) - et trois autres domaines catalytiques dans la partie C-terminale - énoylréductase (ER), β-cétoacylréductase (KR pour *Keto-acylreductase* en anglais) et thioestérase (TE) - (**Fig. 3A et 3C**). En plus de ces activités catalytiques, la partie C-terminale possède également l'ACP (acyl carrier protein). La région centrale d'environ 650 résidus est appelée inter-domaine ou *core region* et ne porte pas d'activité catalytique (Asturias et al., 2005). Néanmoins, il a été montré que ce domaine est crucial pour la dimérisation de la FAS (Chirala and Wakil, 2004).

La FAS est une enzyme allostérique activée par le Fru-1,6-bisP (fructose-1,6-bisphosphate) (Plate et al., 1968). La purification de cette enzyme à partir d'hépatocytes de pigeon a montré qu'elle est inhibée par son substrat, le malonyl-CoA, quand il est présent en excès (l'inhibition est observable à partir de 10 µM). Il a également été constaté que le Fru-1,6-bisP lève cette inhibition soit en concourant pour le site de fixation du malonyl-CoA ou en occupant un autre site, favorisant une forme enzymatique insensible à l'inhibition par le malonyl-CoA (Plate et al., 1968).

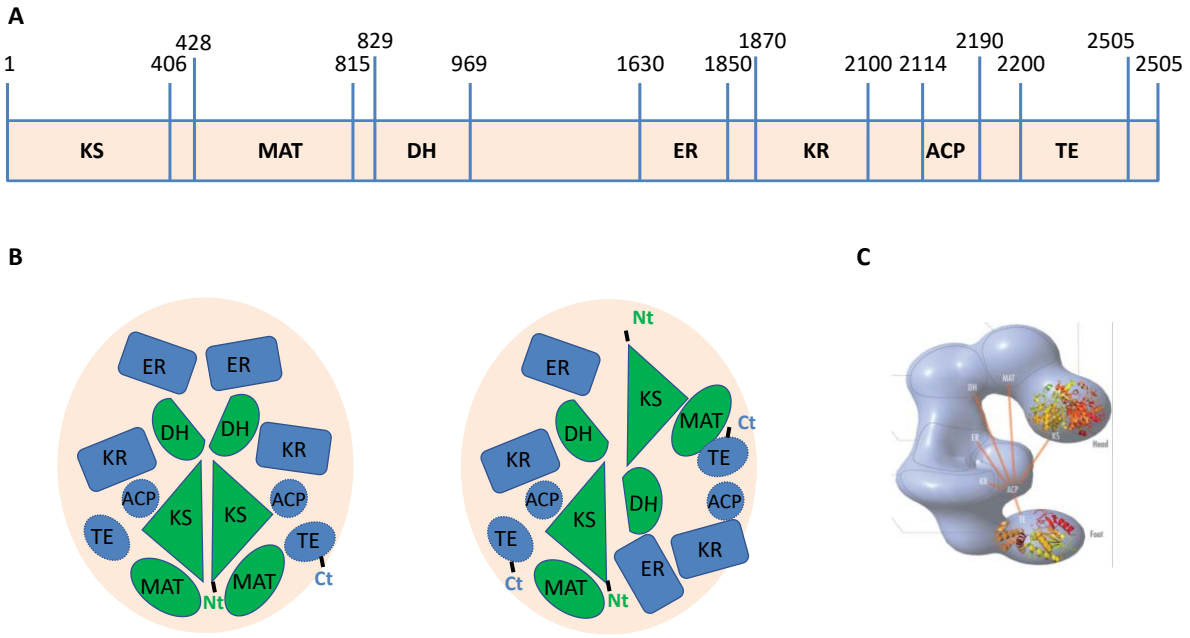


Figure 3 : Structure de la FAS. (A) Représentation schématique de la FAS. La FAS présente sept domaines fonctionnels : KS, MAT et DH dans la partie Nt et ER, KR, ACP et TE dans la partie Ct. L'ACP présente l'AG en cours d'élongation aux différentes activités catalytiques. **(B)** Modèles d'organisation en dimère de la FAS. Présentation tête-tête (à gauche) et tête-bêche (à droite) **(C).** Structure de la FAS adaptée de la modélisation de Kosi Gramatikoff.

2.2. Les différents domaines de la FAS

Le mécanisme catalytique de la FAS est complexe et fait intervenir successivement les domaines catalytiques MAT-KS-KR-DH-ER sur un nombre variable de cycles dont dépend la longueur de l'AG généré. Une dernière activité, TE, libère l'AG par hydrolyse (**Fig. 4**).

L'ACP ou protéine de transport du radical acyl est considérée comme un groupement prosthétique géant qui joue un rôle important dans la biosynthèse des AG. Il permet grâce à son bras mobile 4'-phosphopantéthéine de fixer l'AG en cours de synthèse et de le déplacer d'une activité enzymatique à l'autre à la manière d'une chaîne de montage industrielle.

L'initiation de la synthèse des AG se fait par le transfert d'un groupement acétyl sur un groupement SH périphérique de la FAS (au niveau de l'activité KS) catalysée par l'activité acétyltransférase. Cette

réaction est suivie du transfert du groupement malonyl sur le groupement SH central porté par l'ACP par l'activité malonyl transférase. L'activité KS catalyse ensuite la liaison carbone-carbone entre l'acétyl et le malonyl sur le groupement SH périphérique en libérant un acide carboxylique sous forme d'une molécule de CO_2 formant le groupement acéto-acétyl avec quatre carbones. S'ensuit alors l'activité KR qui réduit la fonction cétone du groupement acéto-acétyl pour former un résidu hydroxyacyl. Les hydrogènes sont apportés par le NADPH,H^+, coenzyme impliqué dans de nombreuses réactions anaboliques. Le résidu hydroxyacyl perd une molécule d'eau grâce à l'activité déshydratase permettant ainsi la formation d'une double liaison qui est réduite par l'activité énoylréductase en présence du NADPH,H^+.

A ce niveau, on obtient un résidu acyl saturé fixé au groupement SH central. Pour être allongé, il est transféré provisoirement sur le groupement SH périphérique grâce à l'activité acétyltransférase. L'ensemble des réactions que nous venons de décrire sont de nouveau sollicitées de sorte à allonger l'acyl de deux carbones supplémentaires à chaque tour de cycle. Au total, sept cycles peuvent se succéder pour former un AG à seize carbones, soit l'acide palmitique (C16 :0) (**Fig. 4**). Enfin, le résidu palmitoyl formé et fixé sur le groupement SH central est libéré par hydrolyse grâce à l'activité thioestérase. L'acide palmitique libre est ionisé en palmitate au pH (potentiel d'hydrogène) intracellulaire. Il est à noter que l'AG produit est sous sa forme libre, il n'est pas associé au CoA.

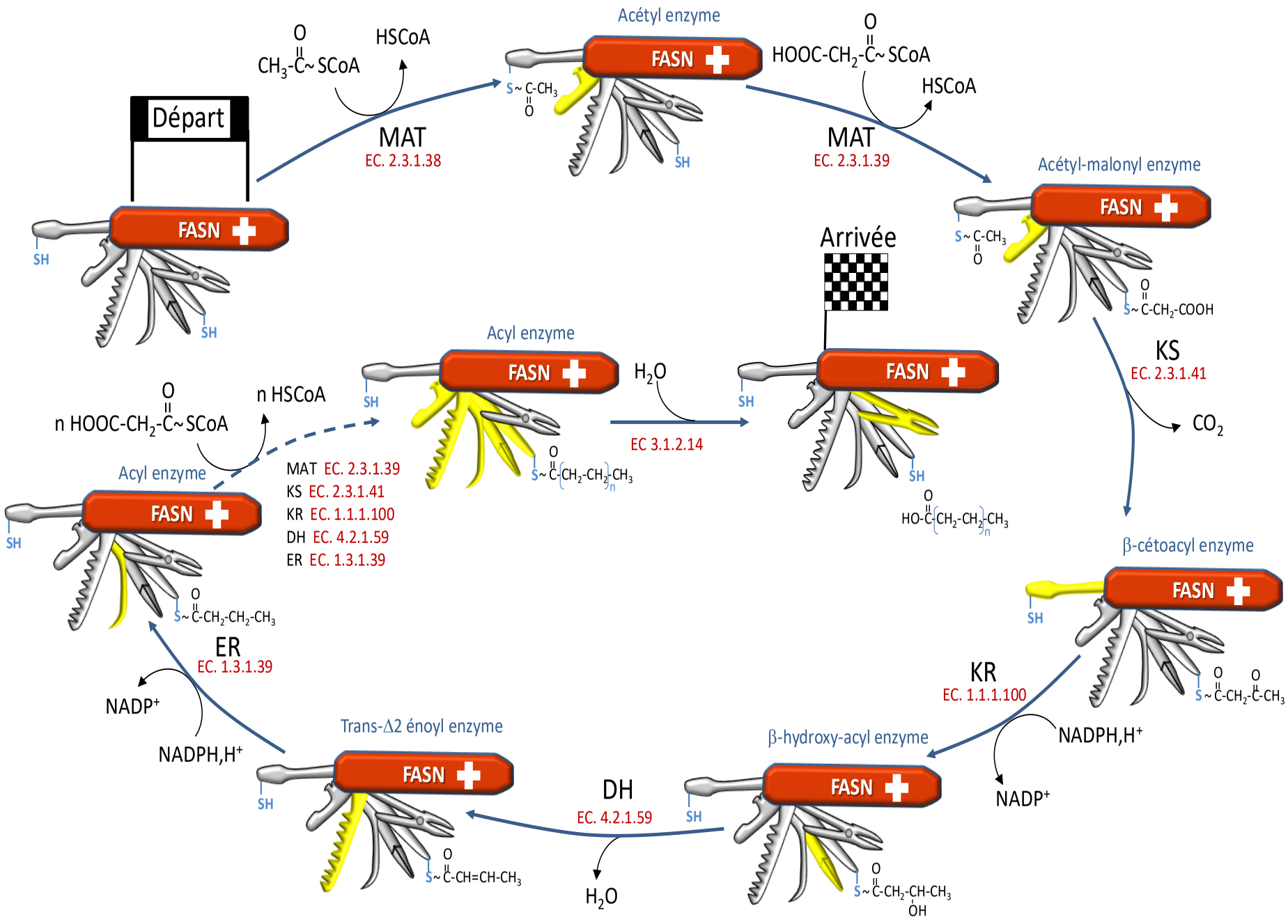

Départ
FASN
SH
CH_3-C~SCoA
HSCoA
MAT
EC. 2.3.1.38
Acétyl enzyme
S~C-CH_3
HOOC-CH_2-C~SCoA
HSCoA
MAT
EC. 2.3.1.39
Acétyl-malonyl enzyme
S~C-CH_2-COOH
KS
EC. 2.3.1.41
CO_2
Arrivée
β-cétoacyl enzyme
S~C-CH_2-C-CH_3
KR
EC. 1.1.1.100
NADPH,H+
NADP+
β-hydroxy-acyl enzyme
S~C-CH_2-CH-CH_3
OH
DH
EC. 4.2.1.59
H_2O
Trans-Δ2 énoyl enzyme
S~C-CH=CH-CH_3
ER
EC. 1.3.1.39
NADP+
NADPH,H+
Acyl enzyme
S~C-(CH_2-CH_2)n-CH_3
H_2O
EC 3.1.2.14
HO-C-(CH_2-CH_2)n-CH_3
n HOOC-CH_2-C~SCoA
n HSCoA
MAT EC. 2.3.1.39
KS EC. 2.3.1.41
KR EC. 1.1.1.100
DH EC. 4.2.1.59
ER EC. 1.3.1.39
Acyl enzyme
S~C-CH_2-CH_2-CH_3

Figure 4 : Le cycle catalytique de la FAS. L'activité MAT catalyse la fixation de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA sur les groupements SH de la FAS (SH central porté par le groupement phosphopantéthéine de l'ACP et SH périphérique porté par une cystéine du domaine β-cétoacylsynthase de la FAS). L'acyl en cours de synthèse est alors allongé par l'activité KS, réduit par l'activité KR en utilisant le NADPH,H^+, déshydraté par l'activité DH, réduit une seconde fois par l'activité ER. L'acide palmitique est enfin libéré par l'activité TE. Chacune des activités de la FAS est accompagnée de sa numérotation EC (enzyme commission).

2.3. Régulation de l'expression de la FAS

La plupart des enzymes impliquées dans la lipogenèse, notamment la FAS, sont régulées au cours du cycle jeûne/période postprandiale. Leur activité est faible durant le jeûne et augmentée en réponse à une prise alimentaire. La régulation de la FAS se fait à différents niveaux.

2.3.1. Au niveau transcriptionnel

Le contrôle de l'expression de la FAS au niveau transcriptionnel est assuré essentiellement par l'insuline et le glucose (**Fig. 1**). Ainsi, après un repas, plusieurs facteurs de transcription gouvernent l'expression de la FAS. L'augmentation de la glycémie stimule la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas qui active les facteurs de transcription USF1 (upstream-stimulatory factor-1 (Wang and Sul, 1997) et SREBP-1c (sterol responsive element binding protein-1c) (Osborne, 2000). L'effet même du glucose est quant à lui relayé par le facteur de transcription ChREBP (carbohydrate responsive element binding protein) qui induit l'expression des gènes de la lipogenèse dont la FAS (Li et al., 2010). LXR-α (liver X receptor-alpha), qui appartient à une famille de facteurs de transcription activés par les oxystérols, participe également à l'expression de la FAS en se fixant spécifiquement sur un LXRE (LXR responsive element) au niveau du promoteur du gène codant l'enzyme (Li et al., 2015). Au-delà de ce mécanisme direct, LXR promeut indirectement l'expression de la FAS en activant SREBP qui en retour active la FAS (Li et al., 2015). De même, il est à noter que FoxO1 (forkhead box protein O1) réduit la lipogenèse en réprimant SREBP qui par conséquent n'active plus la FAS (He et al., 2020).

2.3.1.1. Sterol Responsive Element Binding Protein (SREBP)

SREBP constitue une famille de facteurs de transcription identifiés comme des régulateurs importants de l'homéostasie du cholestérol et des acides gras (Eberlé et al., 2004). Chez les mammifères, il existe trois isoformes de SREBP - SREBP-1a, SREBP-1c, et SREBP-2 - codés par deux gènes : *Srebf1* code SREBP-1a et SREBP-1c par un mécanisme d'épissage alternatif et *Srebf2* code SREBP-2. SREBP-1a active la synthèse des acides gras et du cholestérol, tandis que SREBP-1c contrôle uniquement la synthèse des acides gras. En revanche, SREBP-2 est principalement responsable de la synthèse du cholestérol. Parmi les trois isoformes, SREBP-1c est la plus abondante dans les tissus avec une lipogenèse active tel que le foie et les tissus adipeux (Osborne, 2000).

2.3.1.1.1. *Processus de maturation de SREBP et sa régulation*

SREBP est régulé au niveau transcriptionnel par l'insuline *via* un mécanisme impliquant le facteur de transcription LXR (Schultz et al., 2000). Une étude a montré que la surexpression de LXRβ augmente l'activité du promoteur de SREBP dans les cellules épithéliales mammaires bovines, ce qui augmente l'expression de ses gènes cibles notamment *FASN* (Shi et al., 2017).

SREBP-1 et SREBP-2 sont synthétisés sous forme de précurseurs inactifs liés à la membrane du RE (**fig. 5**). La présence de cholestérol (ou oxystérols) promeut leur liaison à la protéine SCAP (SREBP cleavage-activating protein) au niveau de la membrane du RE ainsi qu'à la protéine Insig (insulin-induced gene) (Sun et al., 2007). Cette conformation retient le complexe SREBP-SCAP dans le RE en empêchant l'interaction de SCAP avec les protéines des vésicules COPII (coat protein II). En revanche, en absence du cholestérol, la maturation de SREBP implique la dissociation du complexe SREBP/SCAP de la protéine Insig et son association avec COPII, permettant ainsi le transport de SREBP du RE vers l'appareil de golgi où le précurseur inactif de SREBP est clivé par les protéases S1P (site-1 protease) et S2P (site-2 protease). Le fragment Nt de SREBP est transloqué vers le noyau sous forme de dimère (**Fig. 5**). Une fois dans le noyau, SREBP se fixe sur les éléments de réponse SRE (serum responsive element) des gènes cibles (Espenshade, 2006; Shi et al., 2017). La fixation de SREBP sur le gène codant FASN en réponse à l'insuline se fait sur la région -150 du promoteur. Une étude sur des souris transgéniques a montré que cette fixation est dépendante du facteur de transcription USF1 qui se fixe quant à lui sur la région -65 <E-box> du promoteur du gène codant la FAS. Ensemble, SREBP et USF1 forment deux facteurs de transcription nécessaires pour l'activation de la FAS en réponse à l'insuline (Latasa et al., 2003).

La maturation de SREBP-1c est un processus hautement régulé dans lequel l'insuline joue un rôle clé. Plus particulièrement, il a été montré que l'insuline favorise la déstabilisation des ARNm (acide ribonucléique messager) de Insig induisant une réduction de son niveau protéique et favorisant le transport du complexe SCAP-SREBP du RE vers le Golgi, compartiment dans lequel SREBP subit un clivage protéolytique nécessaire à sa maturation (Yellaturu et al., 2009). Il a été montré que la voie PI3K (phosphatidylinositol 3 kinase)/AKT (protéine kinase B - sérine/thréonine kinase)/mTOR (mammalian/mechanistic target of rapamycin) joue également un rôle primordial dans la maturation et l'activation de SREBP-1c. Une étude menée sur des rats transgéniques exprimant l'ADNc humain de SREBP-1c a montré que la protéine kinase mTORC1 (mammalian/mechanistic target of rapamycin complex 1) et sa protéine cible p70S6K (ribosomal protein S6 kinase) sont nécessaires au clivage protéolytique de SREBP-1c en réponse à l'insuline (Owen et al., 2012).

L'activation de SREBP ne se fait pas uniquement en réponse à l'insuline. Une étude sur des cellules cancéreuses mammaires humaines a montré que dans des conditions d'hypoxie la protéine kinase AKT phosphoryle SREBP et favorise son activité induisant l'expression de la FAS au niveau protéique et transcriptionnel (Furuta et al., 2008). Enfin, une étude *in vivo* sur un modèle d'hépatocarcinome a montré que mTOR induit l'expression de SREBP par phosphorylation de STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) qui en retour interagit avec SREBP et promeut sa translocation nucléaire permettant l'activation de ses gènes cibles incluant *FASN* (Li et al., 2019).

A jeun, SREBP est phosphorylé sur la Ser372 par AMPK (AMP-activated protein kinase) inhibant son clivage protéolytique et sa maturation hépatocytaire (Li et al., 2011). Plus tard, il a été montré sur des cellules cancéreuses mammaires que l'OGT, enzyme que je détaillerai dans la deuxième partie, en inactivant AMPK par *O*-GlcNAcylation active SREBP et par conséquent l'expression de ses gènes cibles dont celui codant FASN (Sodi et al., 2018).

Enfin, comme pour nombre de facteurs de transcription, SREBP a une durée de vie limitée. Le processus de dégradation de SREBP passe par le protéasome. En effet, la stabilité de la forme nucléaire mature de SREBP est contrôlée par FBXW7 (F-box and WD repeat domain-containing 7), sous-unité de reconnaissance du substrat de SCF^{FBXW7} E3-ubiquitine ligase, fréquemment mutée ou délétée dans le cancer. SCF^{FBXW7} E3-ubiquitine ligase permet la polyubiquitination de SREBP et sa dégradation protéasomale (Welcker and Clurman, 2008). La liaison de FBXW7 à SREBP nécessite la phosphorylation préalable de SREBP par GSK3β (glycogène synthase 3β) sur les Thr426, Ser430 et Ser434. Puisque GSK3β est inactivée par phosphorylation par AKT, l'activation de cette dernière induit non seulement la maturation de SREBP mais augmente également la stabilité de sa forme mature nucléaire, favorisant l'expression de ses gènes cibles (Bengoechea-Alonso and Ericsson, 2009).

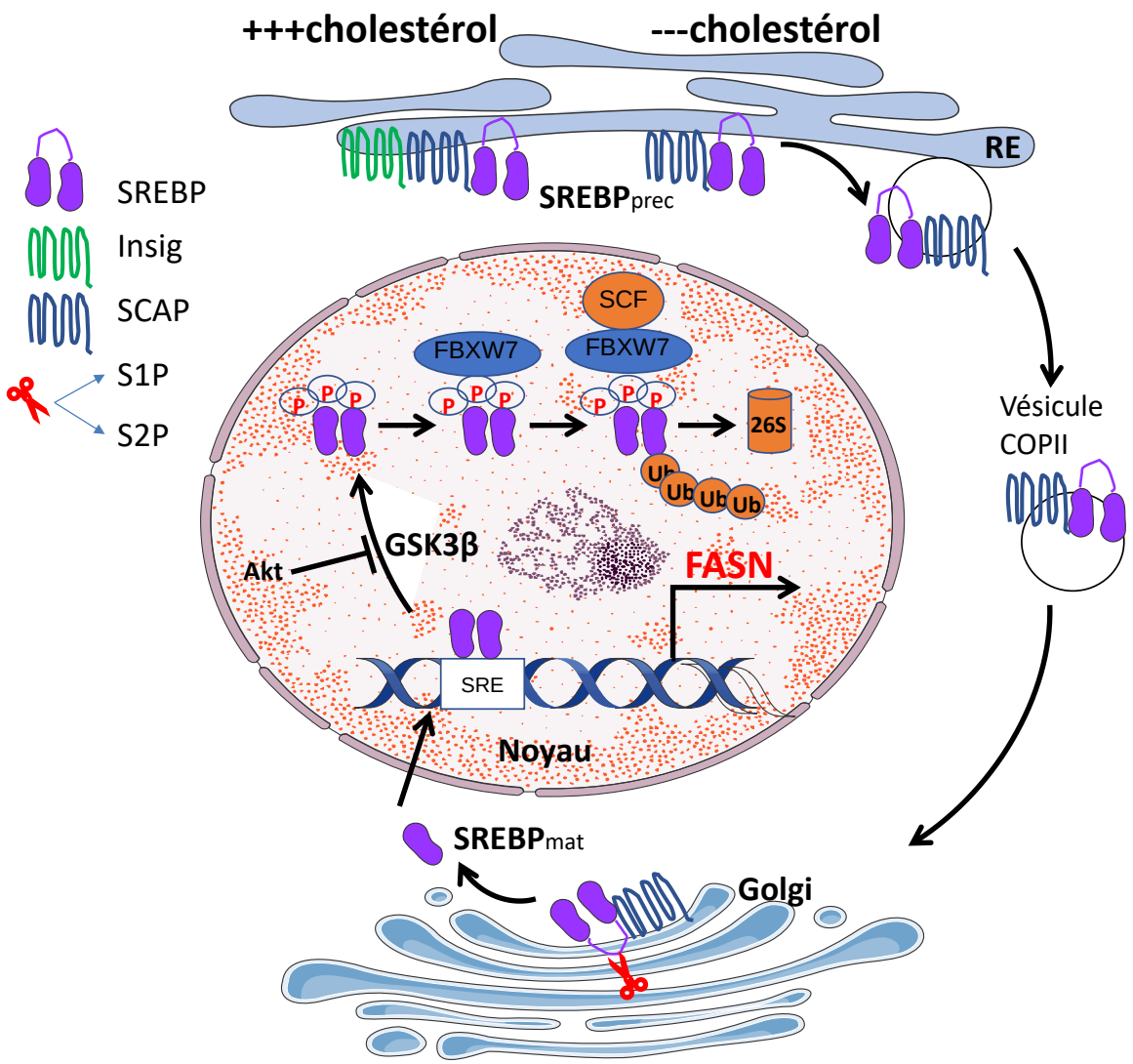


Figure 5 : Processus de maturation des facteurs de transcription SREBPs. SREBPs sont traduits en tant que précurseurs (SREBPprec) dans la membrane du RE), où ils se lient à la protéine d'activation du clivage SCAP. À des niveaux faibles en cholestérol intracellulaires, le complexe SREBP SCAP se déplace vers le Golgi grâce aux vésicules COPII. Dans le Golgi, les protéases liées à la membrane S1P et S2P clivent l'extrémité Nt de SREBP précurseur (SREBPprec) en SREBP mature (SREBPmat) qui pénètre dans le noyau sous forme de dimère et se lie aux éléments de réponse SRE des promoteurs des gènes cibles. Lorsque le cholestérol est abondant, SCAP se lie à Insig ce qui retient SREBP dans le RE. La stabilité de SREBP nucléaire est contrôlée par la protéine FBXW7, qui se lie à SREBP en réponse à sa phosphorylation par GSK3β (glycogène synthase 3β), une cible négative de AKT.

2.3.1.2. Carbohydrate Responsive Element Binding Protein (ChREBP)

ChREBP, aussi connu sous les noms MLXIPL ou MONDOB, est un membre de la famille de facteurs de transcription bHLH/ZIP (basic helix-loop-helix/leucine zipper) responsable de la transcription des enzymes glycolytiques et lipogéniques en réponse à l'induction par les glucides. Il existe deux isoformes de ChREBP, ChREBP-α et ChREBP-β codés par le même gène *MLXIPL* mais sous le contrôle de deux promoteurs alternatifs (Iizuka et al., 2004). ChREBP contient plusieurs domaines incluant la séquence NLS (nuclear localization signal), une séquence riche en prolines (proline-rich stretch PRO),

un domaine bHLH/ZIP et un domaine ZIP-like. Il contient également trois sites consensus de phosphorylation par PKA (protéine kinase A).

2.3.1.2.1. *Régulation de ChREBP*

ChREBP est exprimé dans le foie. Comme décrit plus haut, son activation est dépendante des concentrations en glucose. Dans des conditions de concentrations faibles en glucose, ChREBP est phosphorylé par PKA sur la Ser196 et la Thr666 de manière AMPc (adénosine monophosphate cyclique) dépendante ce qui bloque sa translocation nucléaire, son activité de liaison à l'ADN (acide désoxyribonucléique) et par conséquent l'activation de ses gènes cibles (Kabashima et al., 2003). Plus précisément, une étude portée sur des hépatocytes primaires de rat a montré que l'AMP (adénosine monophosphate) inhibe la translocation nucléaire de ChREBP *via* l'activation allostérique de son interaction avec la protéine 14-3-3 permettant ainsi sa séquestration dans le cytosol (Sato et al., 2016). En revanche, il a été montré qu'en réponse à un afflux de glucose, le Xu-5-P (xylulose-5-phosphate, intermédiaire de la voie des pentoses phosphates) active indirectement ChREBP. Le Xu-5-P active la phosphatase PP2A (protéine phosphatase 2A) qui en retour déphosphoryle ChREBP sur les sites S196 et Thr666 permettant sa translocation nucléaire par des interactions avec les importines α et β et sa fixation sur ses éléments de réponse ChoRE (carbohydrate responsive element) (Kabashima et al., 2003) (**Fig. 6**).

Des études postérieures ont montré que c'est le Glc-6-P (glucose-6-phosphate) qui régule l'activation de ChREBP et non pas le Xu-5-P (Li et al., 2010; Dentin et al., 2012).

ChREBP interagit physiquement avec l'OGT et est *O*-GlcNAcylé dans les cellules hépatiques, induisant sa translocation nucléaire et sa fixation sur les éléments de réponse de ses gènes cibles (Guinez et al., 2011a). De plus, l'acétylation de ChREBP sur la Lys672 favorise son activité (Bricambert et al., 2010).

Lors de son activation, ChREBP-α forme un hétérodimère avec la protéine MLX (max-like protein X) pour se lier aux éléments de réponse ChoRE sur les promoteurs des gènes cibles notamment ceuxi codant la FAS et ChREBP-β (Song et al., 2018).

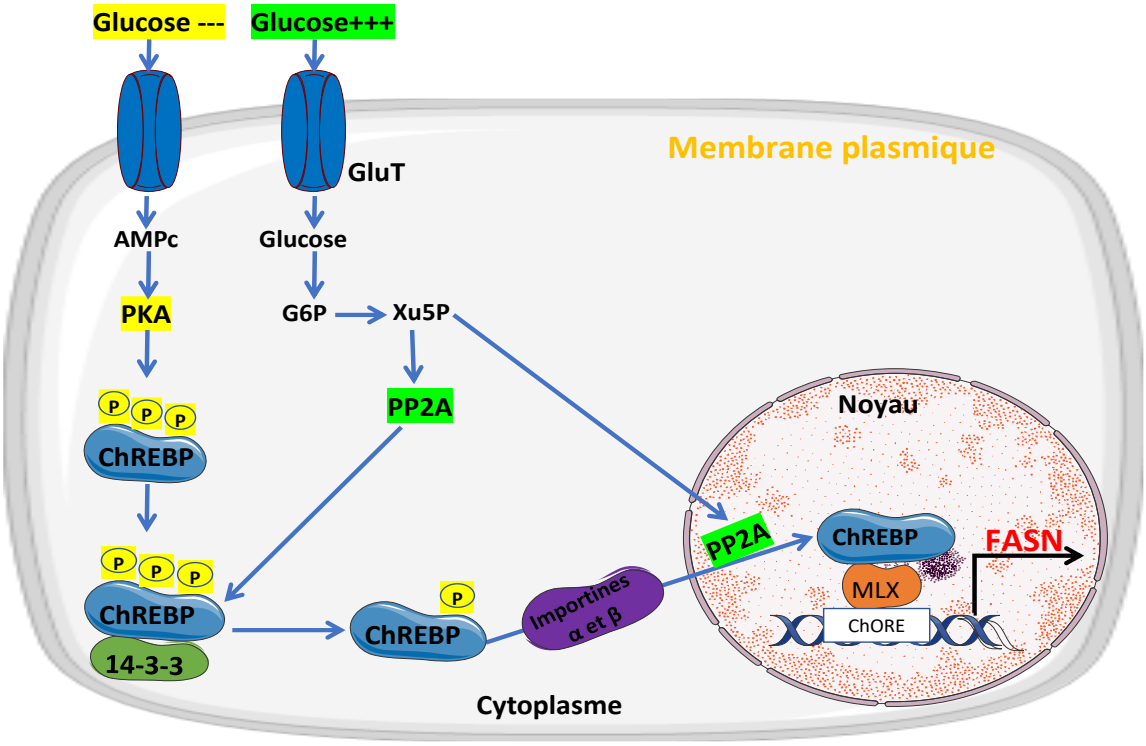


Figure 6 : Activation du facteur de transcription ChREBP. Une faible concentration en glucose entraine l'inactivation de ChREBP *via* sa phosphorylation par PKA, et sa séquestration cytosolique après formation d'un complexe avec la protéine 14-3-3. En réponse à une élévation en glucose, ChREBP inactivé est partiellement déphosphorylé par la phosphatase PP2A et activé par le Xu-5-P (xylulose 5-P), puis transloqué dans le noyau grâce aux importines α et β. Une fois dans le noyau, ChREBP est complètement déphosphorylé par PP2A, se lie à ses éléments de réponse sous forme d'hétérodimère avec MLX et induit l'expression de ses gènes cibles.

2.3.1.3. Liver X Receptor (LXR)

Les facteurs de transcription LXR appartiennent à une famille de récepteurs nucléaires régulant la synthèse des lipides et l'homéostasie du cholestérol. Les LXR sont activés par les oxystérols (dérivés de cholestérol) ou par des agonistes synthétiques. Ainsi, l'activation de LXR par l'agoniste synthétique T09001317 (T09) dans les adipocytes humains augmente les ARNm codant la FAS et SCD1 (Darimont et al., 2006). Aussi, l'activation des LXR chez des souris par administration orale de T09 induit l'expression de SREBP ainsi que celle d'enzymes ipogéniques incluant la FAS (Schultz et al., 2000). La délétion des LXR chez des souris *ob*/*ob* altère la lipogenèse hépatique, et ce, par la diminution de l'expression de SREBP et des enzymes lipogéniques (Beaven et al., 2013).

A ce jour, deux isoformes de LXR ont été identifiées : LXRα exprimée dans le foie, le tissu adipeux, les intestins et les macrophages, et LXRβ est quant-à lui ubiquitaire. Les LXR sont codés par deux gènes différents mais avec une forte homologie de séquences de 80% (Song et al., 2018). Bien que des études soutiennent un rôle différent pour chaque isoforme, cette différence de rôle reste inconnue (Ishibashi et al., 2013).

En réponse à l'activation par les oxystérols ou les agonistes synthétiques, LXR forme un hétérodimère avec RXR (retinoid x receptor) pour se lier ensemble aux LXRE induisant la transcription des enzymes lipogéniques (Laurencikiene and Rydén, 2012). Comme mentionné plus haut, LXR régule l'expression de SREBP, des études ayant identifié des LXRE dans le promoteur de SREBP-1c chez la chèvre (Xu et al., 2016), et la souris (Repa et al., 2000).

2.3.1.4. Remodelage de la chromatine

La structure de la chromatine est décisive dans l'expression génique sélective. En tant que protéine structurale, les histones se lient à l'ADN pour former les nucléosomes, unité structurale de base de la chromatine. Des MPTs (modifications post-traductionnelles) comprenant l'acétylation, la méthylation et la phosphorylation sur l'extrémité N-terminale des histones activant ou réprimant la transcription des gènes. Une dérégulation dans la modification des histones est capable d'initier le cancer et de contribuer à sa progression (Yi et al., 2015).

Il a été montré dans les cellules HepG2 et L02 qu'en réponse à une élévation en glucose, ChREBP se lie à son élément de réponse ChoRE pour induire l'expression de la FAS en favorisant la modification des histones de la région promotrice (Cai et al., 2018). Ces modifications incluent une augmentation de l'acétylation de H3 et H4, de la triméthylation de H3K4 et de la phosphorylation de H3S10, et, en contrepartie, une hypo-triméthylation de H3K9 et H4K20. Ces modifications de MPTs corrélent avec une augmentation des TG et des goutelettes lipidiques abondantes du tissu adipeux. Les auteurs suggèrent que ces modifications favoriseraient la stéatose hépatique non alcoolique. Dans la même étude, il a été montré que l'inhibition de l'acétylation des histones n'affecte pas l'expression de ChREBP mais plutôt sa liaison au ChoRE et par conséquent diminue la lipogenèse et l'accumulation des lipides (Cai et al., 2018).

2.3.1.5. Régulation par les microARNs

Les miARNs (microARNs) sont des petits ARNs non codants impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes en se fixant sur l'extrémité 3'UTRs (3'-untranslated transcribed region) de leur ARNm cible. Ils sont transcrits par les ARN polymérases II ou III pour générer des pri-miARNs (miARNs primaires) de plusieurs centaines de paires de bases de longueur. Avant d'être exportés hors du noyau par l'exportine-5, les pri-miARNs coiffés et polyadénylés, doivent être clivés par l'enzyme Drosha pour former des pré-miARNs (miARNs précurseurs) de 60-70 nucléotides. Dans le cytoplasme, les pré-miARNs sont clivés par une deuxième enzyme (ARNase III) nommée Dicer pour former un duplex miARN/miARN. Un des deux brins sert de guide pour cibler l'ARNm afin de moduler l'expression du gène cible et l'autre brin est dégradé (Z. Yang et al., 2015).

De nombreuses cibles des miARNs sont des régulateurs du métabolisme lipidique suggérant l'implication des miARNs dans le processus lipogénique. En effet, les membres de la famille des miR-33, miR-33a et miR-33b, ciblent les régions introniques de SREBP-2 et SREBP-1 respectivement et répriment leur expression et donc, indirectement, celle de la FAS (Najafi-Shoushtari et al., 2010). miR-27a est un autre miARN bloquant directement l'expression de la FAS (Shirasaki et al., 2013).

Une étude portant sur un modèle de sepsis chez la souris a montré que la surexpression des miR-335-5p réprime la FAS et améliore l'autophagie par activation de la voie de signalisation AMPK/ULK1 (unc-51-like autophagy-activating kinase 1) ce qui réduit la réponse inflammatoire dans ce modèle (Gao et al., 2018). Enfin, des observations sur des souris développant des lésions rénales diabétiques ont montré que la surexpression des miR-544 atténue ces lésions en diminuant l'inflammation et ce par l'inactivation de l'expression de la FAS (Sun et al., 2020). Ces résultats suggèrent que les miRs ciblant la FAS auraient un potentiel thérapeutique.

2.3.2. Au niveau post-traductionnel

Comme nombre d'enzymes métaboliques, la régulation de la FAS par transcription ne permet pas de répondre rapidement aux besoins immédiats contrairement aux MPTs. Plusieurs d'entre elles ont été identifiées sur la FAS telles que la phosphorylation, la *S*-nitrosylation, l'ubiquitination, l'acétylation, la SUMO (small ubiquitin-related modifier)-ylation et la *O*-GlcNAcylation. Certaines MPTs favorisent l'activité de la FAS , c'est le cas de la *O*-GlcNAcylation et de la SUMOylation qui réduisent sa susceptibilité à la dégradation protéasomale (Baldini et al., 2016; Floris et al., 2020), et de la *S*-nitrosylation qui favorise sa dimérisation (Choi et al., 2016). En revanche, l'acétylation de la FAS renforce sa polyubiquitination ce qui promeut sa dégradation protéasomale (Lin et al., 2016).

2.3.2.1. Phosphorylation de la FAS

La phosphorylation de la FAS dans le foie est corrélée à une diminution de son activité. Dans le foie de pigeon à jeun, la FAS est phosphorylée et son activité diminuée (Qureshi et al., 1975). Au contraire, sa déphosphorylation suite à la prise alimentaire augmente de 20 fois son activité. Dans la lignée adipocytaire 3T3L1, en réponse à la nicotine, la phosphorylation de la FAS par AMPK bloque son activité s'accompagnant d'une diminution de la lipogenèse et d'une augmentation de la lipolyse (An et al., 2020). En revanche, la phosphorylation de la FAS ne répond pas uniquement au jeûne puisqu'une étude sur des hépatocytes de souris et des cellules d'hépatocarcinome humain a montré qu'en réponse à la prise alimentaire la FAS cytoplasmique est phosphorylée par mTOR sur les Thr1029 et Thr1033 ce qui l'inactive (Jensen-Urstad et al., 2013). De plus, la phosphorylation de la FAS ne reflète pas toujours son inhibition puisqu'une étude réalisée sur une lignée cancéreuse du sein a montré que

la FAS est tyrosine phosphorylée par HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) et que cette phosphorylation augmente son activité, favorisant la progression tumorale (Jin et al., 2010).

2.3.2.2. *S*-nitrosylation de la FAS

La *S*-nitrosylation est une MPT réversible des protéines qui consiste en l'ajout d'un NO (oxyde nitrique) sur le groupement thiol d'une cystéine (Cys) des protéines cibles. La nitrosylation de la FAS sur les Cys1471 et Cys2091 augmente son activité en favorisant sa dimérisation (Choi et al., 2016).

2.3.2.3. Ubiquitinylation de la FAS

L'ubiquitinylation (ou ubiquitination) est une modification post-traductionnelle des protéines par fixation covalente d'une ou de plusieurs molécules d'ubiquitine sur une ou plusieurs lysines de la protéine cible. Il a été montré que la FAS est polyubiquitinylée *via* son interaction avec la E3 ubiquitine ligase TRIM21 ce qui promeut sa dégradation protéasomale (Lin et al., 2016).

2.3.2.4. Acétylation de la FAS

A l'instar de la phosphorylation et de la *S*-nitrosylation, l'acétylation est une modification réversible des protéines pour laquelle le groupement acétyle est transféré sur une lysine. Bien que l'acétylation soit principalement connue pour être impliquée dans la modification des histones, elle régule également l'activité catalytique de certaines enzymes. A cet effet, une analyse par spectrométrie de masse a permis d'identifier des résidus de lysine acétylés sur la FAS (Lundby et al., 2012). Une autre étude a montré que l'acétylation de la FAS par la KAT (lysine acetyl-transférase) 8 promeut sa dégradation protéasomale, en favorisant sa polyubiquitinylation, bloquant par conséquent la lipogenèse et la progression tumorale (Lin et al., 2016).

2.3.2.5. SUMOylation de la FAS

Contrairement à l'acétylation et à l'ubiquitinylation qui favorisent la dégradation protéasomale, il a été montré que la SUMOylation protège la FAS de cette dégradation dans les cellules cancéreuses mammaires MCF7 (Floris et al., 2020). Les auteurs ont utilisé trois logiciels de prédiction différents et ont relevé sept sites potentiels de SUMOylation de la FAS. Ces mêmes auteurs ont identifié, *in vitro*, que c'est SUMO2 qui modifie la FAS.

2.3.2.6. *O*-GlcNAcylation de la FAS

La *O*-GlcNAcylation, que je détaillerai dans la 2ème partie, est une modification réversible des protéines nucléocytoplasmiques et mitochondriales. Elle consiste en l'ajout du résidu GlcNAc à partir de l'UDP-GlcNAc sur le groupement hydroxyle d'une sérine ou une thréonine des protéines cibles. Récemment, les travaux de mon équipe sur la lipogenèse hépatique ont montré que la FAS est *O*-GlcNAcylée de

manière nutrition-dépendante (Baldini et al., 2016). La *O*-GlcNAcylation de la FAS augmente son expression en réduisant sa dégradation protéasomale. En effet, des niveaux de *O*-GlcNAcylation élevés favorisent l'interaction entre la FAS et USP2a (ubiquitin-specific protease-2a), également appelée isopeptidase (Baldini et al., 2016). USP2a est surexprimée dans le cancer de la prostate, interagit avec et stabilise la FAS de la dégradation protéasomale augmentant son activité et favorisant la progression tumorale (Graner et al., 2004). De manière intéressante, il a récemment été montré que la FAS est modifiée par *O*-GlcNAcylation de manière co-traductionnelle (Zhu et al., 2020). Trois sites de *O*-GlcNAcylation de la FAS ont été rapportés dans la littérature, il s'agit des résidus Thr315, Thr980 et Ser1534 (Wulff-Fuentes et al., 2021).

2.4. Les multiples rôles de la FAS

2.4.1. Rôles physiologiques

Le rôle de la FAS dans le stockage de l'énergie *via* la lipogenèse (**Fig. 1**) est probablement le mieux connu. Les acides gras produits sont condensés avec le glycérol pour former les TG secrétés sous forme de VLDL par le foie vers les tissus périphériques comme le muscle squelettique pour leur oxydation, et les tissus adipeux où ils constituent une forme majeure de réserve énergétique.

Comme mentionné plus haut, la lipogenèse a également lieu dans les glandes mammaires en période de la lactation. A cet effet, il a été montré que la délétion de la FAS freine la maturation des glandes mammaires en lactation et diminue considérablement la teneur en acides gras du lait (Suburu et al., 2014). De manière plus générale, la FAS est essentielle à la survie de l'organisme et est indispensable au développement embryonnaire puisqu' *in vivo*, le KO (knockout) du gène *FASN* induit la mort des cellules embryonnaires avant même l'implantation dans l'utérus (Chirala et al., 2003). Dans le cerveau, la FAS joue un rôle dans l'homéostasie énergétique et est essentielle au maintien du bon développement et au contrôle du métabolisme lipidique dans les cellules souches neuronales. L'expression d'une FAS non fonctionnelle dans les cellules souches neuronales entraine des déficits d'apprentissage et de mémoire chez l'Homme et chez la souris (Chakravarthy et al., 2007; Bowers et al., 2020). La FAS joue également un rôle dans la prévention du stress du myocarde (Razani et al., 2011). En effet, l'induction de la FAS dans le cœur stressé protège les cardiomyocytes du flux de calcium pathologique (Razani et al., 2011). Dans le poumon fœtal humain, la FAS est nécessaire à la production de surfactants impliqués dans le bon fonctionnement des alvéoles pulmonaires (Wagle et al., 1999). La FAS participe également à la biosynthèse de composants membranaires nécessaires à la division cellulaire et à la dynamique des microdomaines lipidiques (lipides rafts). Ces lipides rafts assurent la localisation correcte des récepteurs, potentialisent l'activation des voies de signalisation et, par conséquent, la prolifération cellulaire (Swinnen et al., 2003). *Via* la synthèse du palmitoyl-CoA,

la FAS est incontournable dans les réactions de modification covalente par acylation de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. C'est le cas de la petite protéine G N-Ras (neuroblastoma Ras viral oncogene homolog) (Castilla, 2020) et du facteur Wnt1 qui, une fois palmitoylé par la Porcupine (une *O*-acyltransférase réticulaire), est sécrété avant de se fixer sur les cellules cibles grâce au récepteur *Frizzled* pour activer la voie Wnt/β-caténine (Fiorentino et al., 2008). La palmitoylation joue aussi un rôle dans le maintien de la muqueuse intestinale en modifiant MUC2 (mucine 2), mucine dominante dans le côlon (Wei et al., 2012). Enfin, les acides gras contribuent à la production de seconds messagers tels que le PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate) et le LPA activateur de la voie PI3K/AKT/mTOR (Faes and Dormond, 2015) et des GPCR (G-protein coupled receptor) (Y. Liu et al., 2016) respectivement. Enfin, la FAS est un acteur clé du cycle cellulaire puisque l'inhibition de l'enzyme provoque son arrêt : de fait la prolifération cellulaire est intimement reliée à son activité catalytique (Veigel et al., 2015). En retour, le facteur de transcription E2F1 (E2F transcription factor 1), dont le rôle dans le bon déroulement du cycle cellulaire est de premier plan (**Fig. 37**), contrôle le métabolisme glucido-lipidique en activant l'expression de certains de ses gènes cibles incluant FASN, ChREBP, ACC et SCD1 (Denechaud et al., 2016). L'ensemble des fonctions associées à la FAS sont résumées dans la **figure 1**.

2.4.2. De la physiologie à la pathologie

Le gène codant la FAS est localisé sur le chromosome 17q25.3, une région liée à l'adiposité. Une dérégulation de son expression est associée à l'obésité et ses complications métaboliques telles que la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Une étude chez des rongeurs a rapporté que l'inhibition de la FAS induit une perte de poids profonde et une réduction de l'apport alimentaire, suggérant qu'elle soit impliquée dans le processus d'obésité par la régulation du comportement alimentaire et de l'homéostasie énergétique (Kumar et al., 2002). Chez la dinde, il a été montré que des polymorphismes du gène *FASN* sont associés à une augmentation de la masse graisseuse (Sourdioux et al., 1999). En outre, des études génétiques ont révélé une mutation faux-sens du gène *hFASN* (substitution Val>Ile sur le codon 1483) entrainant une diminution du pourcentage de graisse corporelle chez les Indiens Pima non diabétiques (Kovacs et al., 2004) et chez des enfants caucasiens (Körner et al., 2007). Enfin, un travail portant sur un panel de 196 participants a montré une augmentation significative des niveaux d'ARNm de la FAS dans le tissu viscéral en comparaison au tissu adipeux sous-cutané et ce de manière dépendante de l'obésité et du diabète de type 2 des patients (Berndt et al., 2007). Ainsi, l'inhibition de la FAS spécifiquement dans le tissu adipeux pourrait représenter une approche thérapeutique dans la prévention et le traitement de l'obésité et de ses complications.

2.4.3. FAS et cancer

L'association de la FAS à la tumorigenèse a été identifiée dans des cellules de carcinome de sein humain en 1994 et décrite comme l'antigène OA-519 (Kuhajda et al., 1994). La surexpression de la FAS est fortement associée à différents types de cancer dont le cancer du sein (Vazquez-Martin et al., 2008), du côlon (Rashid et al., 1997), de la prostate (Migita et al., 2009), de l'estomac (Kusakabe et al., 2002), de l'œsophage (Orita et al., 2010), du poumon (Visca et al., 2004), du pancréas (Walter et al., 2009), de l'ovaire (Cai et al., 2015) et du foie (Hao et al., 2014), et dans le mélanome (Innocenzi et al., 2003). De manière plus générale, cette augmentation de la lipogenèse confère à la cellule cancéreuse des avantages en termes de prolifération, survie, métastase et de résistance à la chimiothérapie. Dans la plupart des tissus sains, la synthèse des acides gras est ralentie, ces tissus se contentant des acides gras provenant de l'alimentation pour satisfaire leurs besoins physiologiques. Par contre, une synthèse lipidique accrue est indispensable pour le processus de carcinogenèse : des cellules de cancer du sein synthétisent par exemple 95% de leurs acides gras de manière endogène bien qu'ayant accès comme tout autre type cellulaire à une source de lipides alimentaires. Mais, la FAS n'est pas un oncogène à part entière, sa seule surexpression ne transformant pas la cellule. Malgré tout, une délétion génétique de celle-ci supprime l'effet carcinogène des proto-oncogènes AKT et c-Met (tyrosine-protein kinase Met), sans avoir par contre d'effet chez des souris exprimant conjointement la β-caténine et c-Met (Che et al., 2017). Néanmoins, dans un modèle de souris transgénique sur-exprimant la FAS au niveau de la prostate, l'enzyme lipogénique montre des propriétés oncogéniques en favorisant une néoplasie intra-épithéliale prostatique mais sans tumeurs invasives (Migita et al., 2009). Dans la même étude, les auteurs ont montré que l'injection de cellules épithéliales prostatiques immortalisées iPrEC coexprimant la FAS et le récepteur AR (androgen receptor) induit un adénocarcinome invasif. Dans ce modèle de cancer, la FAS jouerait son rôle oncogénique en prévenant la voie intrinsèque de l'apoptose, une approche de *gene silencing* sur diverses lignées cellulaires de cancer de la prostate indiquant que la déplétion en la FAS induisait l'apoptose (Migita et al., 2009). Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle plutôt que de revêtir à elle seule les propriétés d'un oncogène, la FAS jouerait un rôle déterminant dans la carcinogénèse par blocage des processus apoptotiques au-delà d'une production accrue d'acides gras nécessaires à la prolifération cellulaire. De plus, il a été montré que des mutations dans le domaine acyl transférase de la FAS par la stratégie CRISPR/Cas-9 induit une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires et réduit leur phénotype invasif (Gonzalez-Salinas et al., 2020).

Le shift métabolique observé dans les cellules cancéreuses (effet Warburg) convient particulièrement à l'activité de la FAS . En effet, il est désormais admis que les cellules cancéreuses ont une addiction pour le glucose plus forte que leurs analogues « normaux ». L'utilisation accrue de sucre et sa

métabolisation en mode glycolytique produit en quantité de l'acétyl-CoA *via* le pyruvate issu de la glycolyse et du NADPH,H^+ (voie des pentoses-phosphates et navette citrate-pyruvate) (**Fig. 1**) cofacteur indispensable aux réactions de réductions réalisées par les activités KR et ER de la FAS (**Fig. 1**). Les cellules tumorales tirent-elles avantage de ce shift métabolique pour accélérer la synthèse d'acides gras nécessaires à la production des constituants membranaires, précieux à toute cellule en division, et aux lipidations indispensables à la signalisation cellulaire (**Fig. 1**).

2.4.3.1. Dérégulation de la FAS dans le cancer

Si la régulation de l'activité physiologique de la FAS se fait à plusieurs niveaux, comme décrit plus haut, sa régulation dans le cancer est encore plus complexe et est influencée par plusieurs facteurs micro environnementaux de la tumeur. Dans ce paragraphe, je vais essayer de résumer les différents mécanismes connus pour être impliqués dans la surexpression de la FAS dans le cancer.

2.4.3.1.1. Par les voies de signalisation

L'expression de la FAS est régulée par les facteurs de croissance-récepteurs tels que ERBB-2, appelé aussi HER2 (human epidermal growth factor receptor-2), et ERBB-1, également connu sous le nom d'EGFR (epidermal growth factor receptor) ou HER1 (human epidermal growth factor receptor-1). Deux voies de signalisation majeures sont activées par ces récepteurs : la voie PI3K/AKT et la voie MAPK (mitogen-activated protein kinase). Ces deux voies de signalisation permettent l'activation transcriptionnelle de la FAS. En effet, l'inhibition de PTEN (phosphatase and tensin homolog) *in vitro* favorise l'expression de la FAS du fait de l'activation incontrôlée d'AKT ainsi que la croissance des cellules cancéreuses de la prostate (Bandyopadhyay et al., 2005). Dans la même étude, les auteurs ont montré que le blocage de l'expression de la FAS par la stratégie de siRNA et la voie PI3K avec l'inhibiteur LY294002 induit l'apoptose des cellules tumorales de la prostate. De même, le traitement de cellules tumorales osseuses avec un inhibiteur de MAPK diminue le niveau d'expression de la FAS et réduit la prolifération cellulaire (Jiang et al., 2017).

Les voies de signalisation AKT et MAPK régulent l'expression de la FAS en modulant l'expression de SREBP-1c. Le proto-oncogène FBI-1 (Pokemon/ZBTB7A, un facteur de transcription de la famille BTB/POZ (bric-à-brac tramtrack broad complex/pox viruses and zinc fingers) interagit directement avec SREBP-1c *via* son domaine de liaison à l'ADN pour activer la transcription de la FAS en se liant sur la boite GC proximale et la région SRE/E du promoteur de la FAS (Choi et al., 2008) (**Fig. 7**).

2.4.3.1.2. Par modifications post-traductionnelles

Les MPTs concourent également à la dérégulation de la FAS dans le cancer. Comme décrit précédemment, la déubiquitinase pré-protéasomale USP2a est surexprimée dans le cancer de la

prostate et jouerait un rôle essentiel dans la survie des cellules cancéreuses prostatiques en stabilisant la FAS (Graner et al., 2004) (**Fig. 7**). USP2a interagit avec la FAS lui évitant la dégradation protéasomale en la libérant des résidus d'ubiquitine. L'inactivation d'USP2a diminue les niveaux de la FAS et accroit l'apoptose. Autre exemple, la phosphorylation de la FAS par ERBB2 dans les cellules de cancer du sein augmente son activité ce qui favorise la progression tumorale (Jin et al., 2010).

La régulation de la FAS au niveau post-traductionnel peut être indirecte. La phosphorylation de SREBP par AKT induit l'expression de la FAS et promeut la prolifération de cellules cancéreuses mammaires en conditions d'hypoxie (Furuta et al., 2008). De plus, mTOR induit l'expression de la FAS en phosphorylant STAT5 qui, en retour, interagit avec SREBP pour l'activer (Li et al., 2019).

2.4.3.1.3. Par le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement de la tumeur joue un rôle important dans l'expression de la FAS dans le contexte du cancer (**Fig. 7**). Les tumeurs solides sont caractérisées par un microenvironnement physiopathologique unique tel que l'hypoxie, un pH acide et une privation en nutriments. Ce microenvironnement hostile active plusieurs voies de signalisation intracellulaires qui favorisent la progression tumorale. L'hypoxie induit l'expression de la FAS dans les cellules cancéreuses mammaires humaines, par l'induction du facteur de transcription SREBP *via* sa phosphorylation par AKT suivie de l'activation de HIF1α (hypoxia-inducible-factor-1 α). La surexpression de la FAS dans des conditions hypoxiques favorise la croissance des cellules cancéreuses et la progression tumorale (Furuta et al., 2008). De plus, une étude de transfection transitoire d'un fragment du promoteur de la FAS de 178 pb incluant le site de fixation de SREBP a montré que l'acidose extracellulaire induit l'expression de la FAS dans les cellules cancéreuses du sein (Menendez et al., 2005). Enfin, Oliveras-Ferrarose et collaborateurs ont constaté que le niveau extracellulaire de la FAS dépend de l'état métabolique de la cellule, où AMPK, en réponse à l'augmentation du ratio AMP/ATP, conduit à la libération de la FAS extracellulaire ce qui constituerait un mécanisme de restauration de l'état énergétique des cellules du cancer du sein (Oliveras-Ferraros et al., 2009).

2.4.3.1.4. Polymorphisme de *FASN*

La surexpression de la FAS dans le cancer est également liée à son polymorphisme. Grâce à des analyses immunohistochimiques, Shah et collaborateurs ont observé un gain du nombre de copies du gène *FASN* dans 24% d'échantillons d'adénocarcinome de la prostate avec une augmentation simultanée de son niveau protéique (Shah et al., 2006). Des SNPs (single nucleotide polymorphisms) ont été identifiés dans le gène *FASN* chez des patients atteints de cancer de la prostate : il en résulte une surexpression de l'enzyme associée à une augmentation de l'IMC (indice de masse corporelle) et

à un mauvais pronostic (Nguyen et al., 2010). La FAS serait de fait un médiateur reliant obésité et progression tumorale. Une autre étude a montré que la surexpression de La FAS dans le cancer colorectal est associée à des MSI (microsatellite instability), l'obésité étant un facteur de risque dans cette pathologie (Ogino et al., 2007).

2.4.3.2. FAS comme cible thérapeutique

La FAS est une cible potentielle et attractive pour le traitement du cancer. Comme décrit plus haut, elle est surexprimée dans plusieurs types de cancer et elle est liée à un mauvais pronostic. Des expériences de KD par la stratégie de siRNA ont montré que plusieurs lignées cellulaires cancéreuses dépendent de la FAS pour proliférer et survivre. A ce jour, plusieurs composés inhibiteurs de la FAS ont été identifiés. Ceux-ci incluent TVB-3166, TVB-2640, GSK2194069, C93, FAS31, C247, C75, cérulénine, orlistat, triclosan et certains polyphénols naturels. En raison de leurs effets secondaires, seul le TVB-2640–premier inhibiteur oral, sélectif et réversible de la FAS – est en essai de phase clinique chez des patients cancéreux. En revanche, les résultats préliminaires du premier essai chez l'homme ont montré des toxicités cutanées réversibles (desquamation et érythrodysesthésie palmo-plantaire) et ophtalmologiques (œdème cornéen, kératite et iritis) (Dean et al., 2016). Cependant, l'administration du TVB-2640 en association avec le paclitaxel donne une bonne réponse chez des patients atteints de carcinome séreux péritonéal ainsi qu'une meilleure stabilité de la maladie chez des patientes atteintes du cancer du sein (Arkenau et al., 2015).

2.4.3.3. Mécanisme d'action de la FAS dans le cancer

La FAS joue donc un rôle important dans la prolifération et la survie tumorale. Son inhibition entraine la mort des cellules cancéreuses par de multiples mécanismes, y compris l'altération de la synthèse des membranes, de la modification des protéines et l'interaction avec d'autres voies de signalisation oncogéniques. En effet, le blocage de l'activité enzymatique de la FAS perturbe la distribution des radeaux lipidiques (lipides rafts) au niveau de la membrane plasmique et modifie la localisation des protéines qui y sont associées telles que N-Ras. L'inhibition de la FAS induit également une augmentation du malonyl-CoA avec une diminution concomitante des phospholipides et du palmitate. En plus de perturber la synthèse des lipides membranaires, l'inhibition de la FAS peut affecter la modification des protéines par palmitoylation. En ce sens, Fiorentino et collaborateurs ont constaté une corrélation entre la surexpression de la FAS et la palmitoylation de WNT-1 avec pour conséquence la stabilisation de la β-caténine *in vitro*, *in vivo* et sur 862 patients atteints de cancer de la prostate (Fiorentino et al., 2008). La palmitoylation de WNT-1 est essentielle pour sa liaison au récepteur et l'activation de la voie de signalisation WNT/β-caténine impliquée dans la prolifération et la survie tumorale. La perturbation de cette voie par inhibition de la FAS *in vitro* altère l'expression des protéines

de survie tumorale telle que c-Myc (Ventura et al., 2015). De nombreux complexes de transduction du signal sont associés aux lipides rafts. La perturbation de ces derniers ainsi que des protéines qui y sont associées par l'inhibition de la FAS peut impacter la transduction du signal. Par exemple, l'inhibition de la FAS par TVB-3166 dans des lignées cancéreuses réduit l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et WNT/β-caténine. Par conséquent, de nombreux gènes en aval de ces voies de signalisation, impliqués dans la prolifération cellulaire, le métabolisme et l'apoptose sont également régulés à la hausse ou à la baisse (Ventura et al., 2015).

Autre point, la FAS semble être impliquée dans la résistance aux chimiothérapies. Liu et collaborateurs ont par exemple constaté que la surexpression de la FAS dans les cellules de cancer mammaire MCF7 et MDA-MB-468 induit leur résistance aux drogues anticancéreuses par diminution de l'apoptose induite par le traitement et par une production accrue du palmitate. L'inhibition de la FAS par l'orlistat a par contre sensibilisé ces cellules au traitement anticancéreux (Liu et al., 2008). Ce phénomène de résistance aux médicaments induit par la surexpression de la FAS peut donc être exploité en thérapeutique, en utilisant des inhibiteurs de la FAS seuls ou en combinaison avec d'autres agents chimiothérapeutiques. Par exemple, le blocage de la FAS peut induire une chimiosensibilisation synergique des cellules cancéreuses du sein avec des agents interférents avec la polymérisation/dépolymérisation des microtubules tels que le docétaxel, paclitaxel et vinorelbine. La cérulénine et le 5-fluorouracile présentent un effet synergique améliorant l'efficacité du traitement aux antimétabolites dans les cellules cancéreuses du sein. Enfin, le blocage pharmacologique de la FAS inverse l'autorésistance au trastuzumab en inhibant de manière transcriptionnelle la surexpression de HER2 dans les cellules cancéreuses mammaires (Vazquez-Martin et al., 2007).

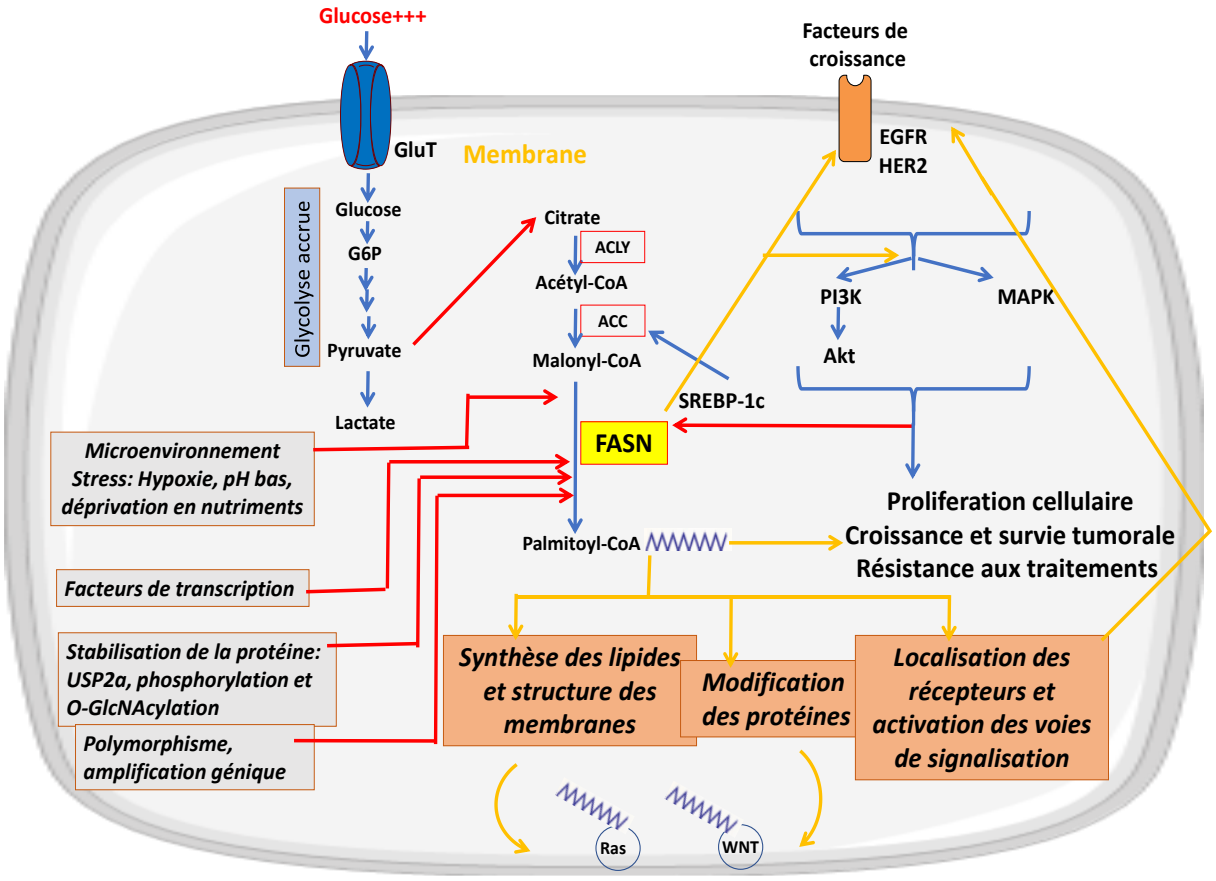


Figure 7 : **Régulation de la FAS et implication dans le processus tumoral**. Les facteurs de croissance et les hormones stéroïdiennes jouent un rôle important dans la surexpression de la FAS notamment dans le contexte tumoral. Le stress induit par le microenvironnement tumoral est également impliqué dans la surexpression de la FAS et, par conséquence, dans la lipogenèse élevée dans le cancer. Cette élévation est également influencée par l'amplification génique de *la FAS* ainsi que par une diminution de la dégradation de la FAS au niveau post-traductionnel. La FAS catalyse la synthèse du palmitate à partir d'acétyl-CoA et de malonyl-CoA. Le palmitate est ensuite converti en d'autres acides gras/lipides complexes essentiels pour la synthèse des membranes, la fonction et la modification des protéines, ainsi qu'à la localisation correcte des récepteurs et l'activation des voies de signalisation. L'ensemble de ces fonctions fait que la FAS joue un rôle déterminant sur la prolifération, la croissance et la survie tumorale.

Le rôle physiologique et pathologique de la FAS a été décrit dans un article de revue (en page 187)

Sadia Raab et Tony Lefebvre (2021). L'acide gras synthase, une enzyme multi-FAS-ettes. *Soumis à Médecine/Sciences.*

Partie 2 : La *O*-β-N-Acétyl-glucosaminylation (*O*-GlcNAcylation)

1. Caractéristiques générales

La *O*-GlcNAcylation, découverte en 1984 (Torres and Hart, 1984) au cours d'une étude qui visait à cartographier la distribution des résidus de N-Acétylglucosamine à la surface de lymphocytes, est une MPT réversible des protéines cytoplasmiques, nucléaires et mitochondriales. Zhu et collaborateurs ont montré que certaines protéines pouvaient également être modifiées de manière co-traductionnelle par *O*-GlcNAcylation (Y. Zhu et al., 2015; Zhu et al., 2020). La *O*-GlcNAcylation correspond à l'ajout d'un résidu de N-acétylglucosamine en anomérie β sur le groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine des protéines cibles à partir de 5'-diphospho-N-acétylglucosamine ou UDP-GlcNAc (UDP-N-acétylglucosamine) (Hart et al., 2007). À la différence de certains autres types de glycosylation (*N*-glycosylation, *C*-mannosylation par exemple), il n'existe pas de séquence consensus stricte pour la *O*-GlcNAcylation. Néanmoins, la présence de séquences de type PVS/T (proline-valine-sérine/thréonine) est favorable à cette glycosylation (Vosseller et al., 2006).

La *O*-GlcNAcylation peut entrer en compétition avec la phosphorylation sur les mêmes résidus ou sur des résidus adjacents (Wang et al., 2008). Contrairement à la phosphorylation qui est régulée par une pléthore de kinases et de phosphatases, la *O*-GlcNAcylation est régulée par un unique couple d'enzymes antagonistes : l'OGT (polypeptide β-D-N-acétylglucosaminyl-transférase ou *O*-GlcNAc transférase), qui transfère le résidu GlcNAc à partir de son substrat donneur, l'UDP-GlcNAc sur les protéines cibles, et l'OGA (β-D-N-acétylglucosaminidase ou *O*-GlcNAcase) qui l'hydrolyse (**Fig. 8**).

La *O*-GlcNAcylation est une MPT très conservée. Elle est retrouvée chez les mammifères - souris (Torres and Hart, 1984), lapin (Haltiwanger et al., 1990), rat (Haltiwanger et al., 1992) et Homme (Holt et al., 1987) -, les amphibiens notamment le xénope (Slawson et al., 2002), les insectes (Kelly and Hart, 1989), les invertébrés (*Caenorhabditis elegans*) (Hanover et al., 2005) et les végétaux (*Arabidopsis thaliana*) (Swain et al., 2001) bien que ceci reste sujet à discussion. Elle a également été retrouvée chez certains parasites (Dieckmann-Schuppert et al., 1993; Aquino-Gil et al., 2018; Torres-Gutiérrez et al., 2019), champignons filamenteux (Woosley et al., 2006), bactéries (*Listeria monocytogenes*) chez qui elle modifie le flagelle (Schirm et al., 2004) et virus (Greis et al., 1994).

La *O*-GlcNAcylation n'a pour le moment pas été identifiée chez la levure. Cependant, Halim et collaborateurs ont mis en évidence la *O*-mannosylation nucléocytoplasmique et mitochondriale chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* (Halim et al., 2015). De manière intéressante, les auteurs ont identifié 160 protéines *O*-Mannosylées qui comprennent des facteurs de transcription, des nucléoporines, des histones et des kinases, qui sont des protéines *O*-GlcNAcylées

et/ou phosphorylées chez les eucaryotes supérieurs. De fait, les auteurs suggèrent alors que la *O*-mannosylation serait l'équivalent de la *O*-GlcNAcylation chez la levure (Halim et al., 2015).

La *O*-GlcNAcylation est une MPT apparue très tôt au cours de l'évolution. Elle joue un rôle majeur dans toute une pléthore de mécanismes biologiques fondamentaux (**Fig. 18**). De manière plus générale, elle est essentielle au développement embryonnaire des mammifères puisque le KO du gène la codant entraine la mort des CSE (cellules souches embryonnaires) et des embryons murins (Shafi et al., 2000). De même, le KO inductible de l'OGT provoque la mort de l'embryon murin 4 à 5 jours après son implantation (O'Donnell et al., 2004).

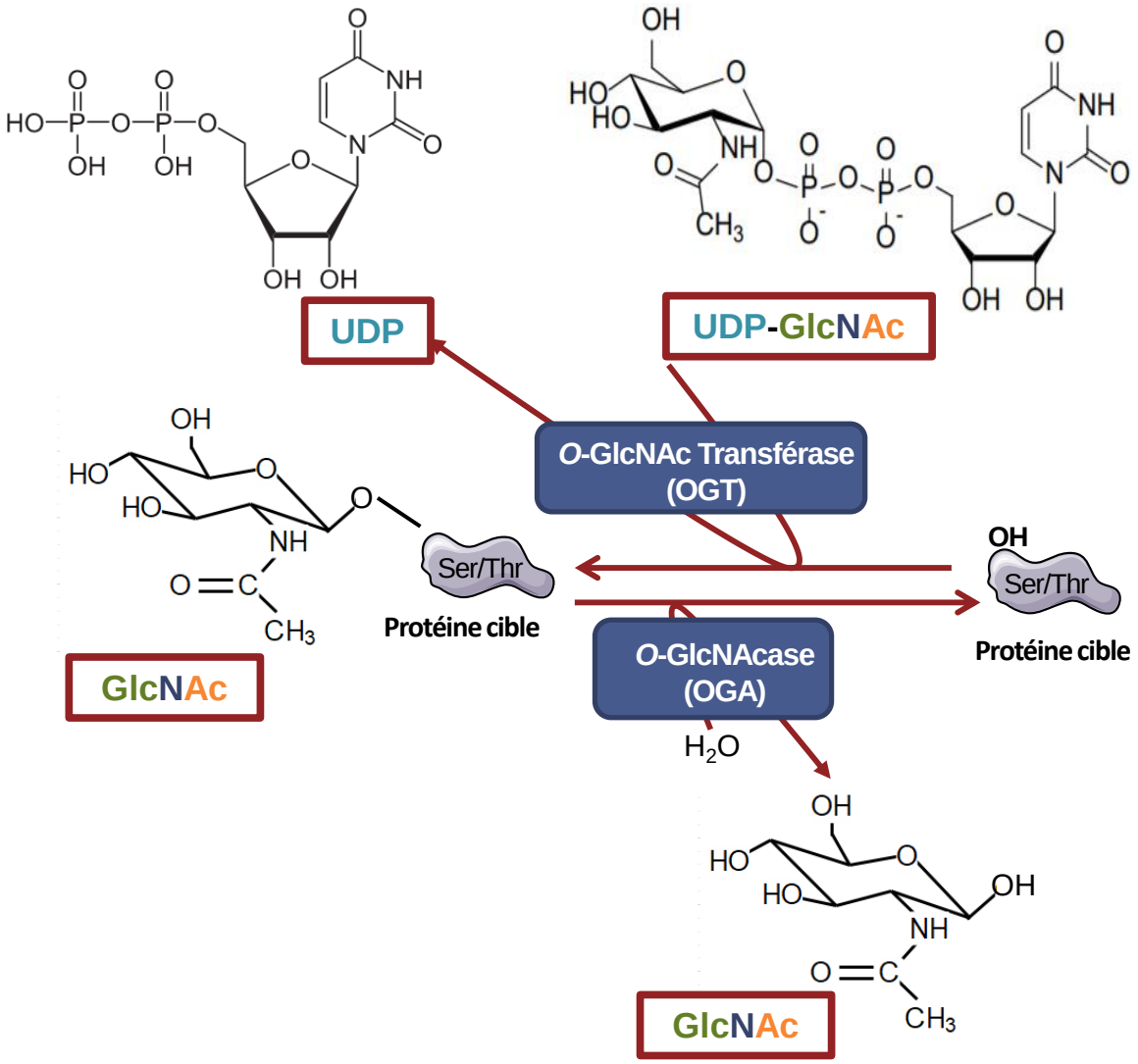


Figure 8 : **La *O*-GlcNAcylation** est une modification dynamique des protéines nucléocytoplasmiques et mitochondriales qui correspond à l'ajout du résidu GlcNAc sur les protéines cibles. Elle est contrôlée par un couple unique d'enzymes : l'OGT et l'OGA.

2. La voie de biosynthèse des hexosamines (HBP, hexosamine biosynthetic pathway)

Le substrat de l'OGT est l'UDP-GlcNAc. Ce nucléotide sucre est synthétisé par la voie de biosynthèse des hexosamines qui fait intervenir différents précurseurs métaboliques tels que le glucose (on considère que 2 à 3 % du glucose entrant dans la cellule emprunte cette voie (Marshall et al., 1991), la glutamine, l'acétyl-CoA et l'UTP (uridine triphosphate). Par conséquent, l'UDP-GlcNAc est un véritable senseur nutritionnel au carrefour de nombreuses voies métaboliques faisant appel aux acides aminés glucogéniques et cétogéniques, glucides simples et complexes, acides gras et structures nucléotidiques (**Fig. 9**). De ce fait, un déséquilibre nutritionnel se traduit par des anomalies de *O*-GlcNAcylation des protéines, certaines associées aux maladies neurodégénératives, aux désordres cardiovasculaires, au diabète de type 2 ou au cancer. C'est ce que je vais détailler plus loin. En effet, au vu du nombre et de la diversité des protéines modifiées, la *O*-GlcNAcylation est impliquée dans différents processus physiologiques à tous les niveaux de régulation de la vie cellulaire.

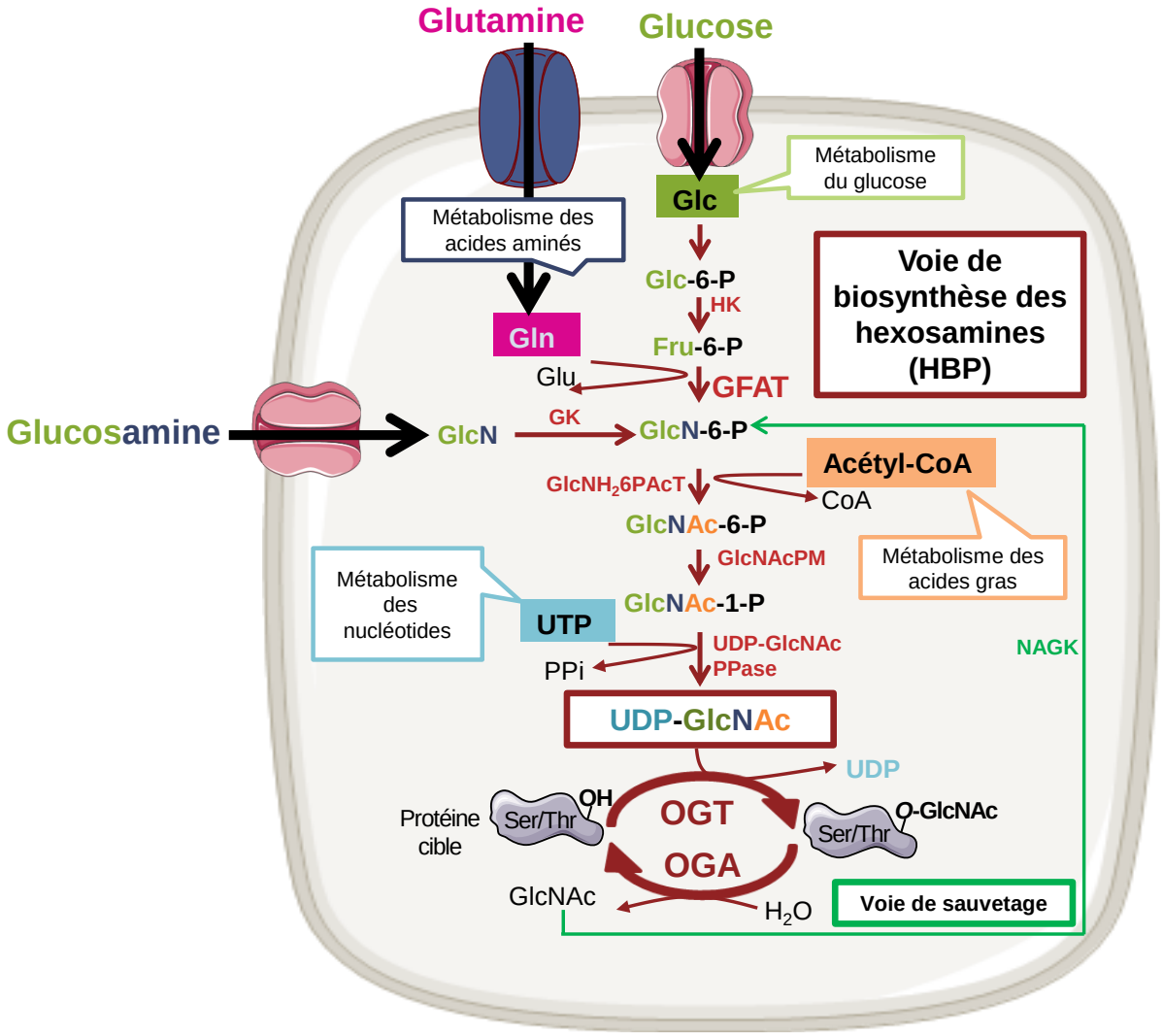


Figure 9 : Voie de biosynthèse des hexosamines. 2 à 3 % du glucose (Glc) entrant dans la cellule sont métabolisés dans la voie de biosynthèse des hexosamines. La GFAT (glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase) catalyse le transfert irréversible du groupement amine de l'acide aminé glutamine (Gln) sur le Fru-6-P (fructose-6-phosphate) et son isomérisation en glucosamine-6-phosphate ($GlcNH_2$-6-P). L'acétyl-CoA fournit le groupement acétyl pour former la N-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6-P) grâce à la glucosamine-6-phosphate acétyl transférase ($GlcNH_2$-6-P AcT). Enfin, l'(UDP-GlcNAc PPase) UDP-N-acétylglucosamine pyrophosphorylase permet la synthèse de l'UDP-GlcNAc à partir du nucléotide pyrimidique UTP. L'OGT catalyse la réaction de transfert du résidu GlcNAc à partir de l'UDP-GlcNAc sur les résidus Ser et Thr des protéines cibles et l'OGA hydrolyse ce résidu. Une voie de sauvetage de la GlcNAc faisant intervenir la NAGK (N-acétylglucosamine kinase) catalyse la phosphorylation de la GlcNAc, libérée par l'OGA, en GlcNAc-6-P qui rejoint la voie des hexosamines.

La voie des hexosamines est régulée par l'apport nutritionnel *via* les différents métabolismes cités ci-dessus. Une élévation des niveaux de *O*-GlcNAcylation est observée en réponse à l'augmentation des concentrations de glucose extracellulaire *in vitro* (Taylor et al., 2008) et *in vivo* dans divers tissus (Liu et al., 2000). Dans des conditions riches en glucose, l'OGA, *via* son association à une activité HAT, permet l'acétylation de PKM2 ce qui promeut sa *O*-GlcNAcylation, inhibant son activité catalytique et favorisant la glycolyse aérobie et la croissance tumorale (Singh et al., 2020). D'autres études ont montré que, même à faible concentration, la glucosamine –($GlcNH_2$) qui contourne l'étape limitante catalysée par la GFAT de la voie des hexosamines - augmente considérablement la *O*-GlcNAcylation (Taylor et al., 2008; Taylor et al., 2009). Aussi, la culture des cellules humaines du cancer du col de l'utérus HeLa et du cancer de la prostate PC-3 dans des concentrations croissantes en glutamine (0 mM à 8 mM) induit une augmentation des niveaux d'UDP-GlcNAc (2.5 fois) ou de protéines *O*-GlcNAcylées (2 fois) respectivement (Abdel Rahman et al., 2013). Cet effet de glutamine sur l'élévation des niveaux d'UDP-GlcNAc a également été retrouvé dans les lymphocytes T actives (Swamy et al., 2016). Autre chose, l'UDP-GlcNAc est également généré par la voie de sauvetage de la GlcNAc faisant intervenir la NAGK. La GlcNAc étant le composant majeur des glycoprotéines, glycolipides et des protéoglycanes, est ainsi recyclée par la dégradation lysosomale de ces oligosaccharides (Weihofen et al., 2006). L'effet positif de la supplémentation en GlcNAc sur le niveau intracellulaire d'UDP-GlcNAc a été observé dans différents modèles cellulaires telles que les cellules hépatocytaires de souris AML12 (Ryczko et al., 2016) et *in vivo* chez des souris C57BL/6 jeunes (Ryczko et al., 2016). Enfin, il a été montré dans des modèles de rat l'augmentation des niveaux d'UDP-GlcNAc dans le muscle squelettique suite à une perfusion directe d'acides gras libre (Hawkins et al., 1997). La même étude montre que les myotubes stimulés par le palmitate répondent avec une augmentation d'UDP-GlcNAc de 1,3 fois. De même, les niveaux d'UDP-GlcNAc sont renforcés par les acides gras saturés C16 et C18 (Hawkins et al., 1997), soutenant d'avantage l'idée selon laquelle le flux HBP est un déterminant majeur des niveaux de *O*-GlcNAcylation. Par conséquent, la *O*-GlcNAcylation est considérée comme un senseur nutritionnel. En revanche, d'après la littérature, le lien entre la disponibilité nutritionnelle et la *O*-

GlcNAcylation n'est pas une simple corrélation positive. Par exemple, la privation en glucose induit l'activation et le recrutement de la protéine kinase p38MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) au niveau du domaine C-terminal de l'OGT, le neurofilament NF-H est alors recruté vers l'OGT et *O*-GlcNAcylé, augmentant sa solubilité (Cheung and Hart, 2008). Autre exemple, au cours du jeûne, HCF-1 fonctionne comme une protéine adaptatrice qui guide l'OGT vers PGC-1α (peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 alpha) qui est de fait *O*-GlcNAcylé et stabilisé : certains gènes cibles impliqués dans la néoglucogenèse sont exprimés (Ruan et al., 2012) (**Fig. 10**). Ces résultats suggèrent que les niveaux de *O*-GlcNAcylation varient en fonction des besoins métaboliques de la cellule et non pas simplement par une lecture directe du flux HBP. Cette idée est renforcée par une étude récente qui montre que les niveaux de *O*-GlcNAcylation dans le cœur, le foie et le cerveau de rat au cours du développement postnatal ne sont pas liés à l'apport alimentaire (Dupas et al., 2021).

Il a été observé dans certaines études, l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation dans des conditions de privation nutritionnelle (Taylor et al., 2008). Cette augmentation n'est pas liée aux flux HBP puisque les niveaux d'UDP-GlcNAc sont réduits dans ces conditions (Taylor et al., 2009). En revanche, les niveaux d'expression du gène de l'OGT sont plus élevés. En effet, l'accumulation des protéines mal conformées due au stress nutritionnel augmente l'affinité de l'OGT pour ses substrats ce qui augmente les niveaux de *O*-GlcNAcylation. Ainsi, la disponibilité nutritionnelle régule les niveaux de *O*-GlcNAcylation non seulement en déterminant le flux d'UDP-GlcNAc mais aussi en modulant les niveaux d'OGT et d'OGA, et de leurs protéines adaptatrices et substrats (Taylor et al., 2008; Taylor et al., 2009).

La voie HBP est également modulée par l'activité de son enzyme limitante GFAT caren plus de catalyser une réaction irréversible, l'UDP-GlcNAc lui applique un rétrocontrôle-négatif, limitant sa concentration dans la cellule (Traxinger and Marshall, 1991). Ainsi, la GFAT est régulée en fonction des signaux nutritionnels.

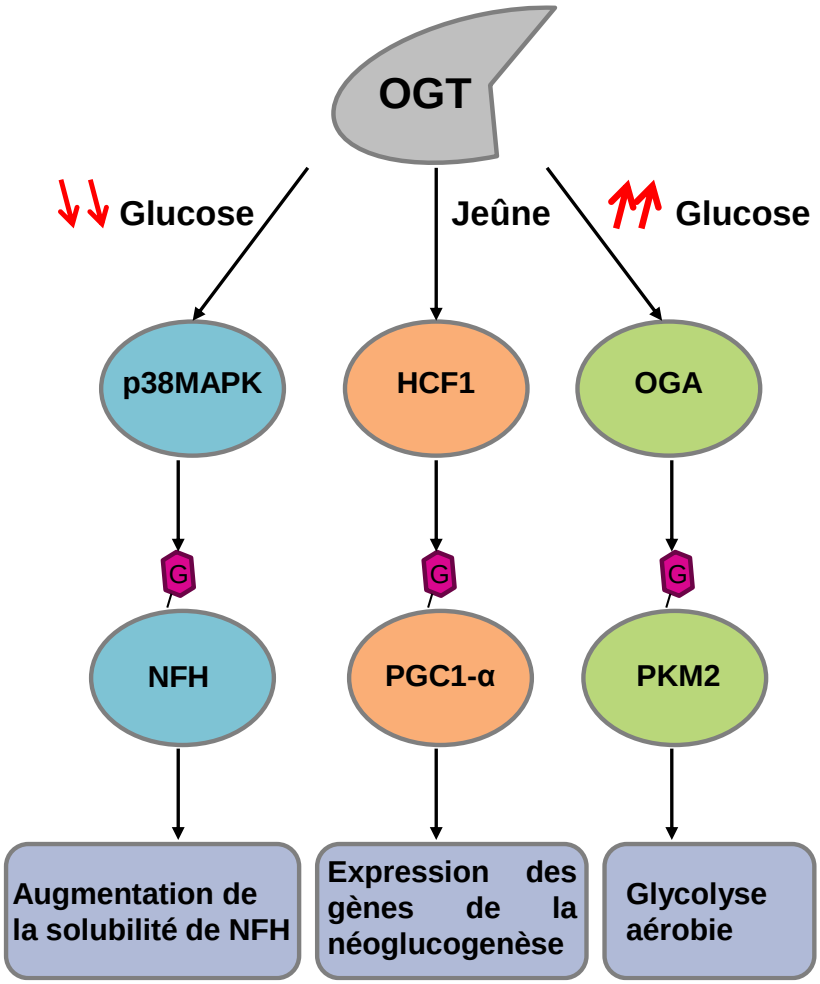


Figure 10 : **Régulation de l'OGT en fonction des conditions nutritionnelles**. En fonction des conditions nutritionnelles (privation en glucose, jeûne ou condition riche en glucose), l'OGT est recrutée vers divers substrats *via* une protéine adaptatrice spécifique, se traduisant par des activités biologiques différentes.

3. Les enzymes de la *O*-GlcNAcylation

Les enzymes responsables du cycle *O*-GlcNAcylation/dé-*O*-GlcNAcylation sont l'OGT et l'OGA (**Fig. 8**).

3.1. OGT (EC 2.4.1.255)

3.1.1. Découverte et localisation subcellulaire

Des études initiales de *pulse chase* portant sur des cellules BRL (Buffalo rat liver) ont démontré que quelques minutes après sa biosynthèse la protéine p62 était modifiée par un groupement GlcNAc par une voie de glycosylation différente de celle responsable des *N*- et *O*-glycosylations alors connues (Davis and Blobel, 1987). Suite à cette observation au début des années 1990, Haltiwanger et collaborateurs, ont proposé et confirmé la présence d'une glycosyltransférase responsable d'une telle activité enzymatique (Haltiwanger et al., 1990; Haltiwanger et al., 1992). Ces études ont conduit au clonage d'une UDP-N-acétylglucosaminyl transférase, appelée depuis OGT. Par la suite, d'autres études ont révélé que l'OGT est l'enzyme unique qui ajoute le groupement GlcNAc sur des résidus Ser

et Thr des protéines cibles (Kreppel et al., 1997; Lubas et al., 1997) (**Fig. 9**). L'OGT est hautement conservée chez les métazoaires, de *Caenorhabditis elegans* et *Arabidopsis* à l'homme (Jacobsen et al., 1996; Kreppel et al., 1997). Bien qu'ubiquitaire, l'OGT est plus fortement exprimée dans le pancréas, le cerveau, le cœur et le muscle squelettique (Lubas et al., 1997; Okuyama and Marshall, 2004). Comme pour la glycosylation qu'elle contrôle, l'OGT est localisée dans le noyau et le cytoplasme, avec une prédominance nucléaire néanmoins. Des études ont montré que l'OGT peut être transloquée du noyau vers le cytoplasme et la membrane suite à la stimulation au sérum (Yang et al., 2008; Whelan et al., 2008; Perez-Cervera et al., 2013).

3.1.2. Du gène à la protéine

Le poisson-zèbre est le seul vertébré chez qui l'OGT est codée par deux gènes (*OGTA* et *OGTB*) suite à une duplication génique (Webster et al., 2009). Chez l'Homme, l'OGT est codée par un seul gène, *hOGT*, de 43 kb environ, localisé au locus q13.1 du chromosome X et composé de 22 exons et 21 introns (Shafi et al., 2000; Nolte and Müller, 2002) (**Fig. 11A** et **B**). Ce gène subit un épissage alternatif générant trois isoformes d'OGT partageant la même partie Ct et différant par le nombre de TPR (tetratricopeptide repeats), éléments structuraux de 34 acides aminés, en N-terminal (**Fig. 11C** et **D**). Ces TPR sont reliés à la partie Ct portant l'activité catalytique, par une région intermédiaire appelée hélice de transition H3.

Il existe deux isoformes nucléocytoplasmiques de l'OGT : une forme courte (short OGT, sOGT) de 78 kDa) et une forme longue (nucleocytoplasmic OGT, ncOGT) de 110 kDa. Il existe également une isoforme mitochondriale (mitochondrial OGT, mOGT) de 103 kDa. Comme précisé ci-dessus, ces isoformes diffèrent essentiellement par leur extrémité N-terminale et notamment par le nombre de motifs TPR, soit 13.5 pour la ncOGT, 9 pour la mOGT et 2.5 pour la sOGT (**Fig. 11C**). La ncOGT possède une séquence NLS de trois acides aminés DFP (^{541}Asp-Phe-Pro^{453}) lui permettant d'interagir avec l'importine α5 (Seo et al., 2016). La mOGT possède, quant à elle, une séquence d'adressage à la mitochondrie MTS (mitochondrial targeting sequence) en N-terminal et en amont du domaine TPR (Trapannone et al., 2016) (**Fig. 11C**). Cette séquence permet la localisation de l'OGT au niveau de la membrane interne mitochondriale et, par conséquent, de glycosyler certaines protéines de la chaine respiratoire. Néanmoins, il a été montré que la mOGT n'est exprimée que chez certains primates, et qu'en son absence, la ncOGT est suffisante pour *O*-GlcNAcyler les protéines mitochondriales (Trapannone et al., 2016). Concernant la sOGT, elle est très peu étudiée, rarement détectée et son activité glycosyltransférase n'est toujours pas clairement établie (Dehennaut et al., 2008). De ce fait, je ferai référence à la ncOGT (OGT) pour la suite de mon mémoire.

Le domaine TPR forme une superhélice siège des interactions protéine-protéine indispensables à la modification des substrats. Ce domaine faciliterait également les interactions avec des protéines accessoires jouant un rôle dans la sélectivité du substrat.

Récemment, il a été décrit une série de résidus d'asparagine conservés et impliqués dans la reconnaissance du substrat par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes établies avec leur chaine latérale (Levine et al., 2018). Ce domaine est également impliqué dans la multimérisation de l'OGT. En effet, l'OGT se dispose principalement sous la forme d'un homotrimère de trois sous-unités de 110 kDa dans la majorité des tissus. Une forme hétérotrimérique constituée de deux sous-unités de 110 kDa et d'une sous-unité de 78 kDa semble être présente dans plusieurs tissus, y compris le foie, les muscles et les reins (Kreppel and Hart, 1999).

La région Ct de l'OGT porte l'activité catalytique et contient plusieurs domaines (**Fig. 11C** et **D**): le domaine N-Cat (amino (N)-terminal-catalytic domain) ou domaine catalytique I (CDI, catalytic domain I) portant l'activité catalytique, le C-cat (carboxy (C)-terminal-catalytic domain) ou domaine catalytique II (CDII, catalytic domain II) portant l'activité *lectin-like* de liaison à l'UDP-GlcNAc, un domaine intermédiaire (intervening domain, Int-D) de 120 acides aminés qui sépare les deux domaines catalytiques et ne possédant pas de fonction connue à ce jour (Lazarus et al., 2011). Enfin, le domaine PPO (PIP-binding activity of OGT) interagit avec les groupements phosphate du PIP3, ce qui permet son recrutement à la membrane en réponse à l'insuline (Yang et al., 2008). L'OGT est une GT-B (glycosyl transférase de type B) puisque les domaines N-Cat (ou CDI) et C-Cat (ou CDII) possèdent des replis de type Rossmann (avec une topologie feuillet β-hélice α-feuillet β) typiques des membres de la superfamille GT-B. Le domaine N-Cat se distingue par le fait qu'il contient deux hélices supplémentaires H1 et H2 qui forment une partie essentielle du site actif (Lazarus et al., 2011).

Une *O*-GlcNAc transférase atypique, la EOGT (EGF (epidermal growth factor)-domain specific OGT), a été mise en évidence chez la drosophile (Sakaidani et al., 2011) puis chez les mammifères (souris, sanglier *Sus scrofa* et Homme) (Shaheen et al., 2013; Nagnan-Le Meillour et al., 2014; Sawaguchi et al., 2017). La EOGT réside dans le RE et est structuralement non liée à l'OGT. Bien que la EOGT utilise l'UDP-GlcNAc, elle modifie les protéines membranaires et secrétées contenant un domaine *EGF-like* et contribue aux interactions cellule-cellule ou cellule-matrice extracellulaire (Sakaidani et al., 2011). La *O*-GlcNAcylation extracellulaire est également impliquée dans divers processus biologiques notamment l'angiogenèse, en *O*-GlcNAcylant le récepteur Notch (Sawaguchi et al., 2017), et l'olfaction (Nagnan-Le Meillour et al., 2014).

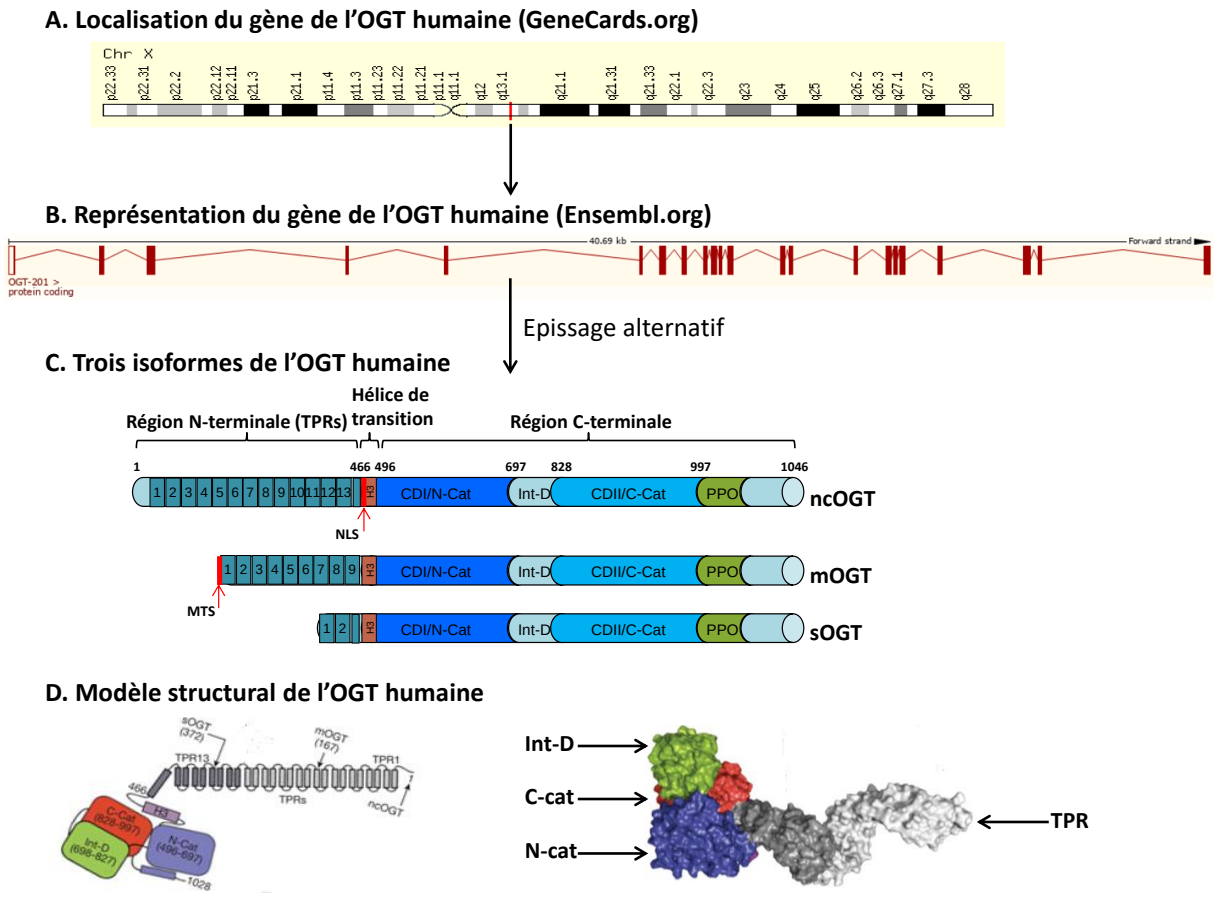


Figure 11: Gène, structure et isoformes de l'OGT humaine. (**A**) Le gène OGT est localisé sur le chromosome X en position q13.1. Schéma issu de ***GeneCards***. **B**. Le gène de l'OGT est constitué de 22 exons et de 21 introns. Schéma issu de ***Ensembl.org***. **C**. L'OGT possède trois isoformes : ncOGT, mOGT et sOGT. **D**. L'OGT est constituée d'un domaine TPR N-terminal d'interaction protéine-protéine et de deux domaines C-terminaux catalytiques séparés par un domaine Int-D. Figure extraite de (Lazarus et al., 2011).

3.1.3. Activité enzymatique

L'OGT est une glycosyltransférase soluble de la famille 41 dans la base de données CAZy (carbohydrate active enzyme). C'est une glycosyltransférase de type Leloir puisqu'elle utilise l'UDP-GlcNAc comme substrat. Elle agit selon un mécanisme séquentiel bi-bi ordonné dans lequel l'UDP-GlcNAc se lie d'abord à l'OGT, suivi du substrat polypeptidique (**Fig. 12A**). Après la formation du complexe ternaire (**Fig. 12B**), le résidu de N-Acétylglucosamine est transféré sur le carbone anomérique avec inversion de configuration pour former une liaison β-glycosidique. Enfin, la protéine *O*-GlcNAcylée se dissocie de l'OGT suivi de l'UDP.

Contrairement aux GT-A qui utilisent un ion métallique pour activer le départ de l'UDP, l'OGT est indépendante des ions métalliques. Le mécanisme catalytique fait intervenir des liaisons hydrogènes entre le β-phosphate de l'UDP et les résidus His920, Thr921 et Thr922 de l'OGT (Lazarus et al., 2012). Le résidu lysine 842 est également essentiel à l'activité catalytique de l'OGT puisque il est impliqué dans le départ de l'UDP (Lazarus et al., 2011; Janetzko and Walker, 2014).

L'activité de l'OGT et les niveaux de *O*-GlcNAcylation sont directement influencés par le niveau d'UDP-GlcNAc disponible dans la cellule. L'OGT est très affine pour l'UDP-GlcNAc avec un Km calculé de 545 nM (Haltiwanger et al., 1990), ce qui lui confère un avantage vis-à-vis des glycosyltransférases du RE et de l'appareil de Golgi avec lesquels elle est en compétition pour l'UDP-GlcNAc (Kreppel and Hart, 1999).

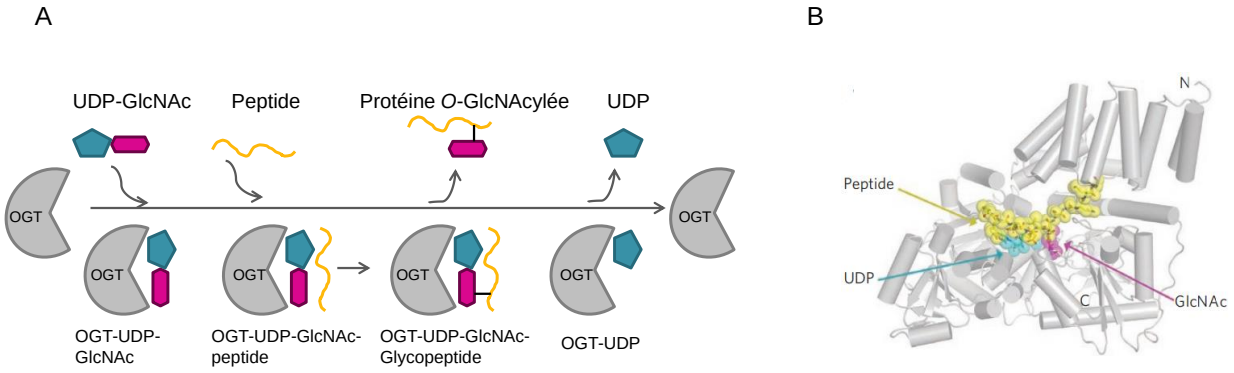


Figure 12 : (**A**) **Mécanisme catalytique de l'OGT.** Figure adaptée de (Lazarus et al., 2012). Représentation schématique du mécanisme bi-bi ordonné de l'OGT. L'OGT fixe d'abord l'UDP-GlcNAc dans son site catalytique puis le substrat au niveau de son domaine TPR. Le groupement N-acétylglucosamine est ensuite transféré sur la protéine cible avec formation d'une liaison β-glycosidique. La protéine *O*-GlcNAcylée et l'UDP sont ensuite libérés. (**B**) **Site actif de l'OGT.** Figure extraite de (Lazarus et al., 2012). Représentation de la structure cristalline du complexe ternaire OGT-UDP-Peptide. Le peptide est représenté en jaune, l'UDP est en cyan et le résidu GlcNAc est représenté en magenta. Les extrémités Nt et Ct sont également indiquées.

3.1.4. Activité protéolytique

En plus de son activité glycosyltransférase, il a été montré que l'OGT présente une activité endopeptidase impliquée dans le clivage protéolytique et la maturation du régulateur mitotique HCF-1 (host cell factor-1). Des études de *pulse-chase* suggèrent que ce clivage se produit dans le noyau et, dans une moindre mesure, le cytoplasme (Capotosti et al., 2011). D'autres études ont montré que HCF-1 interagit stablement et est modifié par l'OGT suggérant l'implication de l'OGT dans ce clivage. En combinant des outils structurels et biochimiques, les auteurs ont confirmé que l'OGT catalyse effectivement le clivage de HCF-1 et ont montré que l'UDP-GlcNAc est nécessaire pour ce clivage, tandis que l'UDP-5SGlcNAc l'inhibe. Ce clivage génère deux fragments HCF-1N et HCF-1C impliqués dans la sortie de la phase M et la progression en phase G1 du cycle cellulaire (Julien and Herr, 2003). La protéolyse a lieu dans une séquence de reconnaissance appelée HCF-1_{PRO} (pour protéolyse) constituée de 6 répétitions d'une séquence de 26 acides aminés, plus particulièrement entre les résidus Cys9 et Glu10 de la séquence Cys-Glu-Thr (CET) qui marque le site de clivage se trouvant à proximité du site de *O*-GlcNAcylation (Lazarus et al., 2013) (**Fig. 13**).

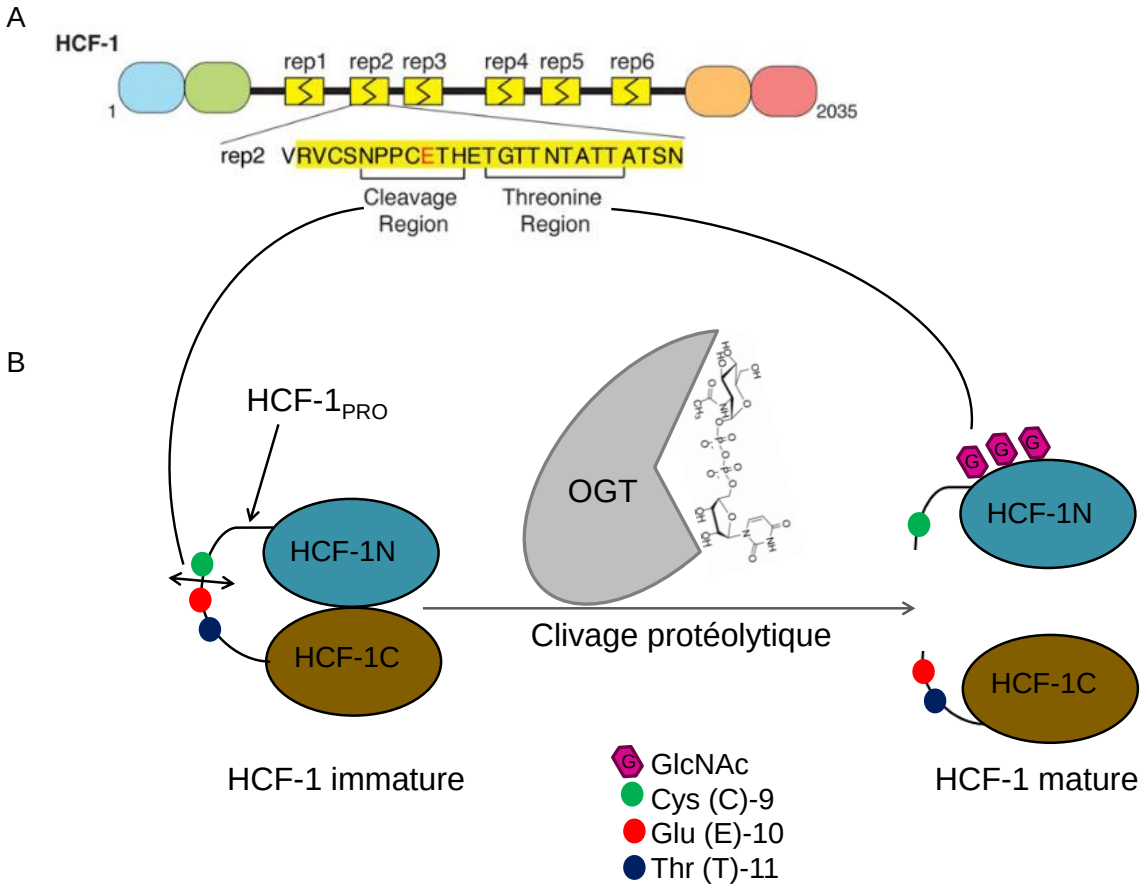


Figure 13 : Clivage protéolytique de HCF-1 par l'OGT. (**A**) Figure extraite de (Lazarus et al., 2013). Site de clivage protéolytique de HCF-1 (HCF-1_{PRO}). Les résidus conservés sont en jaune, le glutamate (Glu) E10 essentiel pour le clivage est représenté en rouge. HCF-1_{PRO} est subdivisée en régions de clivage et régions riches en thréonines. (**B**) Figure adaptée de (Lazarus et al., 2013). Le clivage de HCF-1 par l'OGT entre les résidus Cys et Glu génère deux fragments HCF-1N et HCF-1C. L'OGT *O*-GlcNAcyle également HCF-1 sur plusieurs sites, principalement situés dans le segment HCF-1N.

3.1.5. Régulation post-traductionnelle

Plusieurs MPTs ont été identifiées sur l'OGT comprenant la *O*-GlcNAcylation, la phosphorylation, l'ubiquitination et la *S*-nitrosylation.

Il a été montré que l'OGT est *O*-GlcNAcylée au niveau de ses domaines TPR et C-terminal. Tout d'abord, Kreppel et Hart ont suggéré la présence d'au moins un site de *O*-GlcNAcylation au niveau de la région Ct de l'OGT (Kreppel and Hart, 1999). Ceci a été confirmé en 2012 avec identification par spectrométrie de masse d'un site de *O*-GlcNAcylation entre les résidus 396 et 409, 826 et 832 et sur le résidu Thr1043 (**Fig. 14**) (Trinidad et al., 2012). Les résidus Ser3 et Ser4 peuvent être à la fois *O*-GlcNAcylés et phosphorylés par GSK-3β, suggérant un dialogue entre phosphorylation et *O*-GlcNAcylation en Nt pour la régulation de l'activité de l'OGT.

La phosphorylation de ces sites par GSK-3β augmente l'activité de l'OGT, tandis que leur mutation en alanine la diminue significativement (Kaasik et al., 2013). La phosphorylation de l'OGT sur Ser20 par

CaMKII (calcium-/calmodulin-dependent kinase II) et Tyr989 par Src (**Fig. 14**) augmente également son activité. En outre, la *S*-nitrosylation de l'OGT inhibe son activité catalytique de plus de 80%, sa dénitrosylation restaure quant à elle son activité et augmente les niveaux de protéines *O*-GlcNAcylées dans des macrophages stimulés par les LPS (lipopolysaccharides) (Ryu and Do, 2011). Une autre étude des mêmes auteurs a montré que les groupements thiol des résidus Cys845, Cys921 et Cys965 du domaine C-cat de l'OGT sont nitrosylés dans un modèle de neuroblastome induit par le peptide β-amyloïde (Ryu et al., 2016) (**Fig. 14**).

En plus de réguler son activité, les MPTs contrôlent d'autres aspects de l'OGT. Par exemple, la phosphorylation de la Thr444, située à l'extrémité distale Ct du 12ème TPR et à proximité de l'hélice de transition H3, par l'AMPK régule la localisation nucléaire de l'OGT ainsi que la sélectivité du substrat mais pas son activité catalytique (Bullen et al., 2014) (**Fig. 14**). La *O*-GlcNAcylation de la Ser389 sur le 10^{éme} domaine TPR contribue également à la localisation nucléaire de l'OGT (Seo et al., 2016) (**Fig. 14**).

La dégradation de l'OGT est contrôlée par ubiquitination. Des ubiquitines ligases E3 impliquées dans l'adressage au protéasome de l'OGT ont été identifiées mais, à ce stade, les lysines ciblées par ces enzymes ne sont pas connues. Il a été montré que l'inhibition de HCF-1 est associée à une augmentation de l'ubiquitination de l'OGT, suggérant le rôle du régulateur mitotique dans la stabilité de l'enzyme. L'ubiquitine ligase E3 β-TrCP1 (β-transducin repeats-containing protein 1) est responsable de la polyubiquitination de l'OGT, entrainant sa dégradation protéasomale en réponse à un stress hypoxique. Les auteurs ont montré que le blocage de l'expression de β-TrCP1 chez des souris soumises à un stress hypoxique, induit l'augmentation des niveaux de l'OGT par rapport aux souris contrôle, et à l'inverse, la surexpression de cette ubiquitine ligase entraine une diminution des niveaux d'OGT et ce de manière dépendante du protéasome (Liu et al., 2014). Une autre étude a montré que la polyubiqutination de l'OGT est dépendante de LSD2 (lysine-specific histone demethylase 2), protéine initialement décrite comme une histone déméthylase. L'inhibition de LSD2 diminue significativement l'ubiquitination de l'OGT, tandis que sa surexpression diminue les niveaux protéiques d'OGT et inhibe la croissance des cellules cancéreuses pulmonaires A549 (Y. Yang et al., 2015).

De manière intéressante, il a été montré que la phosphorylation de l'OGT sur le résidu Ser20 par Chk1 (checkpoint kinase 1) la protège de la dégradation protéasomale et promeut sa localisation au niveau du *Mid body*, structure contenant des faisceaux de microtubules dérivés du fuseau mitotique, au cours de la cytokinèse des cellules HeLa (Anon, 2017).

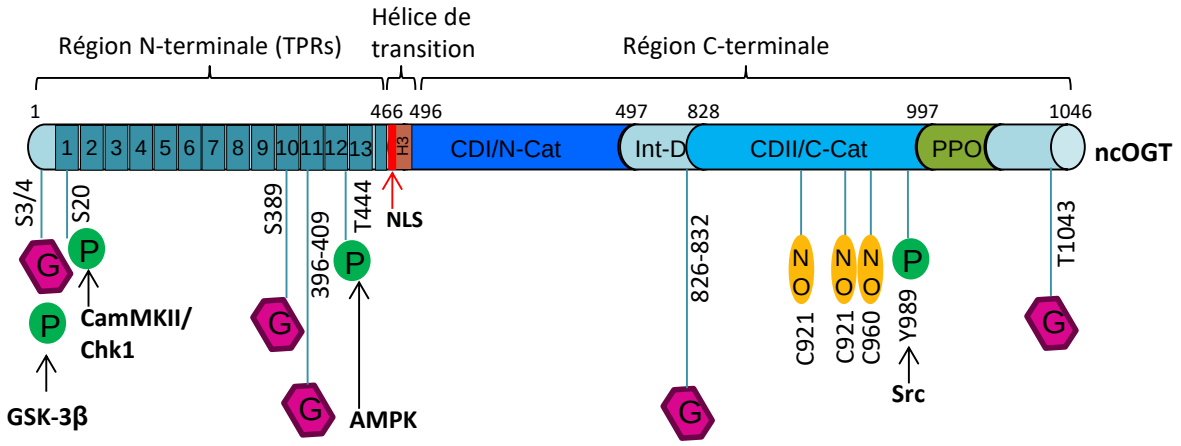


Figure 14 : Modifications post-traductionnelles identifiées sur l'OGT. L'OGT est modifiée de manière post-traductionnelle par plusieurs MPTs notamment la *O*-GlcNAcylation, la phosphorylation et la *S*-nitrosylation.

3.2. OGA (EC 3.2.1.169)

3.2.1. Découverte et caractéristiques générales

Au tout début des années 1990, des études d'activation des lymphocytes ont mis en évidence une réduction rapide et transitoire de la *O*-GlcNAcylation des protéines cytosoliques (Kearse and Hart, 1991a). Il avait été observé l'année suivante que la demi-vie de la GlcNAc sur les cytokératines 8 et 18 était inférieure à celle des protéines elles-mêmes (Chou et al., 1992). Ceci suggérait que la réaction d'ajout du groupement GlcNAc était réversible. En effet, à la même époque des premiers travaux sur l'OGT, Dong et collaborateurs ont confirmé l'existence de son antagoniste, la *O*-N-acétyl-β-D-glucosaminidase (*O*-GlcNAcase, OGA) dans des extraits cytosoliques de rate de rat (Dong and Hart, 1994). Cette glycosidase avait ensuite été décrite comme une HexC (hexosaminidase C) par analogie avec les β-hexosaminidases lysosomales (Dong and Hart, 1994). En revanche, contrairement à ces hexosaminidases acides, HexC n'est pas lysosomale, est active à pH neutre, et possède pour unique substrat le résidu GlcNAc (Dong and Hart, 1994; Gao et al., 2001).

Comme l'OGT, l'OGA est également hautement conservée dans les organismes multicellulaires, de *Caenorhabditis elegans* à l'Homme. Elle est exprimée dans tous les tissus avec des niveaux plus élevés dans le cerveau, le pancréas et le thymus (Gao et al., 2001).

3.2.2. Du gène à la protéine

Chez l'Homme, l'OGA est codée par le seul gène *MGEA5* d'environ 34 kb, localisé au locus q24.1-q24.3 du chromosome 10 et composé de 16 exons et 15 introns (**Fig. 15A** et **B**). Un épissage alternatif génère deux isoformes: une isoforme longue, L-OGA (long-OGA) de 130 kDa préférentiellement localisée dans le cytoplasme, et une isoforme courte, S-OGA (short-OGA), de 75 kDa qui réside principalement dans le noyau et les gouttelettes lipidiques (Comtesse et al., 2001; Keembiyehetty et al., 2011) (**Fig. 15C**).

L'OGA est une protéine multidomaine, constituée d'un domaine catalytique N-acétyl-β-D-glucosaminidase dans la région N-ter qui partage une homologie avec la famille des GH84 (glycoside hydrolase family 84) dans la classification CAZy, et d'un pseudo-domaine HAT (histone acétyl-transférase) en C-ter séparés par un domaine « *stalk* » (**Fig. 15D**).

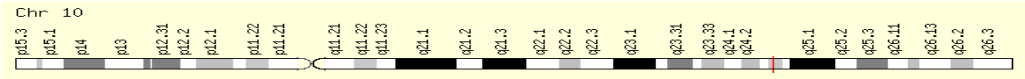
Les deux isoformes se distinguent par l'absence du domaine HAT et une partie du domaine *stalk* dans la S-OGA, ce qui réduit son activité catalytique. Néanmoins, la S-OGA possède 15 acides aminés en C-ter qui lui sont propres et lui permettent d'interagir avec les gouttelettes lipidiques impliquées dans le stockage des lipides neutres tout en régulant l'activité du protéasome (Keembiyehetty et al., 2011).

Le rôle du pseudo-domaine HAT n'est pas très clair. Une seule étude *in vitro* rapporte que l'OGA possède une activité acétyl-transférase au sein des nucléosomes. Ceci n'a pas été validé *in vivo*. En effet, dans une étude plus récente, les auteurs n'ont pas trouvé de liaison entre l'acétyl-CoA et le domaine HAT recombinant d'une OGA humaine (Rao et al., 2013). Il a été suggéré que le domaine C-ter de l'OGA soit impliqué dans les interactions protéiques et/ou le repliement correct de l'OGA. Récemment, il a été montré par Singh et collaborateurs que l'OGA ne possède pas d'activité KAT intrinsèque mais que son pseudo-domaine HAT lui permet d'interagir avec et promeut l'acétylation de PKM2 (pyruvate kinase M2), ce qui favorise la glycolyse aérobie et la prolifération des cellules cancéreuses (Singh et al., 2020).

Bien que les deux domaines N-ter et C-ter soient clivés par la caspase-3 lors de l'apoptose, des niveaux équivalents d'activité OGA ont été détectés dans des cellules exprimant à la fois les fragments N-ter et C-ter, suggérant que ces fragments tronqués se réassocient après clivage pour former une enzyme pleinement active (Butkinaree et al., 2008). Par conséquent, la présence du domaine C-ter semble nécessaire pour l'activité de l'OGA, mais le mécanisme exact reste inconnu.

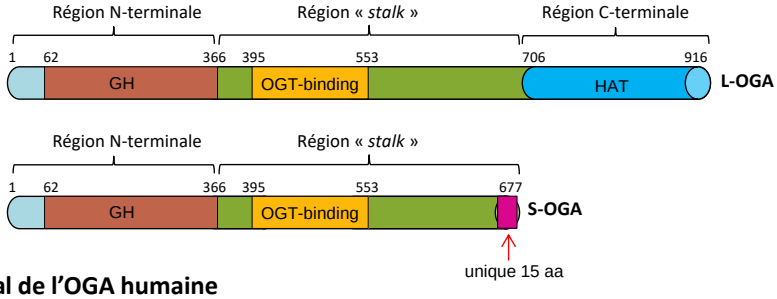
Enfin, le domaine *stalk* de l'OGA possède un domaine de liaison avec l'OGT pour former un complexe OGT-OGA appelé *O*-GlcNAczyme (Whisenhunt et al., 2006). Il a été montré que la perturbation de ce complexe enzymatique, bloque la signalisation et le développement cellulaire.

A. Localisation du gène *MGEA5* humain (GeneCards.org)



B. Représentation du gène *MGEA5* homain (Ensembl.org)

C. Isoformes de l'OGA humaine



D. Modèle structural de l'OGA humaine

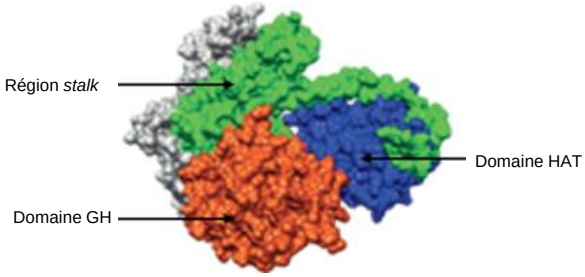


Figure 15: Gène, structure et isoformes de l'OGA humaine. A. Le gène MGEA5 est localisé sur le chromosome 10 en position q24.1-q24.3. Schéma issu de ***GeneCars***. **B**. Le gène MGEA5 est constitué de 16 exons et de 15 introns. Schéma issu de ***Ensembl.org***. **C**. Présentation schématique des isoformes de l'OGA. Elle possède deux isoformes : L-OGA (long OGA) et S-OGT (short OGA). **D**. L'OGA est constituée d'un domaine catalytique Glycoside Hydrolase (GH) en N-ter et d'un pseudo-domaine HAT en C-ter séparés par une région *linker*. Figure tirée de (Vocadlo, 2012).

3.2.3. Activité enzymatique

L'OGA forme un homodimère de type *arm-in-arm* inhabituel mais essentiel pour son activité. Plus précisément, une fente en forme de V, formée à l'interface du domaine catalytique du monomère A et du domaine *stalk* du monomère B, est impliquée dans la liaison du résidu GlcNAc (**Fig. 16A**). La liaison entre le résidu GlcNAc et les résidus du site actif de la fente se fait de telle manière que seuls les groupements β-*O*-GlcNAc sont hydrolysés (**Fig. 16B**) (Joiner et al., 2019). Le résidu GlcNAc est libéré des glycopeptides en suivant un mécanisme catalytique dans lequel les résidus Asp174 et Asp175 du site catalytique servent de catalyseurs acide/base. L'OGA catalyse la formation d'un intermédiaire

bicyclique oxazoline ou ion oxazolinium qui est ensuite hydrolysé afin de libérer l'OGA et la GlcNAc tout en maintenant la configuration anomérique (Cekic et al., 2016) (**Fig. 16C**).

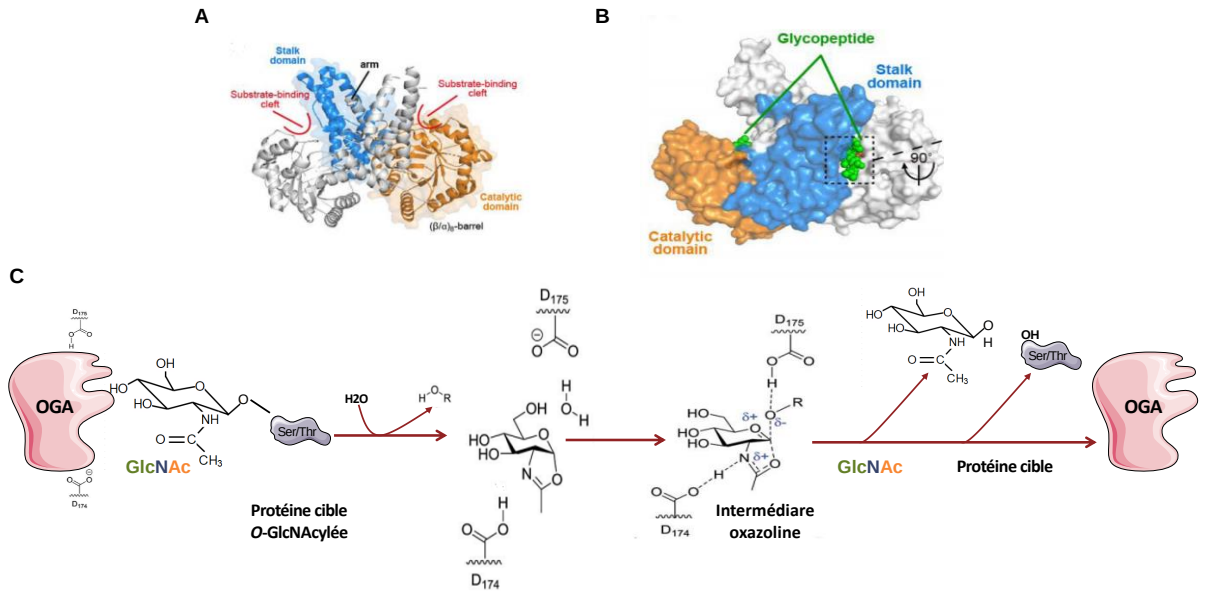


Figure 16: **Activité catalytique de l'OGA**. **(A)** Homodimère d'OGA (*arm-in-arm*). Le domaine catalytique et le domaine *stalk* sont représentés sous forme d'hélices de couleur orange et bleue respectivement. **(B)** Liaison des substrats glycopeptidiques à l'OGA. La chaine glycopeptidique de l'αB-cristalline (représentée en sphères vertes) interagit avec certains résidus du site actif de l'OGA. Figures extraites de (Joiner et al., 2019). **(C)** Représentation schématique du mécanisme catalytique de l'OGA. L'OGA utilise un mécanisme impliquant deux résidus aspartate de son site catalytique qui permettent la formation transitoire d'un intermédiaire oxazoline qui après hydrolyse libère le résidu GlcNAc.

3.2.4. Régulation post-traductionnelle

L'OGA est modifiée de manière post-traductionnelle par *O*-GlcNAcylation, phosphorylation, SUMOylation et ubiquitinylation. Cependant, les rôles de ces MPTs sont très peu connus.

Il a été montré que l'OGA est *O*-GlcNAcylée sur le résidu Ser405 situé au niveau de la région *stalk*, plus précisément au niveau du domaine d'interaction avec l'OGT. La mutagenèse de ce site a montré une réduction de la demi-vie de l'OGA (de 20 h à 6 h), suggérant que la *O*-GlcNAcylation affecte la stabilité de cette enzyme (Gorelik et al., 2019). En revanche, l'effet de cette *O*-GlcNAcylation sur le complexe OGT-OGA (*O*-GlcNAczyme) n'est pas connu (Gorelik et al., 2019).

L'OGA est également phosphorylée sur de nombreux résidus sérine et thréonine identifiés par des études protéomiques. Il s'agit des Ser6, Ser522 (Mertins et al., 2016), Ser268 (Rigbolt et al., 2011), Ser364, Thr370, Thr709, Ser712 (Kettenbach et al., 2011), Ser505, Ser509, Ser511 (Sharma et al., 2014), et Ser915 (Klammer et al., 2012), localisés sur l'intégralité des domaines de l'OGA. En revanche, l'effet de la phosphorylation de l'OGA n'a pas été élucidé.

Comme décrit plus haut, au cours de l'apoptose, l'OGA est clivée par la caspase-3 au niveau du site de reconnaissance Ser410-Val-Val-Asp413 du domaine d'interaction avec l'OGT. En revanche, les domaines N-ter et C-ter résultants restent associés, permettant une activité enzymatique complète. Le rôle biologique de ce clivage n'est pas caractérisé (Butkinaree et al., 2008). D'autres analyses par spectrométrie de masse ont révélé la présence de sites de SUMOylation et d'ubiquitinylation sur l'OGA (Wagner et al., 2011; Lumpkin et al., 2017) (**Fig. 17**).

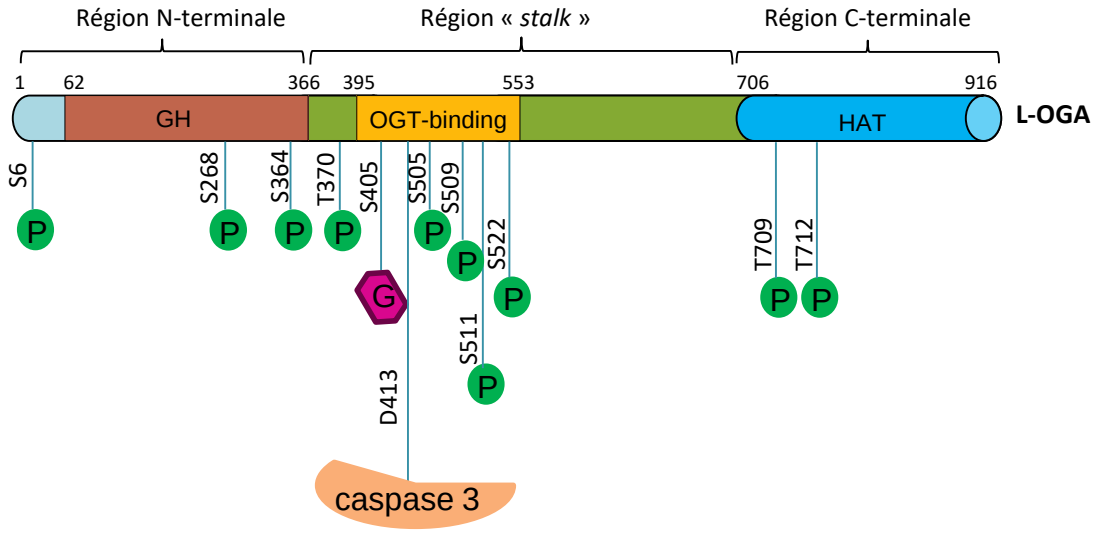


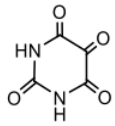
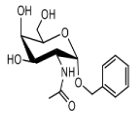
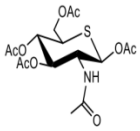
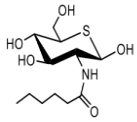
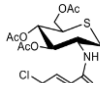
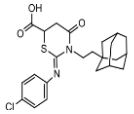
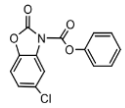
Figure 17: **Modifications post-traductionnelles identifiées sur l'OGA**. Les sites de phosphorylation et de *O*-GlcNAcylation de l'OGA sont indiqués. En revanche, les sites de SUMOylation et d'ubiquitinylation ne sont pas connus. L'OGA est clivée par la caspase-3 au niveau du site Asp413.

4. Inhibiteurs des enzymes de *O*-GlcNAcylation

Comme discuté ci-dessus, le cycle *O*-GlcNAcylation/dé-*O*-GlcNAcylation est régulé uniquement par deux enzymes : l'OGT et l'OGA. Afin de caractériser ses fonctions physiologiques ou pathologiques, une manipulation sélective de la *O*-GlcNAcylation peut se faire en ciblant ses enzymes par stratégie de siRNA ou d'inhibiteurs pharmacologiques. Ces derniers contournent le problème de transfection et permettent le contrôle des cellules en fonction du temps et de la dose. De même, la réversibilité de tout effet est observable en éliminant ces inhibiteurs.

Les inhibiteurs de l'OGT comprennent les petites molécules inhibitrices, les analogues de son substrat -UDP-GlcNAc- ou ceux de l'uracile (Ju Kim, 2020). Quant aux inhibiteurs de l'OGA, ils rassemblent les analogues de son substrat -GlcNAc- et de l'intermédiaire oxazoline (Elbatrawy et al., 2020). L'ensemble de ces inhibiteurs, leurs structures ainsi que leurs caractéristiques sont résumées dans les tableaux ci-dessous.

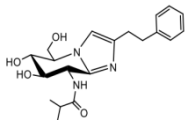
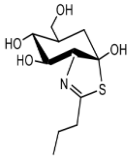
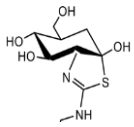
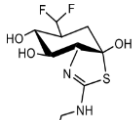
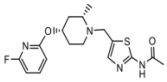
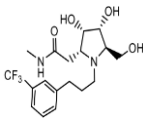
Tableau 1 : Les inhibiteurs de l'OGT. Tableau adapté de (Ma et al., 2021). IC_{50}: half-maximal inhibitory concentration; Kd: dissociation constant; EC_{50}: half maximal effective concentration

Inhibiteurs	**Nomenclatures**	**Structures**	**Caractéristiques**	**Références**
Analogue de l'uracile	Alloxane		Premier inhibiteur, faible spécificité, demi-vie courte, IC_{50} élevée (100 µM), utilisé en cellules et modèles animaux	(Konrad et al., 2002)
Analogues de l'UDP-GlcNAc	BADGP (benzyl-2-acetamido-2-deoxy-α-D-galactopyrano--side)		Faible IC_{50} (11 µM) mais aspécifique, peut cibler des enzymes de glycosylation complexe	(Kang et al., 2008)
	Ac_4-5S-GlcNAc (2-acetamido-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoxy-5-thio-α-D-glucopyranose)		Faible IC_{50} (5 µM), lipophile, désacétylé puis phosphorylé en 5S-GlcNAc-6-P qui représente sa forme active	(Gloster et al., 2011)
	5S-GlcNHex (2-deoxy-2-N-hexanamide-5-thio-D-glucopyranose)		Au vu de sa lipophilie et hydrophilie équilibrées (amphiphilie), il est très pratique notamment pour son utilisation chez les animaux	(Liu et al., 2018)
	Ac_4-ES1		Sa forme active est l'UDP-ES1 Inhibiteur spécifique et irréversible	(Gross et al., 2005)
	ST045849		IC_{50} élevée (53 µM), non spécifique	(Gross et al., 2005)
	BZX1 (benzoxazolinone-1)		IC_{50} (10 µM), inhibiteur irréversible	(Jiang et al., 2011)

Petites molécules inhibitrices	BZX2 (benzoxazolinone-2)		IC_{50} (<10 µM), inhibiteur irréversible	(Jiang et al., 2011)
	OSMI-1 (OGT small molecule inhibitor-1)		IC_{50} (2,5 µM), pas d'altération de glycosylation complexe, inhibition partielle due à sa faible solubilité aqueuse	(Ortiz-Meoz et al., 2015)
	OSMI-2 (OGT small molecule inhibitor-2)		Kd (140 nM) pour sa forme active désacétylée	(Itkonen et al., 2019)
Petites molécules inhibitrices	OSMI-3 (OGT small molecule inhibitor-3)		Kd (5nM) pour sa forme active désacétylée	(Martin et al., 2018)
	OSMI-4 (OGT small molecule inhibitor-4)		EC_{50} (3 µM), Kd (8nM) pour sa forme active désacétylée. C'est l'un des inhibiteurs les plus puissants de l'OGT	(Martin et al., 2018)
	L01		IC_{50} (21,8 µM), inhibiteur spécifique	(Y. Liu, Ren, et al., 2017)

Tableau 2 : Les inhibiteurs de l'OGA. Tableau adapté de (Ma et al., 2021). Ki, inhibition constant

Inhibiteurs	Nomenclatures	Structures	Caractéristiques	Références
Analogues du GlcNAc	STZ (streptozotocine)		Ki (1,5 mM), manque de spécifité, utilisé en cellules et chez les animaux (diabétogène)	(Junod et al., 1967)
	PUGNAc		Ki (46 nM), EC_{50} (3 µM), manque de spécificité	(Haltiwanger et al., 1998)

	GlcNAcstatine		Ki (4,4 nM), EC_{50} (20 nM), très puissant, sélectivité modérée	(Dorfmueller et al., 2009)
Analogue de l'oxazoline	NButGT		Ki (230 nM), EC_{50} (8 nM), très puissant, sélectivité élevée, utilisé dans des cellules, instable en solution, utilisé dans des cellules	(Yuzwa et al., 2008)
	Thiamet-G		Ki (0,9 nM), IC_{50} (1,2 nM), EC_{50} (30 nM), très puissant, sélectivité élevée, passe la barrière hémato-encéphalique	(Yuzwa et al., 2008)
	MK-8719		Ki (7,9 nM), EC_{50} (52,7 nM), très puissant, sélectivité élevée, passe la barrière hémato-encéphalique, propriétés médicamenteuses, en essai clinique	(Selnick et al., 2019)
	LSN3316612		IC_{50} (1,9 nM), très puissant, sélectivité élevée, passe la barrière hémato-encéphalique, forme radioactive testée en imagerie TEP	(J.-H. Lee et al., 2020; Lu et al., 2020)
	W347		Ki (0,9 nM), très puissant, passe la barrière hémato-encéphalique	(Bergeron-Brlek et al., 2015)

Une autre approche pour caractériser le rôle de la *O*-GlcNAcylation consiste en l'utilisation des inhibiteurs des enzymes de la voie des hexosamines (**Fig. 9**). L'ensemble de ces inhibiteurs sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Les inhibiteurs des enzymes de la voie des hexosamines. Tableau adapté de (Ma et al., 2021).

Enzymes	Inhibiteurs	Structures	Caractéristiques	Références
GFAT	DON (6-diazo-5-oxo-L-norleucine)		Non spécifique, irréversible et largement utilisé en culture cellulaire et chez les animaux	(Marshall et al., 1991)
	Azasérine		Non spécifique, irréversible et largement utilisé en culture cellulaire	(Marshall et al., 1991)
	Composé 28 (RO0509347)		IC_{50} (1 µM), réversible	(Qian et al., 2011)
GlcNAcPM	FR054		Spécifique, fonctionne comme une prodrogue (désacétylé et phosphorylé *in vivo*)	(Ricciardiello et al., 2018)
UDP-GlcNAc-PPase	meUTP Analogue d'UTP		Elaboré à partir de l'UDP-GlcNAc-PP d'*Aspergillus fumigatus*	(Raimi et al., 2020)
	GAL-012		IC_{50} (30 µM), non spécifique, inhibe la famille UDP-hexose pyrophosphorylases	(Yang et al., 2020)

5. Homéostasie de la *O*-GlcNAcylation

Pour contrôler les fonctions physiologiques, les niveaux de *O*-GlcNAcylation doivent être maintenues à l'état homéostatique, autrement dit à l'état d'équilibre quels que soient les changements d'environnement extérieur. D'après la littérature, cette homéostasie est en partie maintenue grâce à la modulation compensatoire de l'expression des enzymes la régulant. Des études ont montré que l'expression de l'OGT et de l'OGA est sensible aux fluctuations des niveaux de *O*-GlcNAcylation cellulaire. Par exemple, l'inhibition pharmacologique de l'OGA induit une baisse des niveaux

protéiques d'OGT dans toute une variété de lignées cellulaires (Z. Zhang et al., 2014; Decourcelle et al., 2020). Inversement, l'inhibition de l'OGT régule à la baisse les niveaux protéiques d'OGA (Ortiz-Meoz et al., 2015).

Il a été rapporté que la régulation de l'OGA en réponse aux altérations des niveaux de *O*-GlcNAcylation se fait plus particulièrement au niveau transcriptionnel, en partie par modulation épigénétique notamment l'acétylation des histones (Lin et al., 2021). Lin et collaborateurs ont montré que la baisse d'OGA induite par le traitement au DON est réversée en présence d'inhibiteurs de HDAC (histones désacétylases). Ces résultats suggèrent que l'acétylation des histones peut collaborer avec les niveaux de *O*-GlcNAcylation pour réguler la transcription du gène codant l'OGA (Lin et al., 2021). Le promoteur de l'OGA est également sensible à l'expression de l'OGT comme l'illustre une analyse récente de la *O*-GlcNAcylation chez des patients présentant une déficience intellectuelle liée au chromosome X (XLID, x-linked intellectual disability) (Vaidyanathan et al., 2017). L'OGT et d'autres facteurs sembleraient former un complexe répressif au niveau de la région proximale du promoteur de l'OGA. Ceci maintiendrait les niveaux de *O*-GlcNAc à l'état d'équilibre, et ce, malgré la mutation faux-sens (759G>T) dans le domaine TPR de l'OGT chez les sujets XLID (Vaidyanathan et al., 2017). Il a également été montré dans des fibroblastes de souris et les cellules HEK293, que le facteur de transcription E2F1 régule négativement la transcription de l'OGT et de l'OGA en se liant directement sur leur promoteur respectif (Muthusamy et al., 2015). Ces auteurs ont montré que la surexpression de E2F1 réprime l'expression de ces enzymes, tandis que les souris déficientes en E2F1 augmentent leur expression (Muthusamy et al., 2015). Il a aussi été montré que la surexpression de l'OGA dans des hépatocytes primaires et les cellules embryonnaires humaines du rein HEK293 augmente les niveaux de transcrits de l'OGT en modulant le facteur de transcription C/EBP β (CCAAT/enhancer-binding protein β) (Qian et al., 2018). En effet l'OGA peut jouer le rôle de coactivateur en occupant directement le promoteur de l'OGT. A cela s'ajoute que le traitement des cellules non cancéreuses 293ATOA et cancéreuses HCT116 avec le Thiamet-G induit la rétention d'intron au niveau des transcrits de l'OGT régulant son expression en réponse aux variations des niveaux de *O*-GlcNAc (Park et al., 2017). Une étude ultérieure a ensuite montré que les niveaux de *O*-GlcNAc affectent l'épissage des introns retenus dans les transcrits d'OGT contrôlant à la baisse son expression (Tan et al., 2020).

Le maintien de l'homéostasie de *O*-GlcNAcylation se fait également en régulant l'OGT de manière post-transcriptionnelle. En effet, l'élévation de *O*-GlcNAcylation régule négativement le niveau protéique d'OGT en bloquant sa traduction. Lin et ses collègues ont montré que le KO du répresseur de traduction 4E-BP1 (eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E)-binding protein 1) restaure les niveaux d'OGT. Ces résultats soutiennent que 4E-BP1 contribue à la régulation négative de l'OGT en présence de niveaux élevés de *O*-GlcNAc (Lin et al., 2021). Il a aussi été montré que l'OGT est régulée

positivement par la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR qui, en induisant le facteur de transcription c-Myc, promeut l'expression de la protéine de choc thermique Hsp90A qui se lie à l'OGT et la protège de la dégradation protéasomale (Sodi et al., 2015). Autre chose, l'association de l'OGT ou de l'OGA avec d'autres protéines telles que le complexe répresseur GATA-FOG-1-Mi2 β permet leur recrutement vers les promoteurs des protéines cibles (Whisenhunt et al., 2006; Slawson et al., 2008; Groussaud et al., 2017). Par exemple, ces enzymes sont ciblées au *Mid-body* en complexe avec la kinase Aurora B et la protéine PP1 (protéine phosphatase 1). La surexpression de l'OGT ou de l'OGA liée à une perturbation de l'homéostasie de la *O*-GlcNAcylation entraine alors des défauts de cytokinèse (Slawson et al., 2008).

6. Fonctions biologiques régulées par *O*-GlcNAcylation

La *O*-GlcNAcylation participe à de multiples fonctions cellulaires fondamentales telles que la transcription, la traduction, la localisation et la stabilité des protéines *via* notamment la dégradation protéasomale, le remodelage de la chromatine, l'activité mitochondriale, le métabolisme, la sensibilité à l'insuline, la réponse au stress, la signalisation, le trafic, le cycle et la survie cellulaire, l'apoptose et le développement. Un large aperçu des fonctions associées à la *O*-GlcNAcylation est résumée en **Figure 18**.

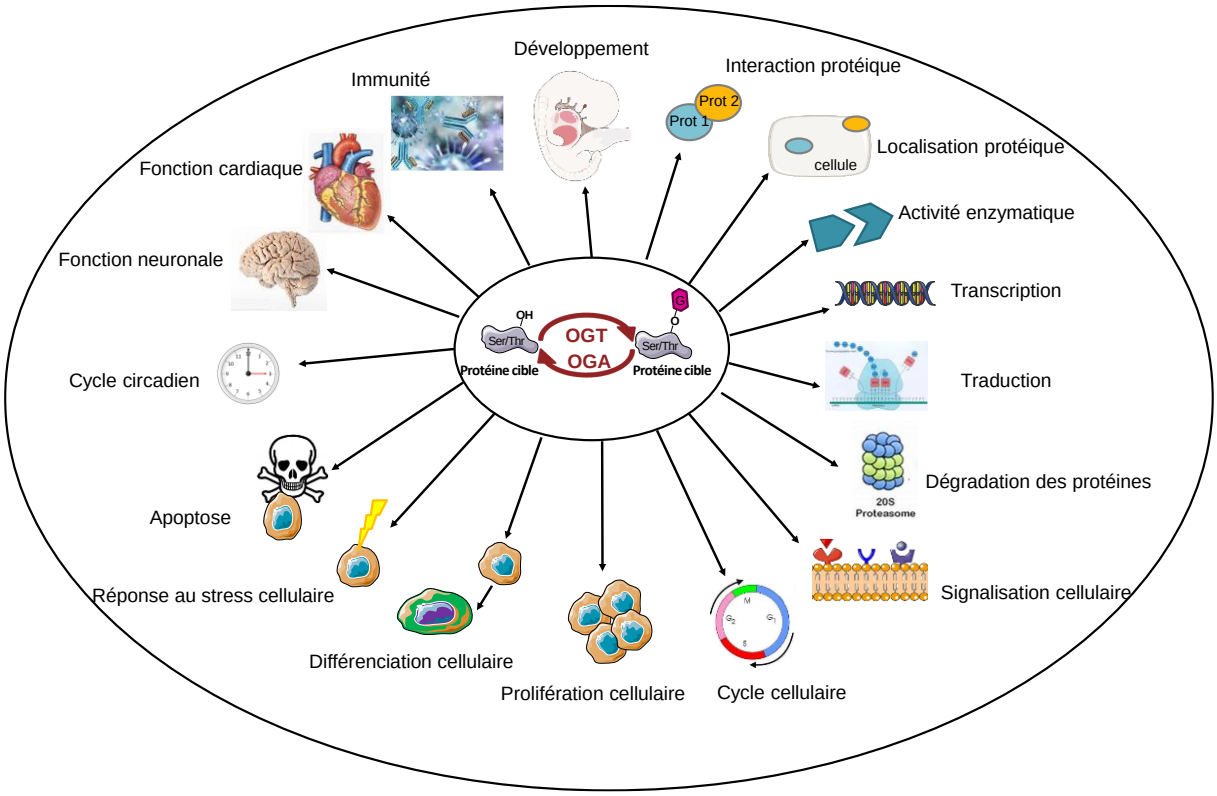


Figure 18 : Les principales fonctions cellulaires régulées par *O*-GlcNAcylation. Voir texte pour les détails.

6.1. Senseur de stress et survie cellulaire

Il a été observé que les cellules augmentent leurs niveaux de *O*-GlcNAcylation et d'OGT en réponse à divers types de stress ou de blessures, parmi lesquels le choc thermique, les stress oxydatif, à l'éthanol, génotoxique, réducteur et du RE, l'hypoxie, l'épuisement en ATP, la lésion d'ischémie ou encore l'hémorragie traumatique. La *O*-GlcNAcylation favorise la survie cellulaire en concourant à la réponse au stress en participant à la remise en conformation des protéines et en régulant le métabolisme cellulaire tel que l'activation de la glycolyse *via* la transcription de HIF1α et l'expression d'un de ses gènes cibles, GLUT1 (Guinez et al., 2007; Groves et al., 2013; Bond and Hanover, 2015).

Les protéines cytosoliques mal conformées ou malmenées pendant le stress exposent leurs régions hydrophobes pour induire des agrégats toxiques et résistants à la dégradation. La *O*-GlcNAcylation protège les cellules de cette toxicité en modifiant ces protéines et en augmentant l'expression de plusieurs protéines chaperonnes telles que les protéines de choc thermique Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp72 ou encore Hsp10 (Guinez et al., 2007; Kazemi et al., 2010). Ces Hsps sont régulées par deux facteurs de transcription : HSF1 (heat shock factor 1) et Sp1 (specificity protein 1). Il a été montré que l'OGT induit l'expression de Hsps en favorisant la phosphorylation de la Ser9 de la kinase GSK3-β, l'inactivant : la phosphorylation inhibitrice sur la Ser303 de HSF-1 ne peut de ce fait plus opérer (Kazemi et al., 2010). Aussi, grâce à leur propriétés lectiniques, il a été proposé que les Hsps interagissent avec les protéines mal conformées, facilitant leur remise en conformation tout en bloquant leur dégradation protéasomale (Guinez et al., 2004; Guinez et al., 2007) (**Fig. 19**).

A cela, s'joute que l'accumulation des protéines mal conformées dans le RE au cours du stress cellulaire, régule positivement l'expression des gènes de la voie des hexosamines *via* le facteur de transcription Xbp1s (transcription factor spliced X-box binding protein 1), augmentant ainsi la *O*-GlcNAcylation (Wang et al., 2014) (**Fig. 19**). Cette accumulation de protéines mal conformées dans le RE entrainent l'activation d'une réponse UPR (unfolded protein response) à partir de protéines transmembranaires, notamment PERK (PKR-like ER protein kinase) (Harding et al., 1999). PERK phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2α (eukaryotic initiation factor 2 α) sur la Ser51 et empêche la synthèse protéique globale exceptée celle de certains ARNm impliqués dans la réponse UPR, c'est le cas de la protéine pro-apoptotique CHOP (C/EBP homologous protein) (Harding et al., 1999; Harding et al., 2000). Il a été montré que la *O*-GlcNAcylation de eIF2α sur les résidus Ser219, Thr239 et Thr241 empêche sa phosphorylation par PERK et, par conséquent, l'inactivation de CHOP, réduisant l'apoptose (Jang et al., 2015). De plus, la *O*-GlcNAcylation de HIF1α activé en réponse au stress du RE induit par une privation en glucose, le stabilise en réduisant sa dégradation protéasomale

(Ferrer et al., 2014) (**Fig. 19**). Enfin, la *O*-GlcNAcylation réduit le stress du RE en formant des granules de stress qui régulent la traduction et la dégradation des ARNm (Ohn et al., 2008).

L'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation par la glucosamine réduit le stress oxydatif et l'apoptose induits en réponse à une insuffisance rénale aigüe (Hu et al., 2018). Il a été montré que la surexpression de l'OGA dans des cardiomyocytes augmente le niveau d'espèces réactives de l'oxygène, ROS (reactive oxygen species) (Ngoh et al., 2011). Les auteurs ont montré que le mécanisme par lequel la *O*-GlcNAcylation inhibe la production de ROS passe par la surexpression des anti-oxydases qui affectent l'activité du facteur de transcription FoxO1 et du co-activateur transcriptionnel PGC-1 α (Chen et al., 2018). En revanche, la *O*-GlcNAcylation favorise la production de ROS dans un modèle d'hyperglycémie ou de toxicité au glucose par l'activation de la protéine p38MAPK (Goldberg et al., 2011). Par conséquent, le mécanisme moléculaire de régulation du stress oxydatif par *O*-GlcNAcylation nécessite des études plus approfondies.

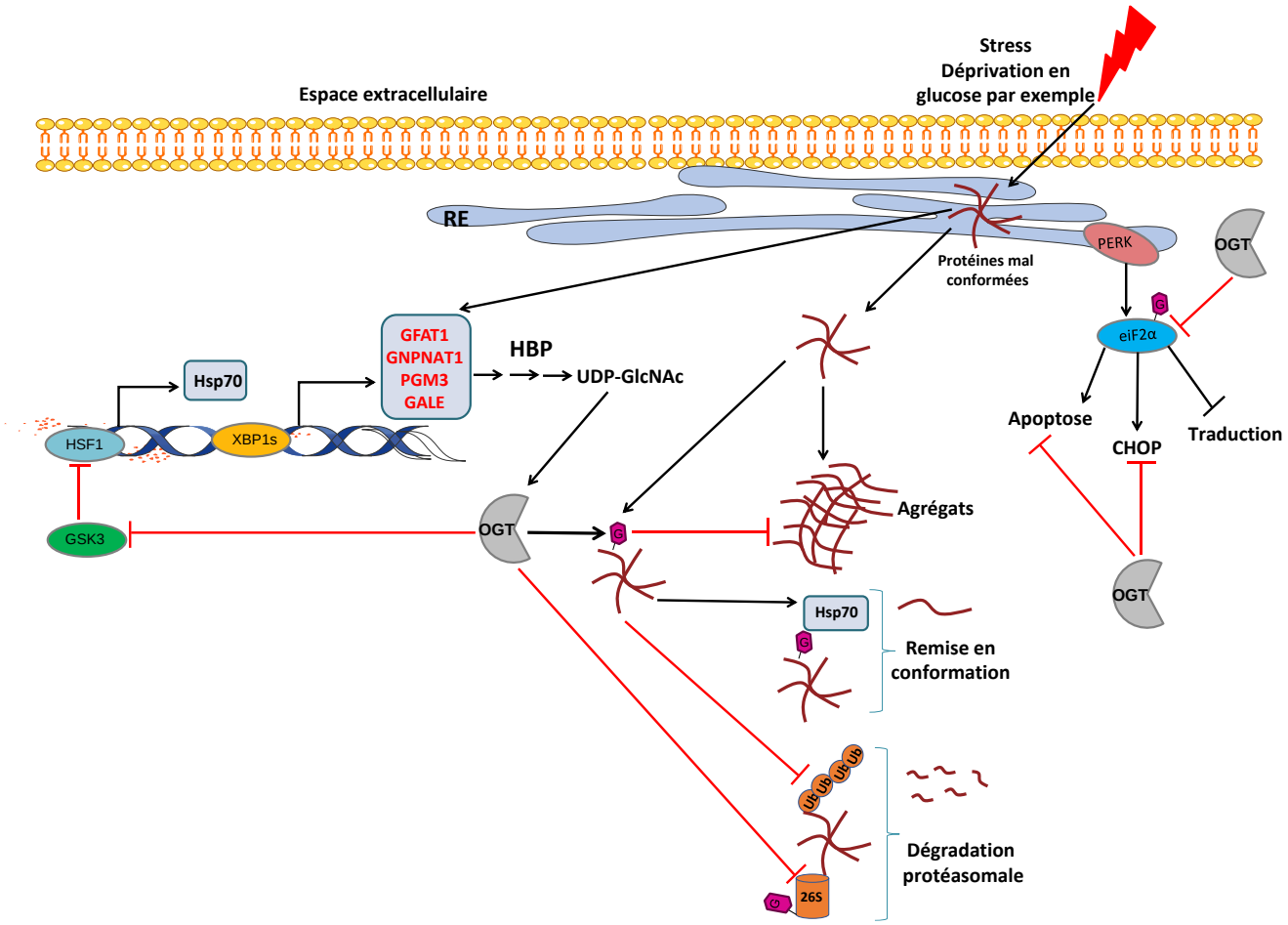


Figure 19 : Régulation de la réponse au stress par *O*-GlcNAcylation. L'accumulation des protéines mal conformées dans le RE au cours du stress cellulaire régule positivement l'expression des gènes de la voie des hexosamines en activant le facteur de transcription Xbp1s. L'augmentation d'UDP-GlcNAc favorise la *O*-GlcNAcylation de manière aspécifique des protéines mal conformées ce qui réduit leur agrégation et leur

dégradation protéasomale, et facilite leur repliement grâce à des protéines chaperonnes activées par l'OGT. En parallèle, la *O*-GlcNAcylation d'eIF2α favorise la survie cellulaire en diminuant le stress du RE et en inhibant l'apoptose.

6.2. Régulation transcriptionnelle et épigénétique

Les cellules régulent l'expression génique en fonction de leur statut nutritionnel et métabolique. Des études ont montré que la *O*-GlcNAcylation intervient dans presque toutes les étapes de la transcription (Wang et al., 1998; Issad and Kuo, 2008; Hardivillé and Hart, 2014; Lewis and Hanover, 2014). En effet, la plupart des facteurs de transcription associés à l'ARN polymérase II sont *O*-GlcNAcylés, généralement sur plusieurs sites : les fonctions de la MPT dépendent à la fois du facteur de transcription modifié et de la position du site (Han and Kudlow, 1997; Gao, J.-I. Miyazaki, et al., 2003; Guinez et al., 2011b). L'un des facteurs clés est la protéine TBP (TATA binding protein) qui se lie à la sous unité BTAF1 (B-TFIID TATA-Box binding protein associated factor 1) pour former le complexe d'initiation de la transcription TFIID (**Fig. 20A**). Il a été montré que TBP est *O*-GlcNAcylée sur la Thr114 ce qui réduit son interaction avec BTAF1, la stabilisant au niveau des promoteurs et modifiant par conséquant l'expression de nombreuse enzymes métaboliques (Hardivillé et al., 2020). Il a également été montré que la formation du complexe de pré-initiation de la transcription nécessite la *O*-GlcNAcylation du domaine CTD (C-terminal domain) de l'ARN polymérase II (Ranuncolo et al., 2012; Lewis et al., 2016). De plus, l'OGA joue un rôle de facteur d'élongation de la transcription puisqu'elle favorise la phosphorylation du domaine CTD de l'ARN polymérase II, cruciale pour cette étape (Resto et al., 2016) (**Fig. 20A**).

La *O*-GlcNAcylation peut affecter la translocation, la liaison à l'ADN, la transactivation et la stabilité des facteurs de transcription. Par exemple, l'activation des lymphocytes T et B passe par la *O*-GlcNAcylation de p65 qui réduit la liaison de NF-κB à son inhibiteur (IκBα) augmentant sa translocation nucléaire et son activité transcriptionnelle (Golks et al., 2007). De même, la *O*-GlcNAcylation bloque l'interaction de E2F-1 avec la protéine de séquestration pRb (Wells et al., 2011). Elle augmente également la transcription de c-Myc (D.H. Lee et al., 2020) et de p53 (W.H. Yang et al., 2006) en réduisant sa dégradation protéasomale, et favorise le transport nucléaire de NeuroD1 (neurogenic differenciation 1) (Andrali et al., 2007) et de Sp1 (Dauphinee et al., 2005). Dans les hépatocytes, la *O*-GlcNAcylation de CRTC2 (CREB regulated transcription coactivator 2), FoxO1 et PGC-1a module l'expression des gènes de la gluconéogenèse (Dentin et al., 2008; Housley et al., 2008; Ruan et al., 2012).

La *O*-GlcNAcylation joue une part importante dans la topologie de la chromatine et l'expression génique, et même, fait-elle partie du code des histones (Sakabe et al., 2010). Initialement, il a été montré que l'OGT interagit avec le complexe corépresseur Sin3a/histone désacétylase (Yang et al.,

2002). Plus tard il a été montré que l'OGT interagit avec tout un ensemble de protéines impliquées dans la modification des histones et la méthylation de l'ADN (Dehennaut et al., 2014; Lewis and Hanover, 2014). C'est le cas de HCF-1 qui, après interaction avec l'OGT, forme un complexe avec BAP1 (protéine 1 associée au BRCA (breast cancer gene)), un composant du complexe répresseur de la déubiquitinase OR-DUB du groupe Polycomb qui promeut la déubiquitination de l'histone H2A et l'expression des gènes HOX (homeobox) chez la *drosophile* (Scheuermann et al., 2010). L'OGT est impliquée dans la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3) en stabilisant EZH2, la sous-unité catalytique du complexe PRC2 (complexe répresseur polycomb 2), responsable du dépôt de la marque épigénétique répressive H3K27me3 (Chu et al., 2014). Il a également été montré que l'OGT forme un complexe avec les protéines TET (ten-eleven-translocation), responsables de la déméthylation de l'ADN en catalysant la conversion de 5mC (5-méthylCytosine) en 5hmC (5-hydroxyméthylCytosine) (Q. Zhang et al., 2014). Certaines études suggèrent que les protéines TET facilitent le recrutement de l'OGT vers la chromatine pour augmenter la *O*-GlcNAcylation des histones (Vella et al., 2013), alors que d'autres auteurs suggèrent que l'OGT *O*-GlcNAcyle directement les protéines TET pour moduler leur stabilité ou leur localisation nucléaire (Q. Zhang et al., 2014). TET2 et TET3 interagissent avec l'OGT pour l'adresser à la chromatine, et stabilisent le complexe SET1/Compass grâce à la *O*-GlcNAcylation de HCF-1, composant essentiel du complexe (Deplus et al., 2013). L'ensemble favorise la triméthylation de la lysine 4 (H3K4me3) et, par conséquent, la transcription (**Fig. 20C**) (Deplus et al., 2013).

6.3. Régulation de la traduction

Les mécanismes par lesquels la *O*-GlcNAcylation régule la traduction sont moins bien connus. Cependant, plusieurs études suggèrent que les nutriments régulent la synthèse des protéines *via* la *O*-GlcNAcylation. Comme énoncé plus haut, la *O*-GlcNAcylation de eIF2α le protège de la phosphorylation inhibitrice par PERK, initiant la traduction (**Fig. 20B**) (Jang et al., 2015). La *O*-GlcNAcylation de p67, protéine qui lie et protège eIF2α de la phosphorylation, augmente sa stabilité et par conséquent son activité (Datta et al., 2003).

Les extraits de réticulocytes de lapin, très utilisés pour étudier la traduction des protéines *in vitro*, présentent un niveau élevé de polypeptides naissants *O*-GlcNAcylés (Starr and Hanover, 1990). L'OGT et l'OGA sont associées aux ribosomes et une vingtaine de protéines du ribosome 80S sont *O*-GlcNAcylées (**Fig. 20B**) (Zeidan et al., 2010). Bien que le rôle de la MPT à ce niveau ne soit pas réellement connu, tout laisse à penser que la *O*-GlcNAcylation est nécessaire à la stabilisation de l'édifice ribosomal et à l'assistance du processus de synthèse protéique. Pour appuyer cette hypothèse, en plus d'être un événement post-traductionnel, la *O*-GlcNAcylation des protéines peut se

faire de manière co-traductionnelle (Zhu et al., 2020), la MPT concourait à la traduction en accompagnant le repliement correct de la chaîne polypeptidique en cours de synthèse.

La *O*-GlcNAcylation régule la dégradation protéasomale des protéines soit en modulant leur ubiquitinylation, processus clé de dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome, ou en régulant directement l'activité du protéasome 26S. La *O*-GlcNAcylation contrôle l'ubiquitinylation des protéines en modifiant leur interaction avec les ubiquitines ligases E3 (Dehennaut et al., 2014) et les déubiquitinases (Scheuermann et al., 2010). Par ailleurs, l'OGT inhibe le protéasome 26S et l'OGA l'active (Zhang et al., 2003).

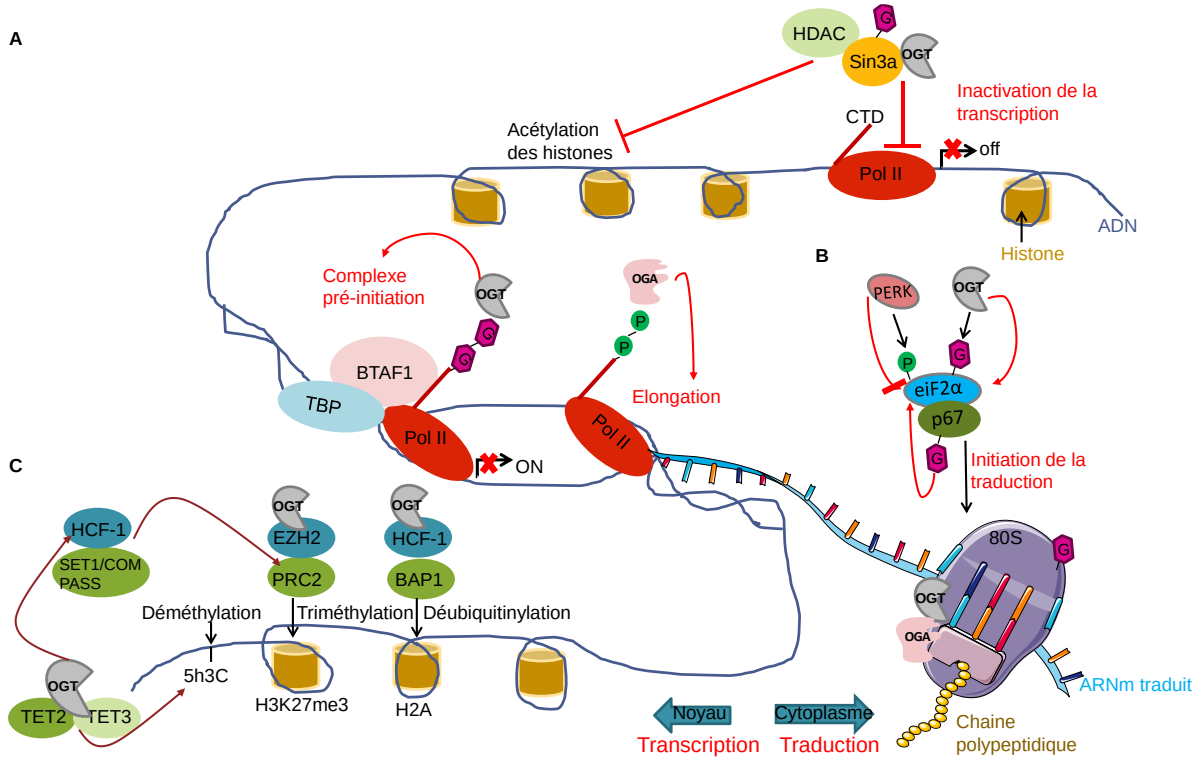


Figure 20 : Régulation de la transcription, de la traduction et des événements épigénétiques par *O*-GlcNAcylation. (**A**) l'OGT interagit avec le complexe corépresseur Sin3a/HDAC bloquant la transcription. La *O*-GlcNAcylation de l'ARN polymérase II sur son domaine C-ter (CTD) et la formation du complexe TBP/BTAF1 initie la transcription et l'OGA, en favorisant la phosphorylation de l'ARN polymérase II sur son domaine CTD, promeut l'élongation. (**B**) Une fois dans le cytoplasme, l'ARNm est traduit en protéine. L'initiation de la traduction se fait grâce à la *O*-GlcNAcylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2α. Le ribosome 80S est également *O*-GlcNAcylé. (**C**) l'OGT joue plusieurs rôles dans la régulation épigénétique. Le complexe OGT/HCF-1/BAP1 permet la déubiquitination de l'histone H2A. L'OGT stabilise également EZH2, un composant du complexe Polycomb PRC2, favorisant la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 qui représente une marque épigénétique répressive (H327Kme3). De plus, l'OGT forme un complexe avec les protéines TET promouvant la déméthylation de l'ADN et/ou stabilisant le complexe SET1/Compass en *O*-GlcNAcylant HCF-1, ce qui favorise la triméthylation de la lysine 4 (H3K27me3).

6.4. Régulation de la signalisation cellulaire

La *O*-GlcNAcylation est un régulateur clé de plusieurs voies de signalisation cellulaire. L'exemple le mieux étudié est la signalisation de l'insuline *via* l'activation de la voie PI3K/AKT. Il a été initialement montré que des niveaux élevés de *O*-GlcNAcylation dans des adipocytes en culture bloquent la phosphorylation de la protéine kinase AKT essentielle à la survie et au métabolisme cellulaire (Vosseller et al., 2002). Conformément à cette étude, la surexpression de l'OGA dans les cellules d'hépatocarcinome HepG2 diminue la *O*-GlcNAcylation d'AKT corrélée à une augmentation de sa phosphorylation sur les résidus Thr308 et Ser473 (Soesanto et al., 2008).

Lors de la stimulation par l'insuline, PI3K catalyse la production de PIP3 à partir de PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate), qui recrute PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) et AKT au niveau de la membrane plasmique. PDK1 phosphoryle et active AKT qui, en retour, phosphoryle et active plusieurs substrats notamment GSK-3β et FoxO1 (Bridges and Saltiel, 2015). Comme décrit précédemment, en réponse à l'insuline, l'OGT est également recrutée à la membrane plasmique, plus particulièrement, au niveau des lipides rafts et interagit avec PIP3 *via* son domaine PPO. Cette relocalisation membranaire induit la *O*-GlcNAcylation et inactivation de plusieurs composants de la voie de signalisation de l'insuline tels que IRS (insulin receptor substrate), AKT, GSK-3β et FoxO1 (Yang et al., 2008; Perez-Cervera et al., 2013). Cette *O*-GlcNAcylation conduit à l'atténuation de la transduction du signal et à la mise en place du phénomène de résistance à l'insuline (Yang et al., 2008; Whelan et al., 2010) (**Fig. 21A**). Magré cela, il a été montré que la stimulation des cellules cancéreuses mammaires MCF7 par le sérum augmente les niveaux d'OGT et l'activation de la voie PI3K/AKT (Olivier-Van Stichelen et al., 2012). Le KD de l'OGT ou son inhibition par l' Ac_4-5S-GlcNAc bloque l'expression de la cycline D1, diminue l'activation de la voie PI3K/AKT et réduit la prolifération des cellules MCF7 (Olivier-Van Stichelen et al., 2012). L'ensemble de ces observations indique que l'OGT jouerait un double rôle dans le contrôle de la voie PI3K/AKT en l'activant dans un premier temps en ciblant plusieurs de ses composants puis, dans un second temps, en l'inactivant par blocage de certains sites de phosphorylation activateurs.

Une autre voie de signalisation régulée par *O*-GlcNAcylation est la voie RAS/MAPK impliquée dans la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire, ainsi que l'angiogenèse. Son activation est opérée par une cascade de phosphorylations où la protéine RAS associée à la membrane active la protéine RAF-1 responsable de l'activation, par phosphorylation, de MAPK-kinase ou MEK. A son tour, MEK active ERK, ce qui entraine sa translocation nucléaire et l'activation de ses gènes cibles (Lièvre and Laurent-Puig, 2010) (**Fig. 21B**). Il a été montré que la délétion de l'OGT réduit la phosphorylation de ERK1/2, alors que l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation promeut leur

phosphorylation et activation (Jiang et al., 2016). De plus et comme décrit précédemment, Goldberg et collaborateurs ont montré dans un modèle d'hyperglycémie que la *O*-GlcNAcylation favorise l'activation de p38MAPK, en réduisant l'action inhibitrice de AKT, ce qui augmente son activité (Goldberg et al., 2011) (**Fig. 21B**).

Il a été montré que le facteur de transcription STAT5 impliqué dans la voie de transduction du signal JAK-STAT est *O*-GlcNAcylé sur la Thr92, prérequis à son interaction avec le coactivateur transcriptionnel CBP et à l'activation de la transcription (Gewinner et al., 2004).

Enfin, le facteur de transcription NF-κB est impliqué dans la réponse immunitaire, l'inflammation, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Dans le cytoplasme, le dimère NF-κB, formé des deux sous-unités p50 et p65, est maintenu sous sa forme inactive par son interaction avec l'inhibiteur IκBα (inhibitory κB α). En réponse à la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires, des LPS et des agents génotoxiques, le complexe IKK (inhibitory kappa B kinase), constitué des kinases IkKα et IkKβ, phosphoryle IκBα sur les résidus Ser32 et Ser36 ce qui l'adresse au protéasome, libère NF-κB qui migre au noyau où il active ses gènes cibles (Hayden and Ghosh, 2004). Il a été montré que la *O*-GlcNAcylation de la sous-unité p65 active la voie de signalisation NF-κB en réduisant sa liaison avec IκBα et en favorisant la phosphorylation et la dégradation de ce dernier (Golks et al., 2007). En revanche, la fixation de NF-κB sur le récepteur des glucocorticoïdes active le recrutement de l'OGT et l'inactivation de la voie NF-κB (M.-D. Li et al., 2012) (**Fig. 21C**).

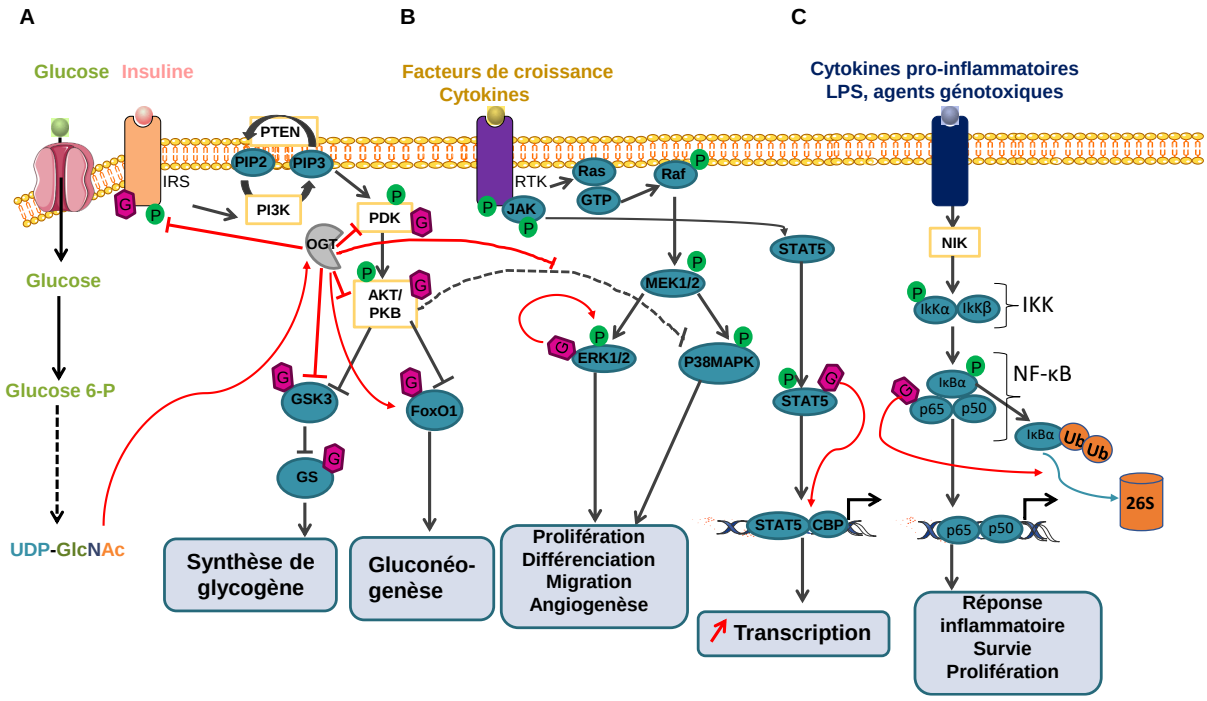


Figure 21 : Régulation de la signalisation cellulaire par *O*-GlcNAcylation. Après fixation sur son récepteur, l'insuline active une cascade de phosphorylations qui active la synthèse de glycogène et inhibe la

néoglucogenèse. La synthèse de PIP3 en réponse à l'insuline permet de retransloquer l'OGT à la membrane plasmique, ayant pour effet de *O*-GlcNAcyler et d'inhiber des composants de la voie de signalisation et serait, de fait, responsable en partie du phénomène de résistance à l'insuline. La *O*-GlcNAcylation de ERK1/2 favorise leur phosphorylation activatrice. La *O*-GlcNAcylation active également p38MAPK en restreignant l'action inhibitrice d'AKT sur cette kinase. Il a aussi été montré que la *O*-GlcNAcylation du facteur de transcription STAT5 induit sa translocation nucléaire et sa liaison avec le coactivateur transcriptionnel CBP. Enfin, la *O*-GlcNAcylation de NF-κB empêche son inhibition par IκBα augmentant son activité.

6.5. Développement embryonnaire

Il a initialement été montré que le KO du gène de l'OGT est létal pour les cellules embryonnaires avant même leur implantation dans l'utérus (Shafi et al., 2000). L'hyperglycémie perturbe la formation du blastocyte chez la souris alors que l'inhibition de l'OGT prévient les complications engendrées (Pantaleon et al., 2010). En outre, le KO du gène de l'OGA induit la mort périnatale des souris (Yang et al., 2012a). La perturbation de la dynamique de la *O*-GlcNAcylation au cours du développement du poisson-zèbre réduit considérablement la taille de l'animal et entraine une désorganisation de l'ectoderme, du mésoderme et de l'endoderme (Webster et al., 2009). A cela, nous pouvons ajouter que des niveaux élevés de *O*-GlcNAc, d'UDP-GlcNAc et d'OGT ont été observés dans les ovocytes de xénope lors des premiers stades de l'ovogenèse (Dehennaut et al., 2009). Dans la même étude, les auteurs ont retrouvé le même phénomène au cours de la segmentation embryonnaire (Dehennaut et al., 2009). Enfin et de manière intéressante, l'OGT placentaire a été identifiée comme biomarqueur du stress maternel et de la reprogrammation des gènes du système nerveux central en cours de développement (Howerton et al., 2013). Dans une autre étude, il a été montré qu'une réduction partielle de l'OGT placentaire réduit la prise de poids et l'intolérance à l'insuline chez la descendance en comparaison des souris contrôles (Moore et al., 2021). (**Fig. 22**). Ces résultats renforcent le rôle de l'homéostasie de la *O*-GlcNAcylation pendant le développement embryonnaire.

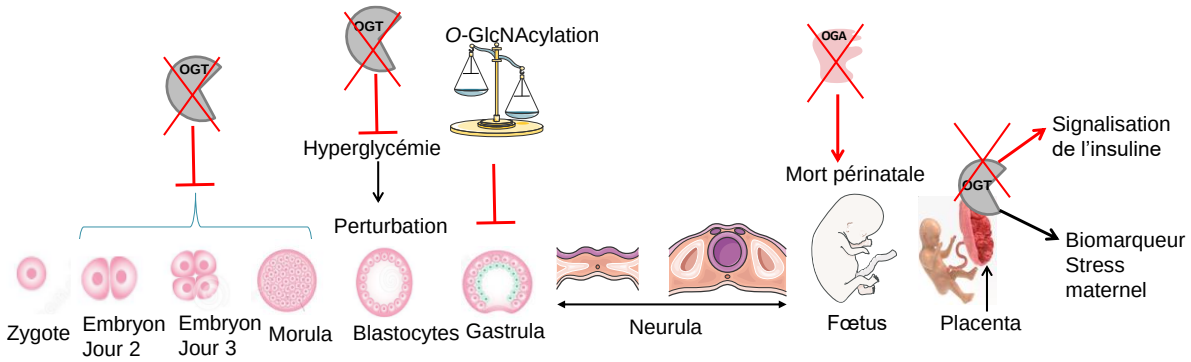


Figure 22 : Régulation du développement par *O*-GlcNAcylation. La *O*-GlcNAcylation est importante pour le développement embryonnaire. Le KO du gène la codant est létal pour les cellules embryonnaires avant leur implantation dans l'utérus. Elle joue un rôle dans pratiquement toutes les étapes du développement. L'OGT placentaire est un biomarqueur de stress maternel et joue un rôle dans le contrôle du métabolisme, notamment *via* la signalisation de l'insuline.

6.6. Neuroprotection

A l'exception des cellules endocrines pancréatiques, les niveaux de *O*-GlcNAcylation, d'OGT et d'OGA sont plus élevés dans le cerveau. Les fonctions de la *O*-GlcNAcylation dans le système nerveux comprennent la modulation du cycle circadien (Kim et al., 2012; Li et al., 2013; Liu et al., 2021), les fonctions synaptiques et la maturation neuronale (Lagerlöf et al., 2017), le développement neuronal (Liu et al., 2012), la neuroprotection (S. Liu et al., 2016), l'apprentissage et la mémoire (Tallent et al., 2009), l'apoptose neuronale (Shi et al., 2015) et la régulation de l'appétit (Lagerlöf et al., 2016). Une étude sur les neurones primaires de poulet a montré que la *O*-GlcNAcylation joue un rôle dans la ramification des axones (Francisco et al., 2009). Des niveaux élevés de *O*-GlcNAcylation inhibent la ramification axonale stimulée par l'AMPc, tandis que la surexpression de l'OGA augmente le nombre de neurones présentant une ramification axonale (Francisco et al., 2009). La *O*-GlcNAcylation joue également des fonctions importantes dans la plasticité synaptique. Dans le synaptosome, de nombreuses protéines sont modifiées par *O*-GlcNAcylation, telles que Bassoon et Piccolo, principalement impliquées dans la transmission synaptique (Vosseller et al., 2006). L'élévation des niveaux de *O*-GlcNAcylation par inhibition de l'OGA se traduit par la phosphorylation et l'activation de Erk1/2 et de CamKII, kinases impliquées dans la potentialisation à long terme, et l'augmentation de la plasticité synaptique de l'hippocampe en corrélation avec l'apprentissage et la mémoire (Tallent et al., 2009). Des niveaux élevés de *O*-GlcNAcylation augmentent la phosphorylation de la synapsine I/II sur la Ser9 (activation de PKA), les Ser62/67 (activation de la voie Erk1/2) et sur la Ser603 (activation de CaMKII), favorisant la formation de la vésicule synaptique au cours de la transmission synaptique (Tallent et al., 2009). Nous pouvons en conclure que l'OGT joue un rôle important dans les fonctions du système nerveux.

7. *O*-GlcNAcylation et pathologies

La dérégulation de la dynamique de la *O*-GlcNAcylation est impliquée dans une large variété de maladies telles que le diabète et ses complications, le cancer, les maladies neurodégénératives et cardiovasculaires pour lesquelles cette MPT interfère avec plusieurs mécanismes tels que le métabolisme, la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et les métastases (**Fig. 23**).

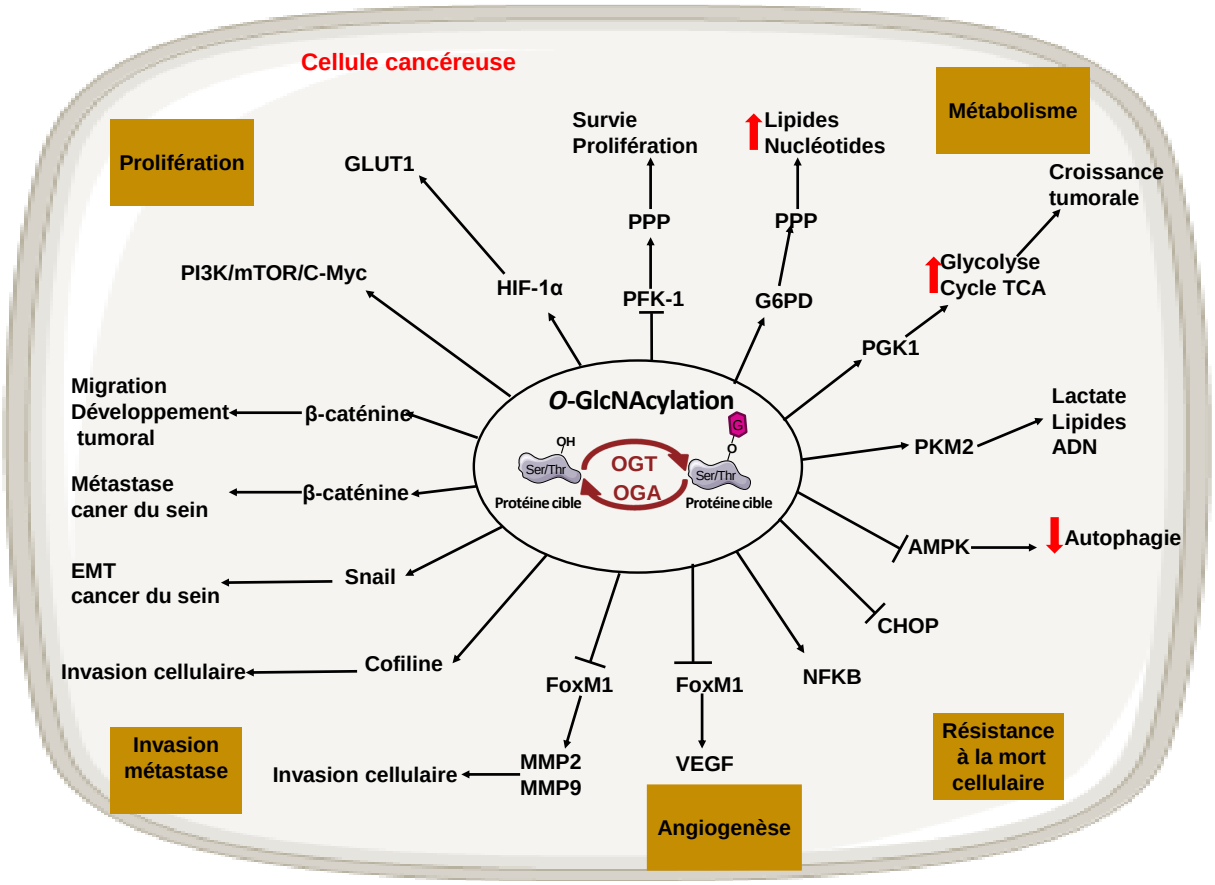


Figure 23 : La *O*-GlcNAcylation régule le phénotype cancéreux. L'OGT *via* la *O*-GlcNAcylation régule, directement ou indirectement, de nombreuses protéines dont la perte de contrôle mène au cancer.

7.1. Le diabète

Cliniquement, le diabète peut être classé en deux types : DT1 (diabète de type 1) et DT2 (diabète de type 2). DT1, également connu sous le nom de diabète insulino-dépendant se caractérise par une diminution ou une perte globale de la production d'insuline et affecte environ 5 à 10 % des patients diabétiques (Chetan et al., 2019). Quant au DT2, présent chez plus de 90 % des patients diabétiques, il est une cause majeure de mortalité dans le monde et son incidence ne fait qu'augmenter dans les pays industrialisés et en voie de développement. Une des caractéristiques majeures du DT2 est la résistance à l'insuline qui se définit comme l'incapacité de l'hormone à induire ses effets métaboliques dont le captage de glucose (Carpenter et al., 2019). La surexpression de l'OGT dans les tissus musculaires et adipeux entraine le phénotype de DT2, suggérant que la *O*-GlcNAcylation joue un rôle prépondérant dans la résistance à l'insuline (McClain et al., 2002). En outre, l'élévation de la *O*-GlcNAcylation par le PUGNAc ou la glucosamine augmente la résistance à l'insuline dans les adipocytes 3T3-L1 (Vosseller et al., 2002). Ceci se manifeste par l'inhibition d'effecteurs importants de la signalisation de l'insuline tels que AKT, GK, IRS1 et β-caténine (Vosseller et al., 2002). L'implication d'HBP dans le développement de

la résistance à l'insuline a été renforcée dans une autre étude menée sur des adipocytes primaires (Teo et al., 2010).

L'activité du gène de l'insuline dans les cellules β-pancréatiques est régulée par l'action synergique de deux facteurs de transcription : PDX1 (pancreatic and duodenal homeobox 1) et NeuroD1 (Peterson and Hart, 2016). Il a été montré dans les cellules β-pancréatiques Min6 (mouse-insulinoma-6) que des niveaux élevés de *O*-GlcNAcylation augmentent l'expression de l'insuline intracellulaire tout en empêchant sa sécrétion en réponse au glucose (Durning et al., 2016).

La localisation de NeuroD1 est régulée par *O*-GlcNAcylation : dans des conditions faibles en glucose, NeuroD1 est principalement dans le cytosol alors qu'un traitement avec un inhibiteur d'OGA induit sa *O*-GlcNAcylation et sa translocation dans le noyau, permettant l'expression de l'insuline (Andrali et al., 2007). Par ailleurs, deux sites de *O*-GlcNAcylation de PDX1 ont été identifiés dans les cellules β-pancréatiques Min6. L'élévation des concentrations en glucose augmente la *O*-GlcNAcylation de PDX1 améliorant son activité de liaison à l'ADN et l'expression de l'insuline (Gao, J. Miyazaki, et al., 2003). En revanche, plusieurs protéines clés de la voie de l'insuline sont inhibées par *O*-GlcNAcylation. C'est le cas des protéines IRS1 et IRS2, PDK1, PI3K et AKT (Teo et al., 2010). Il a été montré que l'élévation de la *O*-GlcNAcylation dans les cellules adipocytaires 3T3-L1 inhibe la phosphorylation de IRS1 sur Tyr608, ce qui réduit l'activation de la voie PI3K/AKT et par conséquent contribue au phénomène de résistance à l'insuline (Whelan et al., 2010). Comme décrit précédemment, en réponse à l'insuline, l'OGT est recrutée du noyau vers la membrane plasmique entrainant l'inhibition, par *O*-GlcNAcylation, de PDK1 et AKT et par voie de conséquence une atténuation de la voie de signalisation de l'insuline (Yang et al., 2008). L'inhibition d'AKT empêche la phosphorylation d'une de ses protéines cibles GSK3 sur la Ser9 (Vosseller et al., 2002). De même, la répression d'AKT induit une diminution d'absorption de glucose en raison d'un défaut de translocation membranaire de GLUT4 par le biais d'AS160 (AKT substrate of 160 kDa) (Teo et al., 2010). De même, l'hyperglycémie active la *O*-GlcNAcylation des facteurs de transcription FoxO1 (Housley et al., 2008), Sp1 (Jackson and Tjian, 1988), et CRTC2 (Dentin et al., 2008) régulant à la hausse l'expression des gènes impliqués dans la néoglucogenèse et conduisant à la glucotoxicité . Une autre étude a montré qu'un niveau élevé en glucose ou un traitement avec le PUGNAc augmente la *O*-GlcNAcylation de SP1 et induit l'expression de PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), contribuant aux complications diabétiques notamment la néphropathie et l'athérosclérose (Goldberg et al., 2000; Du et al., 2000). A cela s'ajoute que l'élévation prolongée de *O*-GlcNAcylation contribue à la mort par apoptose des cellules β-pancréatiques (Liu et al., 2000) (**Fig. 24**).

Enfin et pour rappel, les polymorphismes nucléotidiques du gène de l'OGA sont associés au DT2 chez les Mexicains (Lehman et al., 2005). De manière intéressante, puisque les niveaux de *O*-GlcNAcylation sont sensibles au glucose, des auteurs ont proposé que la *O*-GlcNAcylation des protéines érythrocytaires humaines servent de biomarqueur du stade prédiabète. La *O*-GlcNAcylation de certaines protéines érythrocytaires notamment la catalase, augmente significativement chez les patients prédiabétiques avant même l'élévation de leur taux de HbA1c (hémoglobine glyquée A1c), reflétant l'état glycémique de l'individu. En revanche, cette étude nécessite d'être validée sur un essai clinique plus large pour que la *O*-GlcNAcylation des protéines érythrocytaires puisse être utilisée comme outil de diagnostic dans la détection précoce du diabète (Wang et al., 2009; K. Park et al., 2010).

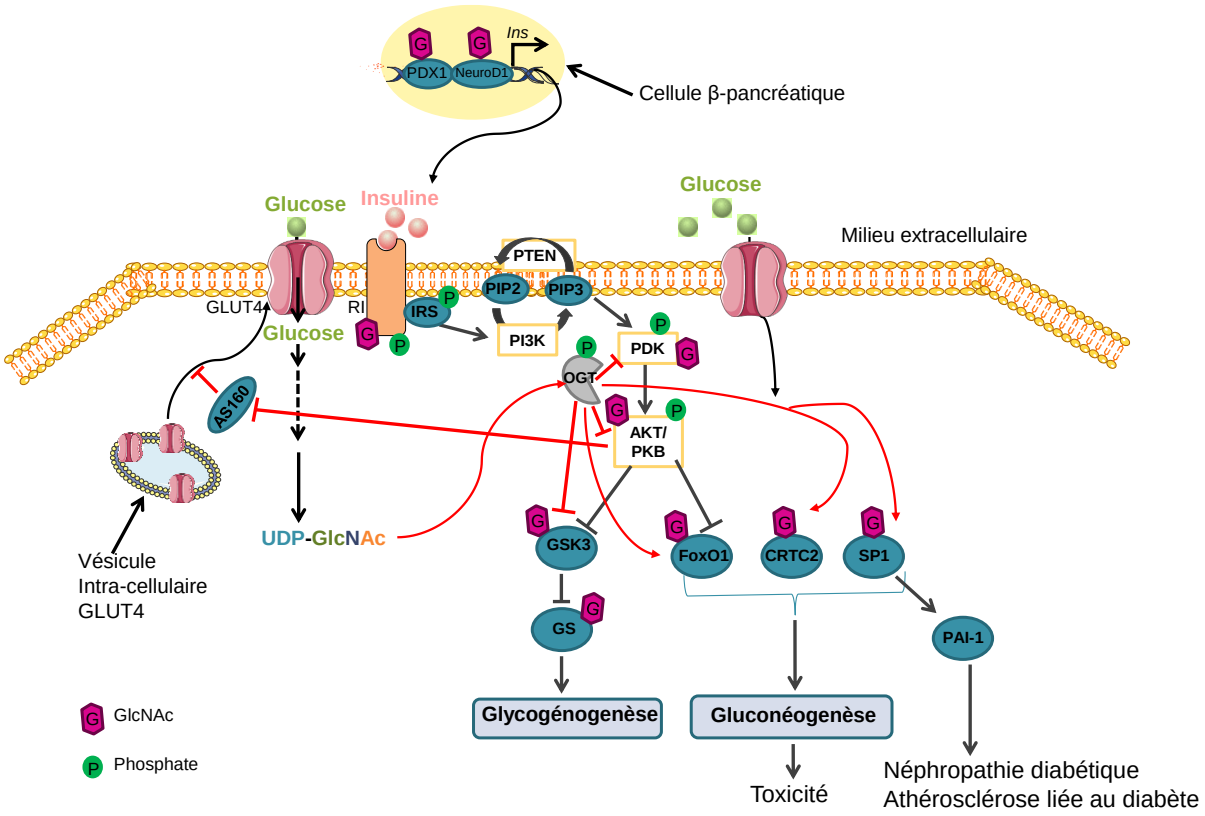


Figure 24 : Implication de la *O*-GlcNAcylation dans le diabète de Type 2. En réponse au glucose, la *O*-GlcNAcylation de NeuroD1 et PDX1 promeut la sécrétion d'insuline. Une fois lié à l'insuline, son récepteur s'autophosphoryle et catalyse la phosphorylation, sur des résidus de tyrosine, de la protéine IRS, qui active PI3K. A son tour, PI3K produit le PIP3 qui recrute PDK1 et AKT à la membrane plasmique où AKT est activée par PDK1. Une fois activée, AKT phosphoryle plusieurs substrats qui interviennent dans la signalisation de l'insuline notamment la synthèse du glycogène, l'absorption du glucose ou l'inhibition de la gluconéogenèse. En réponse à l'insuline, l'OGT est retransloquée à la membrane plasmique, interagit avec le PIP3 et atténue la signalisation de l'insuline.

7.2. Les maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont parmi les troubles les plus courants qui surviennent avec le vieillissement. Elles sont caractérisées par la perte progressive de la structure et la fonction des

neurones. Il a été montré qu'environ 40% des protéines neuronales et 19% des protéines du synaptosome sont *O*-GlcNAcylées (Wani, Chatham, et al., 2017), suggérant l'implication de la *O*-GlcNAcylation dans la neurodégénérescence. Cette idée est renforcée par le fait que les gènes codant l'OGT et l'OGA sont localisés sur des locus associés aux maladies de Parkinson (Graeber et al., 1992) et d'Alzheimer (Bertram et al., 2000), respectivement. Par ailleurs, le cerveau est gluco-dépendant et présente des niveaux élevés de ces enzymes (Gao et al., 2001).

La maladie d'Alzheimer se caractérise par des dépôts extracellulaires de plaques Aβ (amyloïdes β) et d'enchevêtrements neurofibrillaires NFTs (neurofibrillary tangles) intracellulaires formés d'agrégats de protéines Tau hyper-phosphorylées. Les plaques Aβ sont formées de fragments protéolytiques issus du clivage de la protéine précurseur amyloïde APP (amyloid precursor protein) par les β- et γ-sécrétases. En revanche, son clivage par l'α-sécrétase n'est pas amyloïdogène. En ce sens, il a été rapporté que la *O*-GlcNAcylation active l'α-sécrétase et inhibe la voie amyloïdogène, conduisant à une accumulation accrue du fragment soluble de la protéine APP (sAPP α) et empêchant la formation des plaques Aβ (Kim et al., 2013; Tan and Gleeson, 2019) (**Fig. 25A**). Au cours de la maladie, la protéine Tau qui, normalement s'associe aux microtubules et les protège, est hyper-phosphorylée perd son affinité pour les microtubules, et forme des agrégats NFTs, facteur clé dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Il a été initialement montré que l'induction d'hyperphosphorylation protéique par l'OA (okadaic acid), inhibiteur de phosphatase, dans les cellules neuronales induit une diminution des niveaux de *O*-GlcNAcylation (Lefebvre et al., 1999). De même, il a été montré que la surexpression de l'OGT dans les neurones augmente la *O*-GlcNAcylation de la protéine Tau avec une diminution concomitante de sa phosphorylation (Liu et al., 2004) (**Fig. 25A**). La délétion de l'OGT, par la stratégie *Cre-Lox*, dans le cerveau induit une hyper-phosphorylation de la protéine Tau préliminaire à la mort neuronale (O'Donnell et al., 2004). Ces résultats mettent en évidence l'importance de la *O*-GlcNAcylation dans la prévention de la maladie d'Alzheimer. Une corrélation existe entre DT2, le métabolisme du glucose et la maladie d'Alzheimer. Une autopsie pratiquée sur des cerveaux de patients Alzheimer a montré une diminution de la *O*-GlcNAcylation (Liu et al., 2004). Pour note, les personnes atteintes d'Alzheimer présentent un métabolisme du glucose plus faible au niveau cérébral (Alexander et al., 2002) et les diabétiques ont plus de risque de développer cette neuropathie (Gudala et al., 2013).

La maladie de Parkinson se caractérise par la mort des cellules neuronales dopaminergiques et par la présence d'agrégats de la protéine α-synucléine dans les corps de Lewy (Lin et al., 2019). Comme pour la protéine Tau, la *O*-GlcNAcylation réduit la phosphorylation de l'α-synucléine, son agrégation et par conséquent son effet toxique sur les neurones (Marotta et al., 2015) (**Fig. 25B**). Cependant, le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la maladie de Parkinson est beaucoup plus compliqué. En effet, des niveaux

plus élevés de *O*-GlcNAcylation ont été décrits dans des lysats de cortex temporal *post-mortem* de patients atteints de maladie de Parkinson par rapport aux sujets sains du même âge. De plus, le traitement de neurones corticaux primaires de rat avec un inhibiteur d'OGA, augmente la *O*-GlcNAcylation des protéines, l'activité de la voie mTOR, l'accumulation d'α-synucléine accompagnée d'une diminution du flux autophagique. En revanche, l'inhibition de mTOR par la rapamycine réverse l'effet de inhibiteur sur l'OGA (Wani, Ouyang, et al., 2017). Ces auteurs supposent qu'à des niveaux modérés, la *O*-GlcNAcylation est bénéfique en empêchant la formation d'agrégats d'α-synucléine. Au contraire, des niveaux élevés de *O*-GlcNAcylation pourraient être délétères (Wani, Ouyang, et al., 2017) (**Fig. 25B**). Une étude ultérieure a montré que l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation avec le Thiamet-G améliore la survie et les fonctions des neurones dopaminergiques et protège les souris de la maladie de Parkinson (B.E. Lee et al., 2020).

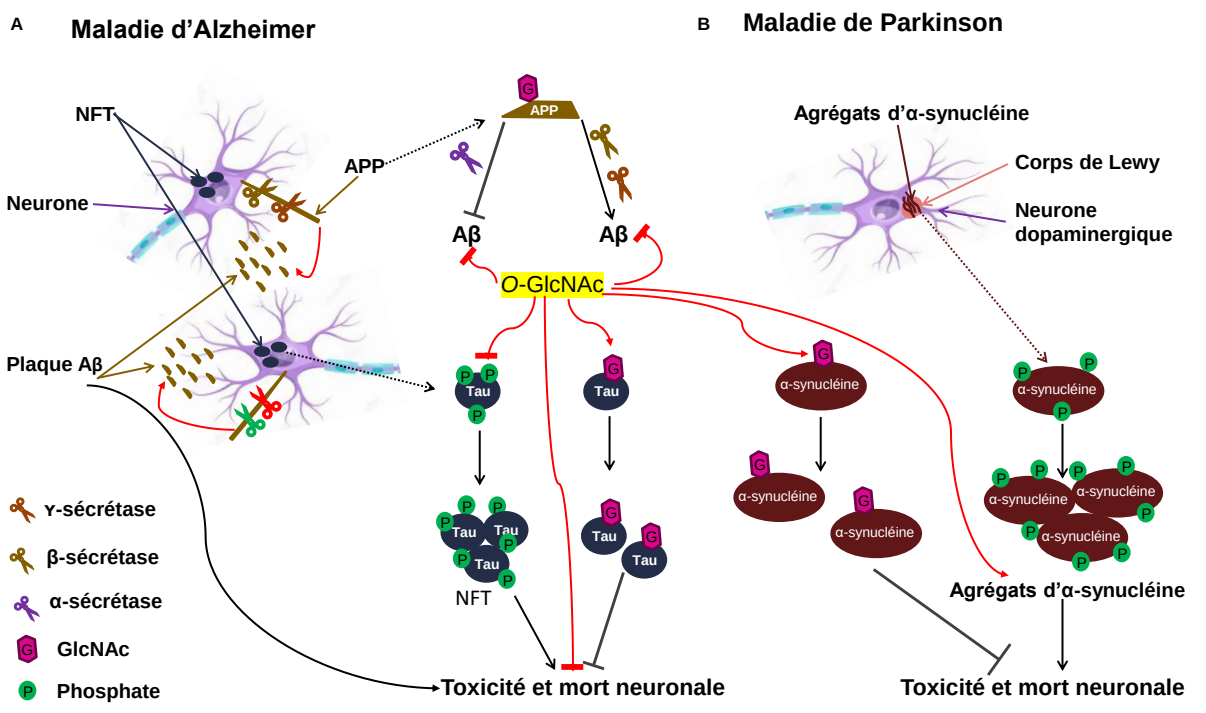


Figure 25 : Implication de la *O*-GlcNAcylation dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. (A) la protéine précurseur amyloïde (APP) peut être clivée par l'α-sécrétase ou les β- et γ- sécrétases. La voie α-sécrétase n'est pas amyloïdogène et clive APP en fragments solubles. En revanche, le clivage d'APP par β- et γ- sécrétases génère des plaques amyloïdes Aβ qui s'accumulent dans l'espace extracellulaire et interfèrent avec les fonctions neuronales conduisant à la mort neuronale. L'augmentation de la *O*-GlcNAcylation améliore la voie non amyloïdogène et réduit la voie amyloïdogène, offrant une certaine neuroprotection. Cette neuroprotection est assurée grâce à la *O*-GlcNAcylation de la protéine Tau, qui forme des agrégats NFT intracellulaires sous sa forme hyper-phosphorylée. **(B)** La *O*-GlcNAcylation de l'α-synucléine diminue son agrégation, protégeant ainsi les neurones dopaminergiques de la maladie de Parkinson.

7.3. Les maladies cardiovasculaires

Le système cardiovasculaire est particulièrement sensible aux changements métaboliques. Une pression artérielle, une glycémie et un taux de lipides élevés ainsi que l'obésité et le diabète sont les principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Des études ont montré que la *O*-GlcNAcylation participe à la physiopathologie des maladies cardiovasculaires. Il a initialement été montré que la glucosamine protège les myocytes ventriculaires de rats néonataux (NRVMs) contre les lésions d'I/R (ischémie/reperfusion) aigüe (Champattanachai et al., 2007). Le traitement par l'alloxane ou l'azasérine, réduit significativement le niveau de *O*-GlcNAcylation et bloque l'effet protecteur de la glycosylation (Champattanachai et al., 2007). L'élévation de la *O*-GlcNAcylation par le PUGNAc augmente la viabilité cellulaire, et réduit l'apoptose et le stress oxydatif en réponse à l'I/R (**Fig. 26A**) (Ngoh et al., 2009). En plus des expériences *in vitro*, il a été rapporté que lorsque des cœurs de souris étaient soumis à des conditions ischémiques, l'augmentation de la *O*-GlcNAcylation était suffisante pour réduire la taille de l'infarctus du myocarde et améliorer la survie des myocytes cardiaques (Jones et al., 2008). L'ouverture des mPTP (mitochondrial permeability transition pore) est essentielle à la survie lors de la reperfusion. Il a été montré que les VDAC (canaux anioniques voltage-dépendants), l'élément clé des mPTP, sont *O*-GlcNAcylés ce qui pourrait affecter leur ouverture et protéger les cardiomyocytes (Mailleux et al., 2016). La *O*-GlcNAcylation de la protéine mitochondriale anti-apoptotique Bcl-2 dans des myocytes ventriculaires néonataux de rat est corrélée à une diminution des lésions cellulaires post-I/R et une meilleure survie avec, en prime, un blocage de l'apoptose (Champattanachai et al., 2008). En revanche, une étude plus récente a montré que l'hyper *O*-GlcNAcylation induite par l'obésité contribue à l'atténuation de la cardioprotection contre les lésions I/R (**Fig. 26A**) (Jin et al., 2021).

D'autres études ont montré toute l'importance de la *O*-GlcNAcylation dans le cadre d'une hémorragie traumatique (S. Yang et al., 2006; Zou et al., 2007). Tout d'abord, dans un modèle de rat, le traitement par la glucosamine ou le PUGNAc améliore la récupération de la perfusion et de la fonction des organes, et réduit les niveaux d'IL6 (interleukine 6) circulante et de TNF-α (tumor necrosis factor alpha) après une hémorragie traumatique (S. Yang et al., 2006; Zou et al., 2007). Ultérieurement, il a été montré que le processus inflammatoire survenant lors d'une hémorragie traumatique est associé à l'augmentation de l'activité de liaison à l'ADN de NF-KB dans le cœur (Zou et al., 2009). Ces auteurs ont montré que le traitement à la glucosamine améliore la fonction cardiaque après une hémorragie traumatique, et ce par l'augmentation des protéines *O*-GlcNAcylées et l'atténuation de la voie de signalisation NF-KB (**Fig. 26B**) (Zou et al., 2009). En revanche, l'augmentation chronique de la *O*-GlcNAcylation dans le cœur d'animaux diabétiques est impliquée dans la toxicité du glucose et est associée aux dysfonctions cardiaques diabétiques (Marsh et al., 2014). En effet, dans des conditions

diabétiques, il a été montré que la *O*-GlcNAcylation de PLB (phospholamban), inhibiteur de SERCA2a (sarcoplasmic/endoplasmic *reticulum* Ca^{2+}-ATPase) impliqué dans la contraction du muscle cardiaque, inhibe sa phosphorylation et augmente son association avec SERCA2a, entrainant une détérioration de la fonction cardiaque (**Fig. 26C**) (Mailleux et al., 2016). Enfin, il a été montré une délocalisation de l'OGT et de l'OGA des bandes-Z des fibres cardiaques de rats diabétiques, ayant pour conséquence de modifier la *O*-GlcNAcylation des myofilaments et d'altérer l'utilisation du calcium et les fonctions cardiaques (Ramirez-Correa et al., 2015).

Nous pouvons conclure qu'en fonction des conditions physiologiques, la *O*-GlcNAcylation peut avoir un effet protecteur ou offensif vis-à-vis des fonctions cardiovasculaires. A court terme, la *O*-GlcNAcylation protège des lésions liées à l'I/R et au choc hémorragique traumatique, et semble plutôt potentialiser l'effet délétère sur les fonctions cardiaques dans des contextes d'obésité et de cardiomyopathie diabétique.

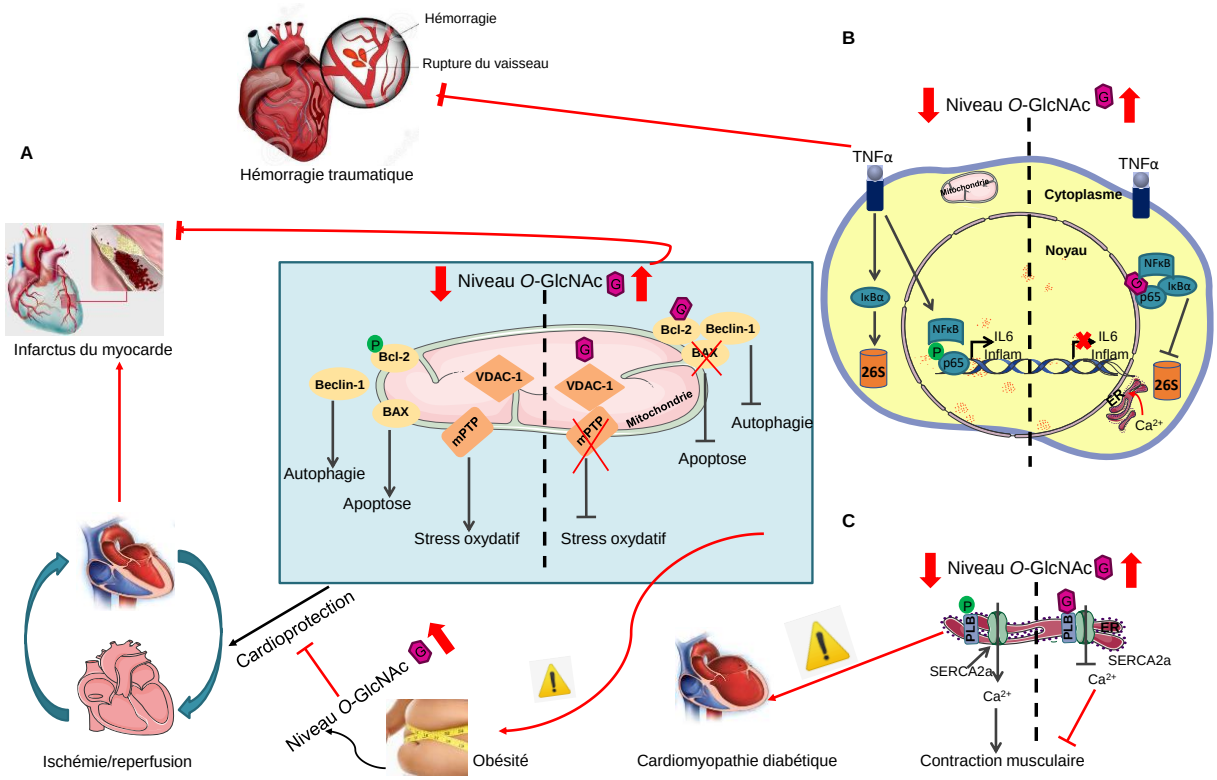


Figure 26 : Implication de la *O*-GlcNAcylation dans les maladies cardiovasculaires. (A) La *O*-GlcNAcylation offre une cardioprotection suite à l'I/R. L'élévation de la *O*-GlcNAcylation après ischémie limite le stress oxydatif grâce à la modification de VDAC-1 mitochondrial qui, une fois *O*-GlcNAcylé, augmente son interaction avec les pores de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) et limite la libération des radicaux libres. Lorsque VDAC-1 n'est pas *O*-GlcNAcylé, mPTP peut s'ouvrir et libérer les espèces radicalaires nocives. Lors de la reperfusion cardiaque, la protéine pro-autophagique Beclin-1 se dissocie de son inhibiteur Bcl-2 et stimule constitutivement l'autophagie. De plus, la phosphorylation de Bcl-2 bloque son interaction avec BAX (protéine X associée à Bcl-2) dans la membrane mitochondriale, provoquant l'apoptose. La *O*-GlcNAcylation de Bcl-2 pendant la reperfusion favorise son interaction avec Beclin-1 et BAX inhibant l'apoptose et favorisant la survie des cardiomyocytes. L'augmentation de *O*-GlcNAcylation limite également l'infarctus de myocarde. En revanche, l'élévation de la *O*-GlcNAcylation dans des conditions de diabète inhibe son effet protecteur lors de l'I/R. **(B) La *O*-GlcNAcylation**

inhibe l'inflammation au cours de l'hémorragie traumatique. La diminution de la *O*-GlcNAcylation favorise la phosphorylation de la sous-unité p65 de NFκB et sa translocation au noyau où elle stimule l'activation des gènes inflammatoires et la sécrétion d'IL6. En revanche, la *O*-GlcNAcylation favorise l'inhibition de NFκB contrôlée par IκBα, empêchant ainsi l'activation du processus inflammatoire. **(C) La *O*-GlcNAcylation stimule la cardiomyopathie diabétique :** l'élévation de la *O*-GlcNAcylation dans le cœur diabétique contrarie la contraction musculaire cardiaque normale, et ce par *O*-GlcNAcylation PLB et en favorisant son effet inhibiteur sur la pompe SERCA2a ce qui induit la diminution de la charge calcique dans le RE.

7.4. Le cancer

6.4.1. Reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité mondiale (Bray et al., 2018). Les cellules cancéreuses modifient leur métabolisme et leur signalisation pour favoriser la croissance, la survie et la prolifération cellulaire. Les cellules cancéreuses se caractérisent par une haute capacité à se diviser et, pour répondre rapidement à leur besoin, augmentent l'absorption de glucose. De fait, elles produisent de l'énergie par voie glycolytique plutôt que par phosphorylation oxydative même en présence d'oxygène (**Fig. 27**). Ce phénomène métabolique, découvert par Otto Warburg (Warburg, 1956), est maintenant largement observé dans divers cancers (Liberti and Locasale, 2016) (**Fig. 27**). Néanmoins, il a été montré que la diminution de la production d'ATP glycolytique en inhibant la PK (pyruvate kinase) n'empêche pas la tumorigenèse (Israelsen et al., 2013). De plus, malgré leur flux glycolytique élevé, une partie de l'ATP des cellules cancéreuses est générée par voie mitochondriale, à l'exception des tumeurs portant des mutations au niveau des enzymes impliquées dans la respiration mitochondriale, telles que SDH (succinate déshydrogénase) et FH (fumarate hydratase) (Zu and Guppy, 2004).

En plus du pyruvate dérivé de la glycolyse, les acides aminés et les acides gras peuvent soutenir la production mitochondriale d'ATP. En effet, la dégradation des acides gras par la β-oxydation, génère l'acétyl-CoA et les équivalents réducteurs $NADH,H^+$ et $FADH_2$ réoxydés par la chaîne de transport des électrons (ETC, electron transport chain) de la membrane mitochondriale interne pour produire de l'ATP. Par ailleurs, les cellules cancéreuses élèvent l'absorption de la glutamine qui au cours de la glutaminolyse génère l'α-cétoglutarate qui alimente le CK (cycle de Krebs), également appelé TCA (cycle des acides tricarboxyliques ou cycle du citrate) (Hensley et al., 2013) (**Fig. 27**). De plus, les BCAA (branched-chain amino acid) isoleucine, leucine et valine, élevés dans le plasma des patients atteints de cancer du pancréas, peuvent être oxydés et convertis en acétyl-CoA ou autres molécules organiques pour rejoindre le TCA (Mayers et al., 2014).

Pour assurer leurs fonctions particulières et adapter leur métabolisme à leurs besoins, les cellules cancéreuses se caractérisent par une dérégulation des voies de signalisation. Les facteurs de croissance activent la voie PI3K/AKT/mTOR contrôlant la glycolyse et la synthèse d'acides gras par l'activation de HIF-1α et de SREBP respectivement (Dibble and Manning, 2013) (**Fig. 27**). Les cellules cancéreuses

présentent fréquemment des mutations agissant sur la suractivation de la voie PI3K/AKT/mTOR avec une dépendance minimale aux facteurs de croissance (Yuan and Cantley, 2008). Autre acteur couramment dérégulé dans le cancer est le proto-oncogène c-Myc, par gain de fonction, par translocation chromosomique, amplification génique ou polymorphisme nucléotidique. C-Myc régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans la glycolyse, la lipogenèse, la glutaminolyse, le métabolisme de la sérine et le métabolisme mitochondrial, concourant à la croissance et à la prolifération cellulaire. A cela, nous pouvons ajouter que l'oncogène K-Ras, fréquemment muté dans le cancer du poumon, du colon et du pancréas, stimule la voie PI3K et c-Myc aggravant la tumorigenèse (Stine et al., 2015) (**Fig. 27**). Outre les oncogènes, les suppresseurs de tumeurs tels que le facteur de transcription p53 participe à la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses (Kruiswijk et al., 2015). En effet, le gène *TP53* (tumor protein 53) est muté ou dérégulé dans 50% des cancers humains. Les fonctions suppressives de tumeurs de p53 comprennent la réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, la senescence et l'apoptose (T. Li et al., 2012). Cependant, des études récentes indiquent que p53 est impliqué dans la régulation du métabolisme et du stress oxydatif. Il a été montré que la perte de p53 augmente le flux glycolytique pour favoriser l'anabolisme et l'équilibre redox, deux processus clés de la tumorigénèse (Kruiswijk et al., 2015) (**Fig. 27**).

Autre caractéristique des cellules cancéreuses est leur résidence dans un environnement appauvri en oxygène (hypoxie), de 0 à 2% d'O_2 seulement. L'adaptation métabolique à l'hypoxie est assurée par HIF-1α, qui induit l'expression des gènes métaboliques impliqués dans le flux glycolytique (Semenza, 2012). Il est à noter que certaines tumeurs présentent une activité constitutive de HIF-1α même dans des conditions normoxiques, et ce par le biais de divers mécanismes, notamment : (i) hyperactivation de mTORC1, (ii) accumulation des ROS, et (iii) accumulation des métabolites du TCA du fait de mutations spécifiques des gènes codant SDH ou FH (Kaelin and Ratcliffe, 2008).

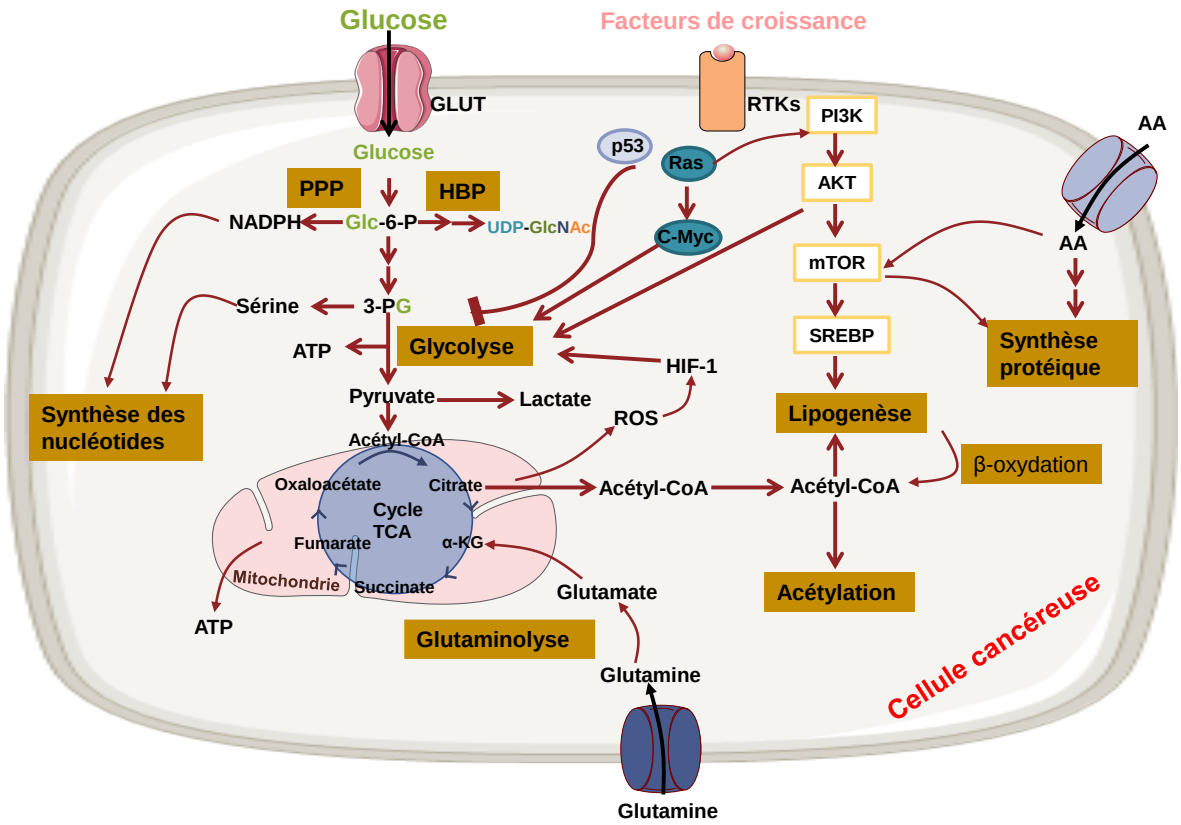


Figure 27 : Dérégulation métabolique des cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses ont une activation aberrante de la voie PI3K/AKT/mTOR qui induit l'activation des voies anaboliques des protéines et lipides. La perte du suppresseur de tumeur p53 et l'activation de l'oncogène c-Myc favorisent la glycolyse. Les cellules cancéreuses augmentent la consommation de glucose et produisent l'ATP *via* la glycolyse et la respiration mitochondriale. Environ 2 à 3% du glucose est utilisé par HBP pour la synthèse d'UDP-GlcNAc indispensable à la *O*-GlcNAcylation. Le métabolisme contrôle également la signalisation en régulant les ROS, la méthylation et l'acétylation. Les cellules cancéreuses élèvent aussi la consommation de la glutamine qui, après la glutaminolyse rejoint le TCA. Les autres AA (acides aminés) peuvent également favoriser la production mitochondriale d'ATP (voir le texte).

7.4.2. Fonctions de la O-GlcNAcylation dans le cancer

7.4.2.1. Régulation du métabolisme

Il a été montré qu'au travers de l'augmentation du flux de la voie des hexosamines, les cellules cancéreuses élèvent leurs niveaux de *O*-GlcNAcylation. Cette augmentation corrélée à la surexpression de l'OGT est observée dans de nombreux types de cancers (Bond and Hanover, 2015). Il a été rapporté dans plusieurs études protéomiques qu'un grand nombre d'enzymes métaboliques sont *O*-GlcNAcylées, suggérant le rôle critique de la *O*-GlcNAcylation dans le métabolisme cellulaire. Il a initialement été montré que PFK1 (phosphofructokinase-1), enzyme glycolytique clé catalysant la conversion du Fru-6-P (fructose-6 phosphate) en Fru-1,6-bisP, est *O*-GlcNAcylée sur la Ser529 ce qui inhibe son activité et redirige le flux glycolytique vers la voie des pentoses phosphate, favorisant ainsi la survie et la prolifération des cellules cancéreuses (Yi et al., 2012).La Glc-6-PD (glucose-6-phosphate déshydrogénase), l'enzyme limitante de la voie des pentoses phosphate, est *O*-GlcNAcylée sur la Ser84, augmentant son activité et le flux de glucose au travers de cette voie, conduisant à la synthèse de

précurseurs nucléotidiques et lipidiques (Rao et al., 2015). La *O*-GlcNAcylation de PGK1 (phosphoglycérate kinase-1) régule la glycolyse et soutient la croissance tumorale (Nie et al., 2020). La *O*-GlcNAcylation de la dernière enzyme de la glycolyse, PKM2, déstabilise sa structure tétramérique active et conduit à sa translocation nucléaire, entrainant une augmentation de la consommation du glucose et la production du lactate, ainsi qu'une augmentation du niveau de synthèse lipidique et d'ADN des cellules cancéreuses (Wang et al., 2017). Il est à noter que la *O*-GlcNAcylation régule également la glycolyse des cellules cancéreuses *via* la régulation de HIF-1α et de sa cible transcriptionnelle GLUT1 (**Fig. 28**). Les cellules de cancer du sein présentant des niveaux élevés de HIF-1α expriment également des quantités importantes d'OGT et des niveaux faibles d'OGA, ceci en corrélation avec un mauvais pronostic (Ferrer et al., 2014).

La protéine kinase AMPK est un autre régulateur du métabolisme et de l'homéostasie énergétique ; elle est activée en réponse au stress énergétique et nutritionnel (Shackelford and Shaw, 2009). La *O*-GlcNAcylation d'AMPK inhibe son activité et par conséquent bloque l'autophagie dans des cellules cancéreuses de la vessie (Jin et al., 2020) (**Fig. 28**).

Ensemble, ces résultats montrent que la *O*-GlcNAcylation joue un rôle de premier ordre dans la reprogrammation métabolique et favorise la croissance tumorale.

7.4.2.2. Régulation de la croissance et de la survie

La *O*-GlcNAcylation participe également à la tumorigenèse par son impact dérégulateur de la signalisation, de sorte à ce que la cellule cancéreuse échappe aux stress du *reticulum*, oxydatif et nutritif, ainsi qu'à l'hypoxie. Le flux HBP et la *O*-GlcNAcylation maintiennent la phosphorylation induite par l'insuline de PI3K et de fait la croissance des cellules cancéreuses en réponse à une déprivation en glucose (Jones et al., 2014). Dans des conditions hyperglycémiques, la *O*-GlcNAcylation de la Thr352 de la sous-unité p65 du facteur de transcription NF-KB augmente son activité transcriptionnelle (***cf 6.4 page 80***) nécessaire au mécanisme de survie dans le cancer (Golks et al., 2007). Une autre étude confirme que l'élévation de la *O*-GlcNAcylation contribue à l'activation oncogénique de NF-KB et inhibe l'apoptose dans le cancer du pancréas (Ma et al., 2013). Récemment, il a été rapporté que l'OGT favorise le cancer du foie, associé à la stéatose hépatique, en régulant le métabolisme de l'acide palmitique et en induisant le stress du RE *via* l'activation de la voie NF-KB (W. Xu et al., 2017). Par ailleurs, il a été rapporté que la *O*-GlcNAcylation de l'oncogène c-Myc sur le résidu Thr58 accélère la croissance des cellules cancéreuses pancréatiques (Itkonen et al., 2013). Une boucle de rétrocontrôle positif existe puisque la voie PI3K/AKT/mTOR/c-Myc est nécessaire pour l'élévation d'OGT et de *O*-GlcNAcylation dans des cellules cancéreuses mammaires humaines par un mécanisme de stabilisation de l'OGT par la chaperonne Hsp90A (Sodi et al., 2015). La même équipe a montré que la diminution de

O-GlcNAcylation de cellules cancéreuses mammaires induit le stress du RE et l'apoptose (Ferrer et al., 2014). En revanche, la *O*-GlcNAcylation de p53 sur la Ser149 diminue la phosphorylation inhibitrice sur Thr155 par le signalosome COP9 ayant pour conséquence de stabiliser p53 et de renforcer l'activité suppressive de tumeur, l'apoptose des cellules cancéreuses pulmonaires H1299 se trouvant augmentée (W.H. Yang et al., 2006) (**Fig. 28**).

7.4.2.3. Régulation de l'invasion, métastase et angiogenèse

L'invasion et la métastase des cellules cancéreuses sont le fruit de processus en plusieurs étapes incluant l'EMT (epithelial-mesenchymal transition), résultat d'une signalisation β-caténine/Snail1/E-cadhérine aberrante au niveau de la matrice extracellulaire (Thiery and Sleeman, 2006).

La β-caténine est un coactivateur transcriptionnel de la voie de signalisation Wnt et joue un rôle dans l'adhésion intercellulaire. Son accumulation nucléaire en réponse aux mutations géniques est directement liée à l'émergence de divers cancers au travers desquels elle régule la prolifération cellulaire (Cui et al., 2018). Il a été montré que la β-caténine est *O*-GlcNAcylée sur la Ser23, ce qui inhibe sa translocation nucléaire et diminue son activité transcriptionnelle, entrainant une diminution significative de la prolifération des cellules du cancer de la prostate et de l'ostéosarcome (Ha et al., 2014). En revanche, il a été montré par mon équipe que la *O*-GlcNAcylation de la β-caténine sur la Thr41 la protège de la dégradation protéasomale, augmentant son activité dans des cellules de cancer du côlon (Olivier-Van Stichelen et al., 2014). Une autre étude sur les fibroblastes murins NIH-3T3 a montré que la *O*-GlcNAcylation augmente l'expression de la β-caténine et favorise son activité transcriptionnelle, améliorant ainsi la migration et le développement tumoral (Harosh-Davidovich and Khalaila, 2018). Il a également été montré que la *O*-GlcNAcylation induit la diminution de la E-cadhérine en surface cellulaire, par modification directe de la β-caténine, contribuant ainsi à la métastase dans un modèle murin de cancer du sein (Gu et al., 2010). Par ailleurs, Parc et collaborateurs ont montré que la *O*-GlcNAcylation du répresseur transcriptionnel Snail1, sur la Ser112, le stabilise et accroit son activité, participant ainsi à la diminution de l'expression de la E-cadhérine et à l'amélioration de EMT dans des cellules du cancer du sein (S.Y. Park et al., 2010). La *O*-GlcNAcylation sur la Ser108 de la cofiline, un régulateur de la polymérisation de l'actine, est nécessaire pour sa localisation correcte dans les invadopodes dans le processus d'invasion de cellules cancéreuses du sein (Huang et al., 2013). Au contraire, la perte de *O*-GlcNAcylation de la cofiline conduit à la déstabilisation des invadopodes et altère l'invasion cellulaire (Huang et al., 2013). Il a aussi été montré que l'élévation de la *O*-GlcNAcylation était suffisante pour la transformation maligne des cellules prostatiques non tumorigènes en favorisant la formation du complexe E-cadhérine/caténine/cytosquelette (Gu et al., 2014). Enfin, la réduction des niveaux de *O*-GlcNAcylation dans les cellules du cancer de la prostate induit une diminution de l'expression des métalloprotéinases matricielles, MMP-2, MMP-9 et VEGF et

inhibe l'invasion et l'angiogenèse *via* la dégradation du facteur de transcription FoxM1 (Lynch et al., 2012) (**Fig. 28**).

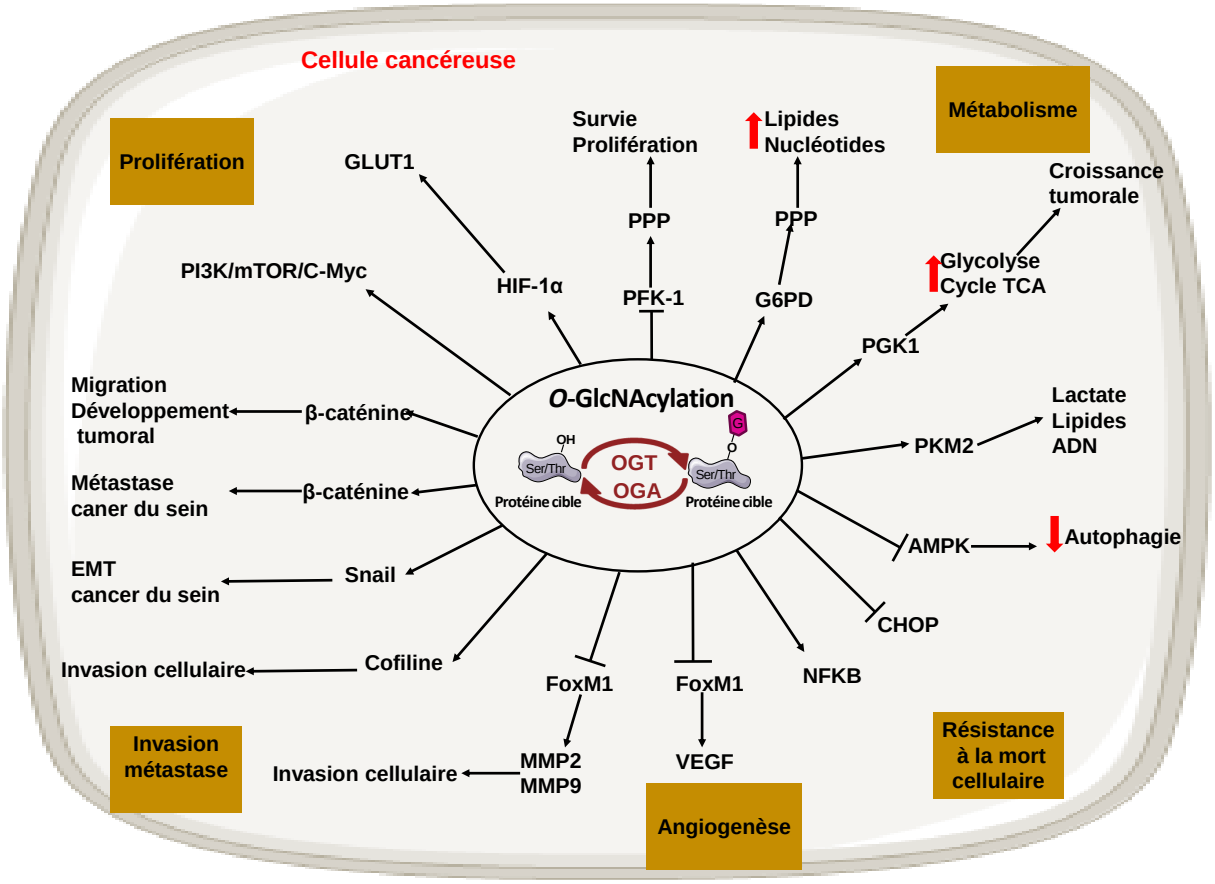


Figure 28 : La *O*-GlcNAcylation régule le phénotype cancéreux. L'OGT *via* la *O*-GlcNAcylation régule, directement ou indirectement, de nombreuses protéines jouant un rôle déterminant dans le processus cancéreux.

7.4.3. La O-GlcNAcylation comme outil de diagnostic

La thérapie anticancéreuse nécessite des biomarqueurs fiables pour le diagnostic précoce, le pronostic et la détection des récidives. Dans cette optique, les niveaux de *O*-GlcNAcylation et l'expression des enzymes la régulant, l'OGT, l'OGA et la GFAT, peuvent servir de biomarqueurs pour la détection précoce et le pronostic du cancer. Des niveaux élevés de *O*-GlcNAcylation sont associés à une mauvaise survie chez les patients atteints du cancer de la prostate (Kamigaito et al., 2014). Rozanski et collaborateurs ont détecté les ARNm codant l'OGT dans les urines de patients atteints du cancer de la vessie, alors qu'ils sont indétectables dans les urines de patients sains. En outre, ces auteurs ont trouvé que l'OGT est augmentée dans les tumeurs de haut grade par rapport aux tumeurs de bas grade. Bien que les niveaux d'ARNm de l'OGA soient retrouvés à des taux comparables dans les urines de patients sains ou atteints du cancer de la vessie, ils sont inversement corrélés avec le stade des tumeurs (Rozanski et al., 2012). De plus, de faibles niveaux d'OGA corrèlent avec la récidive tumorale chez les

patients atteints de carcinome hépatocellulaire ayant subi une greffe du foie (Zhu et al., 2012). Dans une autre étude, il a été montré que les niveaux de *O*-GlcNAcylation dans le sang et la rate corrèlent positivement avec la leucémie lymphoïde chronique après traitement au resvératrol dans un modèle murin d'érythroleucémie (Tomic et al., 2013). Ainsi, la teneur en OGT et en *O*-GlcNAc dans l'urine ou le sang pourrait être un marqueur de diagnostic ou de réponse thérapeutique dans certains cancers. Enfin, l'expression élevée de la GFAT2 est en corrélation avec un mauvais pronostic chez les patients atteints du cancer du sein (Oikari et al., 2018).

7.4.4. La O-GlcNAcylation comme cible thérapeutique

Plusieurs études ont rapporté qu'une potentielle fenêtre thérapeutique existerait en ciblant la *O*-GlcNAcylation des cellules cancéreuses. La réduction génétique des niveaux de *O*-GlcNAcylation en focalisant l'OGT diminue les caractéristiques liées au cancer du sein et de la prostate, y compris la prolifération cellulaire, l'invasion et l'augmentation du stress métabolique et de l'apoptose, tout en s'opposant à l'expression d'oncogènes puissants tels que FOXM1 (Caldwell et al., 2010), c-Myc (Itkonen et al., 2013) et HIF-1 (Ferrer et al., 2014). Des miRNA et des petites molécules inhibitrices ciblant l'OGT ont été identifiés comme présentant un potentiel thérapeutique anticancéreux. C'est le cas des miRNA-24, miRNA-101 et miRNA-483 qui, en diminuant la transcription de l'OGT, bloquent la capacité invasive du cancer du sein (Y. Liu, Huang, et al., 2017), du CCR (Jiang et al., 2019) et du cancer gastrique (Yu et al., 2018) respectivement. De même, ST045849 est capable d'interférer avec la prolifération cellulaire du CHC (carcinome hépatocellulaire) (W. Xu et al., 2017). Il a été montré que ce même inhibiteur induit la mort des cellules du cancer de la prostate lorsqu'il est combiné avec la cyclosérine, inhibiteur d'ALAT (alanine aminotransférase), connue pour son effet antibiotique contre *Mycobacterium tuberculosis* (Itkonen et al., 2016). De manière intéressante, cet effet combinatoire n'a pas été observé dans une lignée cellulaire dérivée d'épithélium normal de la prostate (Itkonen et al., 2016). De plus, le KO de l'OGT combiné avec l'inhibiteur de PI3K, GDC-0941, sensibilise les cellules cancéreuses de l'ovaire et induit l'apoptose *in vitro* (Kwei et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que la diminution de la *O*-GlcNAcylation dans des cellules cancéreuses du sein positives au récepteur aux œstrogènes, potentialise les effets du tamoxifène sur la mort cellulaire (Kanwal et al., 2013). Ainsi, l'inhibition de la *O*-GlcNAcylation serait un moyen efficace pour sensibiliser les cellules aux thérapies existantes dans le traitement du cancer. OSMI-1, un autre inhibiteur d'OGT (Ortiz-Meoz et al., 2015), diminue le volume tumoral (Sharma et al., 2019). OSMI-2 diminue la *O*-GlcNAcylation globale de la chromatine et réduit la prolifération des cellules cancéreuses de la prostate (Itkonen et al., 2019). Cet effet a également été observé dans des organoïdes de patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique lorsque OSMI-2 est associé à un inhibiteur de CDK9 (cyclin-dependent kinase)-9 (Itkonen et al., 2020). Vocadlo et ses collègues ont caractérisé un autre inhibiteur d'OGT, l'Ac_4-5S-GlcNAc qui,

une fois dans la cellule, produit l'UDP-5S-GlcNAc, un analogue de l'UDP-GlcNAc, qui inhibe l'activité de l'OGT et diminue la *O*-GlcNAcylation (Gloster et al., 2011). Il a été montré que l'Ac_4-5S-GlcNAc inhibe la prolifération des cellules cancéreuses du pancréas (Gloster et al., 2011) et du sein (Sodi et al., 2015). En effet, le traitement des cellules par l'Ac_4-5S-GlcNAc bloque la synthèse de cycline D1, induite en réponse au sérum, au cours de la transition G0/G1 ce qui bloque le cycle cellulaire et par conséquent la prolifération cellulaire (Olivier-Van Stichelen et al., 2012). D'autres nouvelles petites molécules ont été identifiées comme inhibiteurs de l'OGT, c'est le cas de BZX2, OSMI-3, OSMI-4, L01, et ES1, mais leur impact biologique n'a pas encore été suffisamment exploré (Y. Liu, Ren, et al., 2017; Martin et al., 2018; Worth et al., 2019) (**tableau 1**).

Un autre point, discuté précédemment, indique que la diminution de la *O*-GlcNAcylation est corrélée au phénotype de la maladie d'Alzheimer. Il a été montré que l'élévation de la *O*-GlcNAcylation par le Thiamet-G, réduit significativement l'agrégation de la protéine Tau et protège les souris de cette neuropathie. Ainsi, la *O*-GlcNAcylation pourrait être une cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer (Hastings et al., 2017).

A ce stade, nous pouvons conclure que l'utilisation d'inhibiteurs d'OGT seuls ou en association avec d'autres médicaments pourrait potentialiser la thérapie anti-cancéreuse et d'autres pathologies. En revanche, compte tenu des rôles clés de la *O*-GlcNAcylation dans les processus cellulaires physiologiques (***cf 6 page 73***), inhiber l'OGT pourrait affecter les fonctions physiologiques de milliers de protéines. À cet égard, il serait intéressant de cibler spécifiquement l'interaction de l'OGT avec certains de ses substrats. Des études ciblant la correction de *O*-GlcNAcylation aberrante à des niveaux considérés comme normaux ou physiologiques, seront nécessaires pour prévenir ou atténuer ces effets indésirables.

6.4.5. Le carcinome hépatocellulaire (CHC)

6.4.5.1. Epidémiologie et facteurs de risque

Le CHC est l'un des cancers les plus fréquents avec un taux de mortalité élevé. Des données épidémiologiques récentes (Globocan 2020) du centre international de recherche sur le cancer-organisation mondiale de la santé ont montré que le cancer du foie est le sixième cancer par sa fréquence et la troisième cause de décès par cancer dans le monde (Sung et al., 2021) (**Fig. 29A**). Le CHC est le principal cancer primitif du foie qui se développe à partir des cellules majoritaires de cet organe, les hépatocytes, et représente 90% des tumeurs primaires du foie. C'est un cancer de mauvais pronostic en raison d'un diagnostic souvent tardif et de l'inefficacité des traitements pour les stades avancés de la maladie (Sukowati, 2019).

La distribution mondiale de CHC est associée à la prévalence de ses facteurs de risque. En effet, l'infection par le virus de l'hépatite B HBV (hepatitis B virus) est la principale cause de CHC en Asie orientale et en Afrique subsaharienne avec un taux de prévalence d'environ 70%. En Europe et en Amérique du Nord, l'infection par le virus de l'hépatite C HCV (hepatitis C virus) est responsable de 50 à 70 % des cancers du foie, tandis qu'une consommation excessive d'alcool entraine une stéatose hépatique alcoolique ASH (alcoholic steatohepatitis) responsable elle d' environ 20 % des cas (El-Serag, 2011). Des études cas-témoins de différents pays ont rapporté que la consommation chronique d'alcool est associée à l'augmentation d'un facteur 2 du CHC (Ramadori et al., 2017). Outre l'infection par les virus hépatotropes et la consommation d'alcool, l'obésité et le diabète, couramment associés à la stéatose hépatique non alcoolique NASH (non-alcoholic steatohepatitis), augmentent également le risque de CHC (Estes et al., 2018). Ainsi, l'infection par les virus de l'hépatite et les maladies métaboliques du foie contribuent auc CHC.

L'exposition à certains agents chimiques et toxines telle que l'aflatoxine B participe également à la progression du CHC. L'aflatoxine B est une myotoxine produite par le champignon *Aspergillus* et est plus courante en Asie et dans les régions tropicales d'Afrique que dans le reste du Monde. Elle est souvent ingérée avec des grains céréaliers contaminés. Une fois métabolisée par le cytochrome hépatique p450, elle agit comme un mutagène de l'ADN en induisant une transversion G-T du codon 249 du gène *TP53*. Il a été montré que lorsque l'exposition à l'aflatoxine se conjugue à l'infection chronique par le HBV, le risque du cancer du foie est 30 fois plus élevé qu'en cas d'exposition à l'aflatoxine seule (Bressac et al., 1991).

Enfin, il a été montré que le tabagisme contribue à l'initiation du CHC en accélérant la fibrose hépatique, la consommation à long terme de tabac étant étroitement associée au CHC (Zein et al., 2011; Gallaway et al., 2018). En effet, le tabac introduit des hépatocarcinogènes tels que l'acétylaminofluorène et le 4-aminobiophényle dans l'organisme, ce qui augmente la production de cytokines pro-inflammatoires et induit le stress oxydatif, déclenchant la peroxydation lipidique. Lorsque ces molécules sont associées avec d'autres facteurs de risque tels que HBV, HCV, consommation chronique d'alcool et obésité, les conséquences à long terme du tabagisme peuvent être très néfastes (Bataller, 2006; Petrick et al., 2018) (**Fig. 29B**).

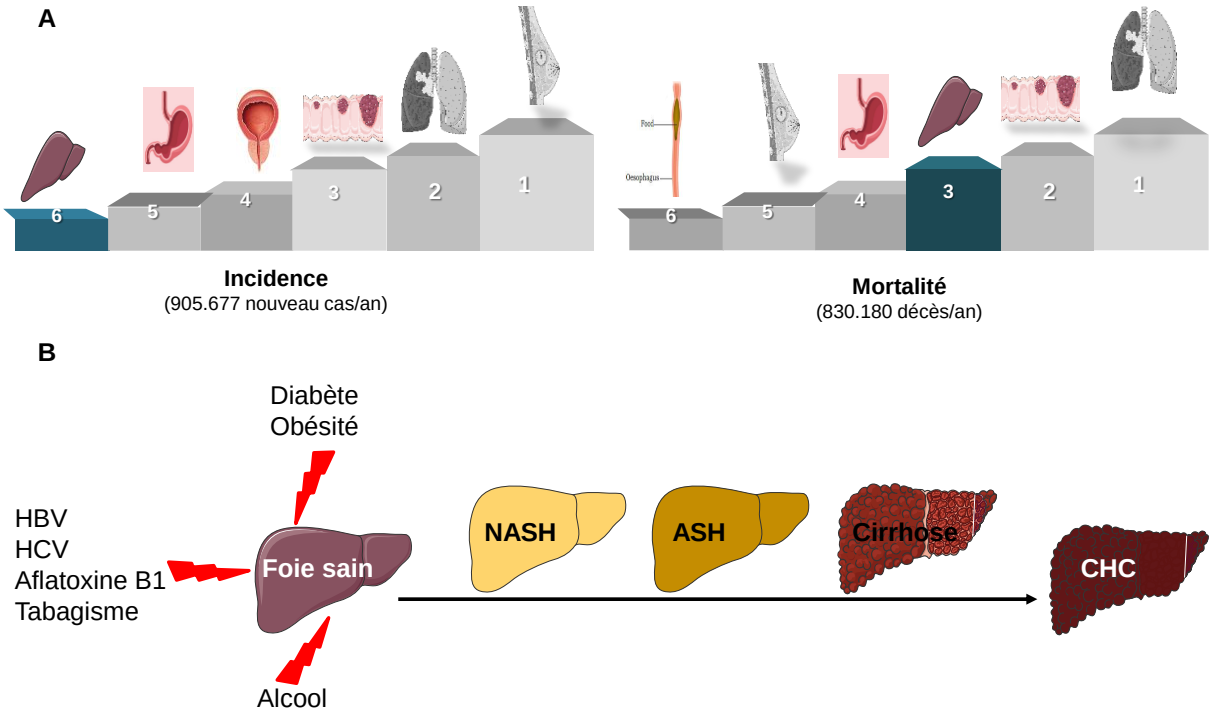


Figure 29 : Incidence, mortalité et facteurs de risque du carcinome hépatocellulaire (CHC). (A) Le CHC est classé 6ème en termes d'incidence et 3ème en termes de mortalité selon (Sung et al., 2021)**. (B)** Facteurs de risque du CHC.

6.4.5.2. Altérations génétiques, survenue et classification du CHC

L'hépatocarcinogenèse est un processus multi-étape où l'exposition répétée à plusieurs facteurs de risque peut induire des états pathologiques dont l'hépatite chronique et la cirrhose susceptibles d'induire des anomalies moléculaires. Ces lésions déclenchent un mécanisme inflammatoire chronique associé à une régénération hépatocytaire excessive et à un stress oxydatif, évènements qui favorisent l'accumulation d'altérations génétiques et la sénescence réplicative des hépatocytes (Thorgeirsson and Grisham, 2002) (**Fig. 30**). La réactivation des télomérases permet aux cellules cancéreuses de contourner les voies de signalisation des points de contrôle activées lors du raccourcissement des télomères, et de surmonter la sénescence replicative (Bell et al., 2016). Il a été montré que la mutation activatrice du promoteur de la télomérase TERT est absente dans des foies cirrhotiques (Nault et al., 2014). A cela s'ajoute qu'elle est reconnue comme l'altération la plus fréquente (43 à 64 %) et la plus précoce dans le CHC (Nault et al., 2013) (**Fig. 30**).

D'autres gènes sont également mutés dans le CHC. C'est le cas de ceux impliqués dans la voie de signalisation Wnt/β-caténine. Il a été rapporté que 15 à 33 % des patients atteints du CHC portent des mutations activatrices de *CTNNB1*, gène codant la β-caténine (de La Coste et al., 1998), et 17 % portent des mutations inactivatrices dans *AXIN1* (11 à 15 %) ou *APC* (adenomatous polyposis coli) (1 à 2 %)

(Laurent-Puig et al., 2001; Schulze et al., 2015). Ces mutations s'opposent à la dégradation de la β-caténine conduisant à une activation aberrante de la signalisation Wnt. Par ailleurs, des mutations inactivant le suppresseur de tumeur *TP53* (12 à 48 %) sont retrouvées dans le CHC lié à l'aflatoxine B1 et à l'infection par HBV. Ces mutations sont associées à une instabilité chromosomique élevée et se retrouvent rarement associées aux mutations de *CTNNB1* (Guichard et al., 2012).

En se basant sur ces mutations, le CHC peut être classé en deux sous-types moléculaires (Zucman-Rossi et al., 2015). **La classe proliférative**, plus fréquemment observée chez les patients infectés par HBV est caractérisée par des marques moléculaires et histologiques entrainant un comportement clinique agressif, notamment des taux sériques élevés d'AFP (alpha-fœto-protéine), une mauvaise différenciation cellulaire, une instabilité chromosomique, des mutations de *TP53* et une activation des voies oncogéniques telles que les voie Ras/MAPK, PI3K/AKT/mTOR et MET (le récepteur des facteurs de croissance des hépatocytes, HGF pour hepatocyte growth factor). Il a été montré que la plupart des mauvais résultats cliniques sont associés à cette classe avec une diminution de la survie des patients (Villanueva et al., 2011). Quant aux tumeurs de **la classe non proliférative,** elles présentent plus particulièrement des mutations du gène de la β-caténine et sont souvent plus grosses mais moins agressives, moins susceptibles d'envahir le système vasculaire et contiennent des cellules plus fortement différenciées (**Fig. 30**). Elles sont également plus fréquemment observées dans les stades précoces du CHC (I et II). Contrairement aux tumeurs mutées *TP53*, les tumeurs mutées sur le gène codant la β-caténine présentent un faible taux sérique d'AFP. Enfin, les patients de plus de 60 ans et/ou consommateurs chroniques d'alcool et de sexe masculin sont plus susceptibles de présenter une mutation du gène de la β-caténine (Khalaf et al., 2018). Il a été montré que les mutations de la β-caténine sont corrélées à un pronostic favorable chez les patients atteints du CHC au stade précoce, et ne sont pas associées au pronostic (pas de données significatives) dans le stade avancé du CHC (Lu et al., 2014; Wang et al., 2015).

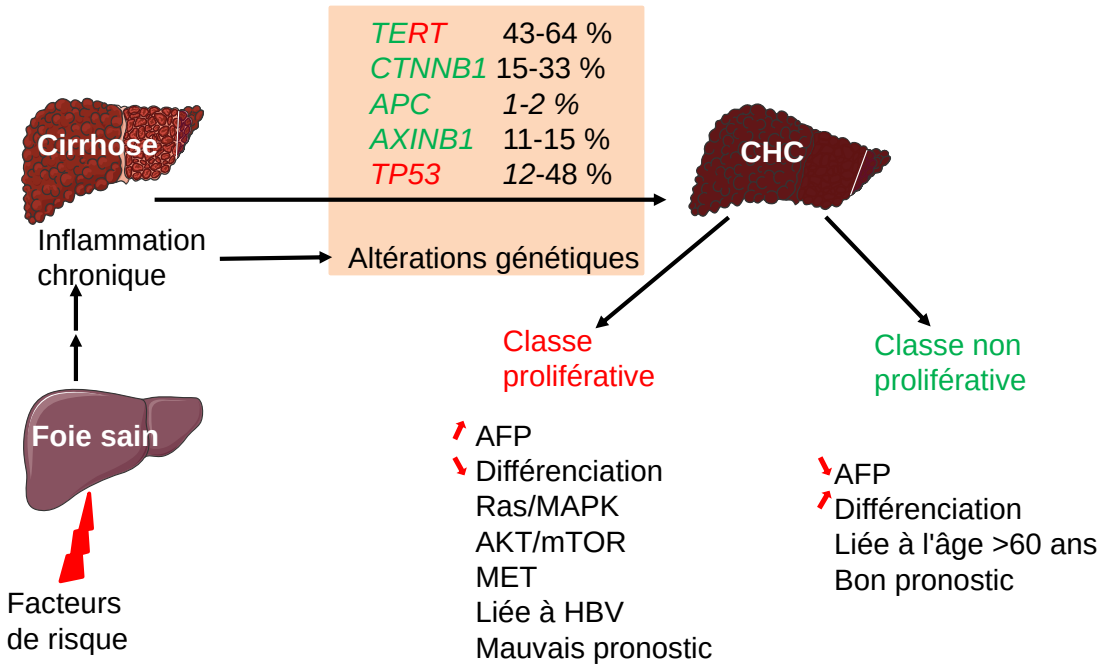


Figure 30 : Mise en place du carcinome hépatocellulaire. L'exposition du foie sain à plusieurs facteurs de risque induit des pathologies dont la stéatose hépatique responsable d'une inflammation chronique favorisant l'accumulation d'altérations génétiques. La mutation du gène de la télomérase TERT est la plus fréquente du CHC. La mutation du gène du suppresseur de tumeur TP53 est une caractéristique de la classe proliférative. En revanche, la classe non proliférative est caractérisée par la mutation du gène de la β-caténine, *CTNNB1*.

Concernant les différents stades du CHC, le système le plus fréquemment employé est la classification BCLC (Barcelona clinic liver cancer). Cette classification prend en considération certains critères tels que **le score selon la classification de Chil-Pugh** (mesurant la gravité des dommages au foie causés par la formation de tissus cirrhotiques), **les caractéristiques de la tumeur** (dont le nombre, la taille et les symptômes où le cancer s'est propagé), et **l'indice fonctionnel**, qui évalue la capacité à exercer les activités quotidiennes et déterminé à l'aide du score de ECOG (Eastern cooperative oncology group). Il existe 5 stades : stade 0 ou stade I suivi des stades A, B, C et D appelés aussi stades II, III, IV et V respectivement (European Association for the Study of the Liver, 2018) dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 4 : Les différentes classes du CHC

Stade	Score Child-Pugh	Score ECOG	Caractéristiques
0 ou I **Très précoce**	A	0	1 tumeur ≤2 cm, aucun symptôme, pas d'envahissement des gros vaisseaux sanguins du foie
A ou II **Précoce**	A/B	0	Jusqu'à 3 tumeurs <3 cm, aucun symptôme, pas d'envahissement des gros vaisseaux sanguins du foie
B ou III **Intermédiaire**	A/B	0	Plus de 3 tumeurs dans le foie ou 1 à 3 tumeurs dont au moins une >3 cm, aucun symptôme, pas d'envahissement des gros vaisseaux sanguins du foie
C ou IV **Avancé**	A/B	1/2	Plusieurs tumeurs, avec des symptômes, envahissement des gros vaisseaux sanguins du foie, métastase
D ou V **Terminal**	C	3/4	Plusieurs tumeurs, avec des symptômes, envahissement des gros vaisseaux sanguins du foie, métastase

Comme beaucoup de cancers, le CHC peut récidiver à la suite du traitement : il peut y avoir récidive locale, régionale ou distale. Il a été montré que les principales métastases du foie sont localisées aux poumons (55%), ganglions lymphatiques abdominaux (41%) et os (28%) (Katyal et al., 2000).

6.4.5.3. Diagnostic, pronostic et prise en charge des patients

L'AFP est le biomarqueur de stade V le plus largement utilisé pour la surveillance et le diagnostic du CHC, il est utilisé en association avec l'échographie, la tomodensitométrie multiphasique et l'IRM (imagerie par résonnance magnétique). Cependant, l'évaluation de l'AFP montre une faible sensibilité (47 à 64 %) et est inefficace pour détecter le CHC précoce (Sherman, 2014). Pour cela, GALAD, un score algorithmique qui nécessite encore une validation, améliore le diagnostic du CHC au stade précoce et d'obtenir un bon pronostic, tout en combinant certains paramètres tels que le sexe, l'AFP, l'AFP-L3 et les DCP (des-γ-carboxyprothrombin) du sang périphérique. En effet, dans une étude ayant porté sur trois cohortes indépendantes (Allemagne, Japon et Hong Kong), GALAD a démontré une meilleure sensibilité dans le diagnostic du CHC en comparaison à l'AFP, AFP-L3 ou DCP seuls. GALAD est actuellement en essais cliniques en tant que nouvel outil de diagnostic du CHC (Berhane et al., 2016).

D'autres potentiels biomarqueurs du CHC précoce comprennent la protéine de choc thermique Hsp70, CAP2 (adenylyl catalase-associated protein 2), GPC3 (glypican-3), GS (glutamine synthase) et GP73 (protéine golgienne de 73 kDa) mais aucune de ces molécules n'a été approuvée cliniquement (Marrero et al., 2005; Sakamoto, 2009; Di Tommaso et al., 2009).

La biopsie liquide permet la collecte d'échantillons tels que CTCs (cellules tumorales circulantes), ctDNA (circulating tumor DNA), micro ARNs et ARNs extracellulaires. Des études ont rapporté que la

présence des CTCs chez les patients atteints du CHC est associée à la croissance tumorale, au caractère invasif, à la récidive et aux métastases. En revanche, la plupart de ces études étaient basées sur une population restreinte et manquaient de données prospectives à long terme (Sun et al., 2013; Schulze et al., 2013). Il a également été rapporté dans une autre étude que les ctDNA, libérés par les cellules tumorales apoptotiques et nécrotiques, présentaient des méthylations spécifiques à la tumeur permettant de surpasser l'AFP en termes de sensibilité et de spécificité en tant que marqueur de diagnostic et de pronostic (R.-H. Xu et al., 2017).

Donc, en raison d'un diagnostic souvent tardif, le CHC est de mauvais pronostic (**Fig. 31**). En effet, les patients présentant un CHC détecté après l'apparition des symptômes, de stade avancé, ont un mauvais pronostic avec une survie globale à 5 ans inférieure à 10 % (Forner et al., 2018). Les symptômes associés au CHC peuvent inclure des douleurs abdominales, une anorexie, une satiété précoce, une perte de poids, un ictère obstructif, une fièvre, une diarrhée aqueuse et douloureuse, et des douleurs osseuses provenant des métastases. En revanche, un CHC détecté à un stade très précoce peut être guéri avec un excellent pronostic à long terme (El-Serag, 2011).

La résection chirurgicale, la greffe de foie, l'ETA (embolisation transartérielle), l'ablation par radiothérapie et le traitement systémique peuvent prolonger l'espérance de vie des patients (Buendia and Neuveut, 2015) (**Fig. 31**).

Pour les patients atteints d'un CHC à un stade précoce sans antécédents de cirrhose ou d'hypertension, la résection est recommandée. Cependant, elle est associée à un taux de récidive d'environ 60 à 70 % à 5 ans ce qui entraine une résection répétée (Tabrizian et al., 2015). Les patients atteints d'un CHC à un stade précoce présentant un dysfonctionnement hépatique peuvent bénéficier d'une greffe de foie avec un taux de survie à 4 ans supérieur à 80 % selon les critères de Milan : une seule tumeur de 5 cm ou trois tumeurs ≤3 cm au moment de la transplantation (Sapisochin and Bruix, 2017). Cependant, le CHC est cliniquement asymptomatique et les petits nodules <2 cm sont difficilement caractérisés ce qui augmente le taux de mortalité (Sapisochin and Bruix, 2017) .

Les patients présentant un CHC non résécable à un stade intermédiaire et avec une fonction hépatique intacte sont éligibles à l'ETA ou à la radiothérapie (Oliveri et al., 2011; Abdel-Rahman and Elsayed, 2017). Cependant, la question de savoir si l'un ou l'autre traitement peut prolonger la survie en l'absence de chimiothérapie systémique reste controversée et nécessite une validation plus approfondie.

Le traitement des patients atteints d'un CHC à un stade avancé se limite à la chimiothérapie systémique (Le Grazie et al., 2017). Malheureusement, depuis près d'une décennie le sorafénib est la seule molécule chimiothérapeutique utilisée pour le CHC avancé. Il permet de prolonger la survie de 3 mois

(Forner et al., 2018). Entre 2017 et 2019, de nouvelles thérapies systémiques ont vu le jour. Elles ciblent les récepteurs à activité tyrosine kinase : il s'agit du régorafénib (Bruix et al., 2017), lenvatinib (Kudo et al., 2018), cabozantinib (Abou-Alfa et al., 2018), et ramucirumab (A.X. Zhu et al., 2015) (**Fig. 31**).

Enfin, l'immunothérapie est le dernier développement dans le traitement du CHC. En effet, la majorité des CHC résultent d'une maladie hépatique chronique pour laquelle les cellules T sont constamment exposées à des antigènes et à des signaux inflammatoires ce qui provoque leur épuisement et perte de fonction et produit une surexpression des protéines inhibitrices telles que PD-1 (programmed cell death 1), CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) et TIM-3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain-3). Cela suggère que les patients atteints de CHC pourraient bénéficier de l'immunothérapie en ciblant les cellules T (Zheng et al., 2017; Chew et al., 2017). En effet, les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires et la thérapie cellulaire CAR T (chimeric antigen receptor T) cell adoptive sont les deux piliers de l'immunothérapie. La première permet d'améliorer la réponse antitumorale des cellules T en bloquant les voies inhibitrices. Quant à la deuxième, elle consiste en l'utilisation thérapeutique de cellules T de patients pour cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. En 2017, le nivolumab, inhibiteur de PD-1, a été approuvé comme traitement de deuxième intention dans le traitement du CHC avancé (El-Khoueiry et al., 2017). En 2020, la combinaison nivolumab-ipilimumab, anticorps monoclonal anti-CTLA4, a été approuvée pour le traitement des patients atteints de CHC avancé et intolérants au sorafénib (Saung et al., 2021) Il a été rapporté que les patients atteints de CHC non résécable traités avec l'association atezolizumab, inhibiteur de PD-L1 (programmed death-ligand 1), et bivacizumab, anticorps monoclonal anti-VEGF, ont montré une meilleure survie globale (67,2 % à 12 mois contre 54,6 %) en comparaison à ceux traités par le sorafénib seul (Finn et al., 2020). Enfin, les antigènes tumoraux du CHC sont souvent intracellulaires ou sécrétés, ce qui rend difficile l'utilisation de la thérapie à l'aide de cellules CAR T qui nécessite la présence de TAAs (tumor-associated antigens). De ce fait, il n'existe actuellement aucune thérapie par cellules CAR T disponible pour les patients atteints de CHC. En revanche, des résultats d'une étude préclinique semblent encourageants. En effet, il a été montré que le transfert adoptif de cellules CAR T ciblant l'AFP (H. Liu et al., 2017) et le GPC3 (Dargel et al., 2015) réduisait la charge tumorale dans un modèle murin de CHC.

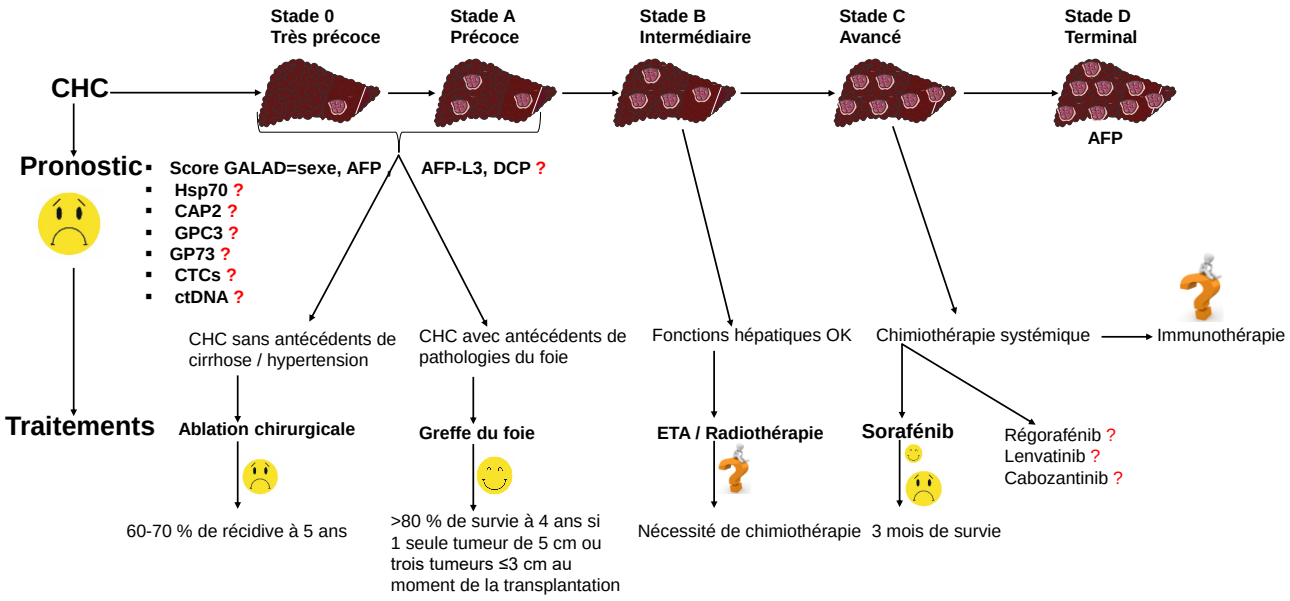


Figure 31 : Pronostic et traitements du CHC. Le CHC est généralement de mauvais pronostic en raison d'une détection à un stade avancé. Pour les traitements du CHC, voir les détails dans le texte.

6.4.5.4. Augmentation de la lipogenèse dans le CHC

Comme discuté dans la première partie, la dérégulation de la lipogenèse dans le cancer est nécessaire pour fournir les précurseurs lipidiques impliqués dans la production des membranes cellulaires, la modification des protéines, la transduction du signal et, *in fine*, la prolifération cellulaire. Les études qui s'intéressent à la contribution de la lipogenèse dans le développement du CHC sont relativement récentes. Tout d'abord, la surexpression de l'ARNm des principales enzymes lipogéniques, dont ACLY, ACC, FAS et SCD1 a été décrite dans le CHC par rapport au foie non néoplasique (Yahagi et al., 2005). Des résultats similaires ont été obtenus sur des collections de CHC humaines plus larges, avec une augmentation concomitante des enzymes de biosynthèse du cholestérol (Calvisi et al., 2011). Une étude *in vitro* a montré que l'inhibition de la FAS affecte de manière significative la croissance des cellules de CHC humaines de manière dépendante de p38MAPK (Gao et al., 2006). En outre, SREBP, un inducteur majeur de la lipogenèse (***cf 2.3.1.1 page 34***), a été identifié comme un mauvais marqueur pronostic dans le cancer du foie (Yamashita et al., 2009). Hao et collaborateurs ont montré que l'inactivation génétique de la FAS supprime l'invasion et la migration des cellules du CHC, indiquant son potentiel rôle dans les métastases tumorales du CHC (Hao et al., 2014).

6.4.54.5. La *O*-GlcNAcylation dans le CHC

Très peu d'études existent sur le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans le CHC. Il a initialement été montré par Zhu et collaborateurs que les patients récidivant après une greffe de foie, présentaient des niveaux élevés de *O*-GlcNAcylation par rapport aux patients qui n'ont pas rechuté. Dans la même étude, les auteurs ont montré que de faibles niveaux d'OGA sont en corrélation avec la récidive chez ces patients

ce qui suggère que l'OGA serait de bon pronostic dans le CHC (Zhu et al., 2012). De plus et comme décrit précédemment, il a été rapporté que l'OGT favorise le CHC en régulant le métabolisme de l'acide palmitique et que son inhibition induit l'arrêt de la prolifération des cellules de carcinome hépatocellulaire (W. Xu et al., 2017). Par ailleurs, il a été montré que la *O*-GlcNAcylation de HDAC1 joue un rôle important dans la pathogenèse de CHC en favorisant sa phosphorylation et son activité (Zhu et al., 2016). Une étude très récente a montré que l'OGT favorise la migration et l'invasion des cellules de CHC *via* la cavéoline-1 qui inhibe miR24, microARN ciblant l'OGT (Wang et al., 2021).

Partie 3 : La voie de signalisation mTOR

1. Caractéristiques générales

mTOR (mammalian/mechanistic target of rapamycin) est une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille des kinases PIKK (phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase) liées à PI3K. Chez les mammifères, mTOR constitue la sous-unité catalytique de deux complexes distincts appelés mTORC1 (mTOR complex 1) et mTORC2 (mTOR complex 2) qui se distinguent par les protéines qui les composent, leurs substrats et fonctions, ainsi que par leur sensibilité différentielle à la rapamycine, un macrolide bactérien, antifongique, anticancéreux et immunosuppresseur. Elle est extraite d'une algue récoltée sur l'île de Pâques (appelée aussi *Rapa-Nul*) (Yang et al., 2013).

mTORC1 est constitué de trois composants principaux : la sous-unité catalytique mTOR, la protéine mLST8 (mammalian lethal with SEC13 protein 8) (également connue sous le nom GβL (G protein β subunit-like)) et RAPTOR (regulatory-associated protein of mTOR). Alors que des données structurelles suggèrent que mLST8 stabilise le domaine kinase de mTOR (Yang et al., 2013), la délétion de cette protéine n'affecte pas la phosphorylation des substrats de mTORC1 (Guertin et al., 2006). Quant à RAPTOR, il est connu pour être essentiel à la bonne localisation de mTORC1 et peut également recruter ses substrats en liant les motifs TOR (target of rapamycin) présents sur plusieurs substrats de mTOR (Nojima et al., 2003). RAPTOR forme un complexe avec PRAS40 (proline-rich AKT substrate 40 KDa) qui agit comme un inhibiteur endogène de l'activité de mTORC1 (Sancak et al., 2007). D'autres études structurelles ont montré que l'activation du domaine kinase de mTOR se fait *via* la petite protéine G GTPase Rheb (Ras homolog enriched in brain) au niveau du lysosome (H. Yang et al., 2017). Des approches de co-cristallisation ont montré que l'inhibition de mTORC1 par le complexe rapamycine-FKBP12 se fait grâce au domaine de liaison FRB (FKBP12-rapamycin binding domain) de mTOR en bloquant partiellement l'entrée du substrat dans le site actif de la kinase (Yang et al., 2013; H. Yang et al., 2017).

Contrairement à mTORC1, mTORC2 conserve la capacité de phosphoryler ses substrats lors d'un traitement à la rapamycine. Comme pour mTORC1, le noyau de mTORC2 est formé de mTOR et mLST8. mLST8 est nécessaire pour la stabilité et le fonctionnement de mTORC2 (Guertin et al., 2006; Hwang et al., 2019). Au lieu de RAPTOR, mTORC2 se caractérise par la protéine RICTOR (RPTOR independent companion of mTOR complex 2 ou rapamycin-insensitive companion of rapamycin) qui, contrairement à RAPTOR, ne dirige pas les substrats de mTORC2 (Sarbassov et al., 2004), mais se lie à la protéine mSIN1 (mitogen-activated MAPKAP1 protein kinase-associated protein 1) interagissant avec MAPK (Q. Yang et al., 2006), DEPTOR (DEP (dishevelled, Egl-10 and pleckstrin domain) domain containing mTOR interacting protein) (comme pour mTORC1) (Peterson et al., 2009) et à la protéine associée à RICTOR (PROTOR 1/2) pour former le complexe mTORC2 (Pearce et al., 2007). Il est à noter que la protéine mSIN1 possède un domaine homologue à la pleckstrine qui se lie aux phospholipides ce qui pourrait aider l'association de mTORC2 à la membrane plasmique (Yuan and Guan, 2015). Enfin, des études structurelles ont montré que RICTOR bloque le site de liaison au complexe rapamycine-FKBP12 de mTOR, rendant ainsi mTORC2 insensible à l'inhibition aigüe par la rapamycine. Néanmoins, un traitement prolongé à la rapamycine induit tout de même l'inhibition de la signalisation mTORC2 (Sarbassov et al., 2006).

mTORC1 régule la croissance cellulaire grâce à la coordination de l'anabolisme des protéines, la biosynthèse des nucléotides, la lipogenèse, la glycolyse et l'autophagie dont les mécanismes seront détaillés un peu plus loin. En revanche, mTORC2 est impliqué dans la régulation du cytosquelette (Sarbassov et al., 2004), l'apoptose et le métabolisme du glucose par phosphorylation du résidu Ser473 d'AKT (Sarbassov et al., 2005). D'ailleurs, en activant AKT, mTORC2 est également impliqué dans la régulation de mTORC1 puisqu'AKT cible mTORC1 en inactivant par phosphorylation son inhibiteur TSC1/2 (tuberous sclerosis complex 1/2) (Inoki et al., 2002), et mTORC2 en phosphorylant mSIN1 (Humphrey et al., 2013).

Au cours de ma thèse, je me suis plus particulièrement intéressée à mTORC1. De ce fait, pour la suite de mon mémoire, je parlerai de mTOR pour faire référence à mTORC1.

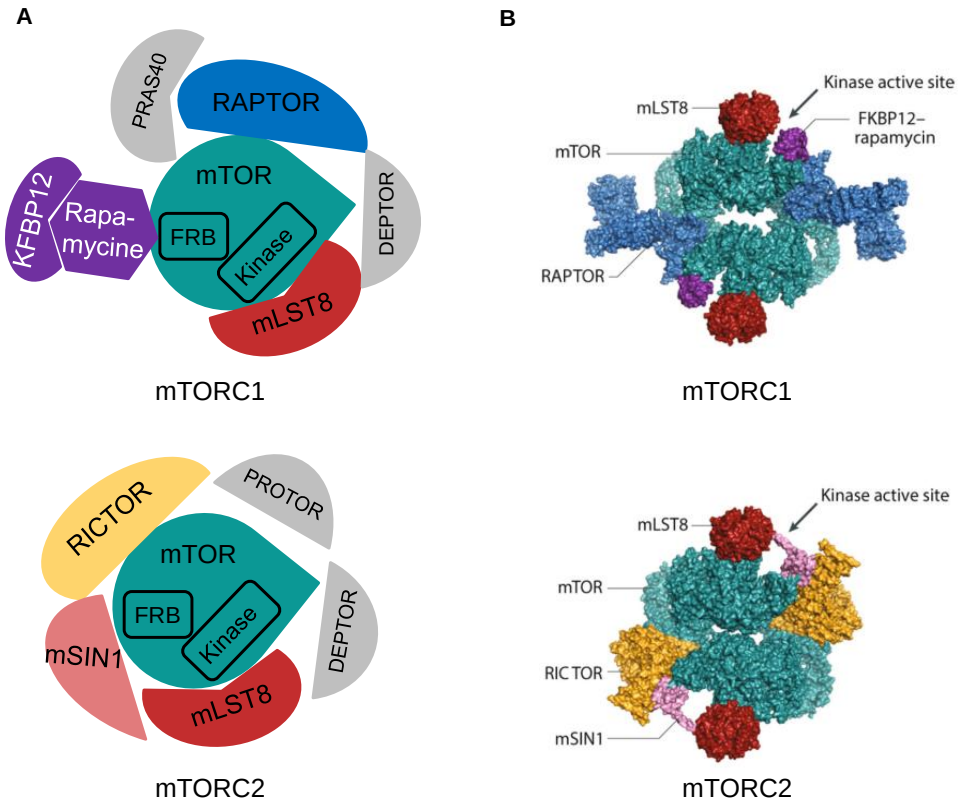


Figure 32 : Structures de mTORC1 et mTORC2. (**A**) Représentations schématiques des différents composants de mTORC1 et mTORC2. Pour les détails, voir texte. (**B**) Figure tirée de (Liu and Sabatini, 2020) reconstitution de mTORC1 (sans PRAS40 et DEPTOR) complexé avec FKBP12-rapamycine et de mTORC2 (sans PROTOR).

2. Fonctions régulées par mTOR

Comme discuté ci-dessus, mTOR joue un rôle primordial dans la prolifération cellulaire en régulant le métabolisme et l'autophagie.

2.1. Synthèse protéique

La synthèse protéique est régulée par mTOR qui, en réponse à la stimulation par les facteurs mitogènes et les acides aminés, phosphoryle et inhibe 4E-BP1, le répresseur du facteur d'initiation de la traduction eucaryote eIF4E (eukaryotic initiation factor 4E) (**Fig. 33**). eIF4E est ainsi libéré et la traduction des ARNm à motif 5'TOP (5'terminal oligopyrimidine tract) initiée (Hara et al., 1997). Les ARNm 5'TOP codent principalement des protéines ribosomales et des composants de la machinerie traductionnelle (Hannan et al., 2003). mTOR assure également la traduction en activant la protéine p70S6K, par phosphorylation du résidu Thr389, qui à son tour phosphoryle et active la protéine ribosomale S6 de la sous-unité 40S (Hannan et al., 2003) (**Fig. 33**). Il a été rapporté que la rapamycine inhibe la traduction des ARNm 5'TOP en bloquant les sites de phosphorylation de p70S6K (Jefferies et al., 1997). Il a également été montré que l'inhibition de mTOR à la fois par la rapamycine et la privation en nutriments induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Des résultats similaires ont été obtenus

lors de la surexpression de 4E-BP1. En revanche, la surexpression de p70S6K et eIF4E permet la progression en phase G1 du cycle cellulaire (Fingar et al., 2004).

2.2. Synthèse lipidique

Pour croître, les cellules doivent synthétiser des lipides afin de soutenir la biogenèse de nouvelles membranes. mTOR favorise la lipogenèse en régulant le facteur de transcription SREBP et PPAR-γ (peroxisome proliferator-activated receptor-γ). En effet, mTOR favorise l'activité transcriptionnelle de SREBP en phosphorylant son inhibiteur lipine-1 ce qui l'exclut du noyau (Peterson et al., 2011) (**Fig. 33**). De plus, mais sans connaitre le mécanisme exact, mTOR promeut la translocation nucléaire et la maturation de SREBP (Porstmann et al., 2008). Par ailleurs, mTOR induit l'expression de la FAS en phosphorylant STAT5 qui, en retour, interagit avec et promeut l'activation de SREBP dans un modèle murin de CHC (Li et al., 2019). En outre, mTOR régule l'expression de la FAS en induisant le facteur de transcription SREBP, ce qui favorise la prolifération des cellules cancéreuses mammaires dans des conditions d'hypoxie (Furuta et al., 2008). Enfin, il a été montré que l'inhibition de mTOR perturbe l'expression des gènes de l'homéostasie lipidique contrôlés par PPAR-γ (Kim and Chen, 2004) (**Fig. 33**).

2.3. Synthèse nucléotidique et homéostasie énergétique

Pour maintenir la réplication de l'ADN et la synthèse des ARNr dans les cellules en prolifération, mTOR régule la biosynthèse des nucléotides. Il a été rapporté que mTOR contrôle la synthèse *de novo* des purines en activant le facteur de transcription ATF4 (activating transcription factor 4) et sa cible MTHFD2 (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2) (Ben-Sahra et al., 2016) (**Fig. 33**). mTOR contrôle également la phosphorylation et l'activation de CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamoylase, dihydro-orotase), enzyme limitante de la biosynthèse des pyrimidines (Ben-Sahra et al., 2013). Enfin, mTOR régule la voie des pentoses phosphate qui génère le NADPH,H^+ et le ribose impliqués dans la lipogenèse et la synthèse des acides nucléiques respectivement (Düvel et al., 2010) (**Fig. 33**).

Outre ses effets directs sur les enzymes biosynthétiques, mTOR potentialise également la croissance cellulaire en générant de l'énergie. Ceci, se fait *via* l'induction du facteur hypoxique HIF1α qui augmente l'expression des enzymes glycolytiques et favorise la glycolyse aérobie (He et al., 2018) (**Fig. 33**).

2.4. Inhibition de l'autophagie

Afin d'éviter la dégradation prématurée des composants cellulaires nouvellement synthétisés, mTOR bloque l'autophagie en inhibant, par phosphorylation, ULK1 et ATG13 (autophagy-related protein 13), les deux facteurs clés d'induction de l'autophagie. ULK1 et ATG13, en se complexant à d'autres

protéines, forment l'autophagosome. Leur phosphorylation par mTOR bloque ce processus permettant ainsi l'accumulation des protéines et des organites au lieu d'êtres dégradés et recyclés (Hosokawa et al., 2009; Ganley et al., 2009) (**Fig. 33**). De manière intéressante, l'inhibition de mTOR par privation en nutriments ou traitement à la rapamycine, induit l'activation des autophagosomes et des gènes impliqués dans la biogenèse des lysosomes qui, une fois formés, permettent la dégradation des protéines et la libération des acides aminés dans le cytoplasme, réactivant ainsi la voie mTOR en réponse à une privation nutritionnelle prolongée (Yu et al., 2010; Settembre et al., 2012).

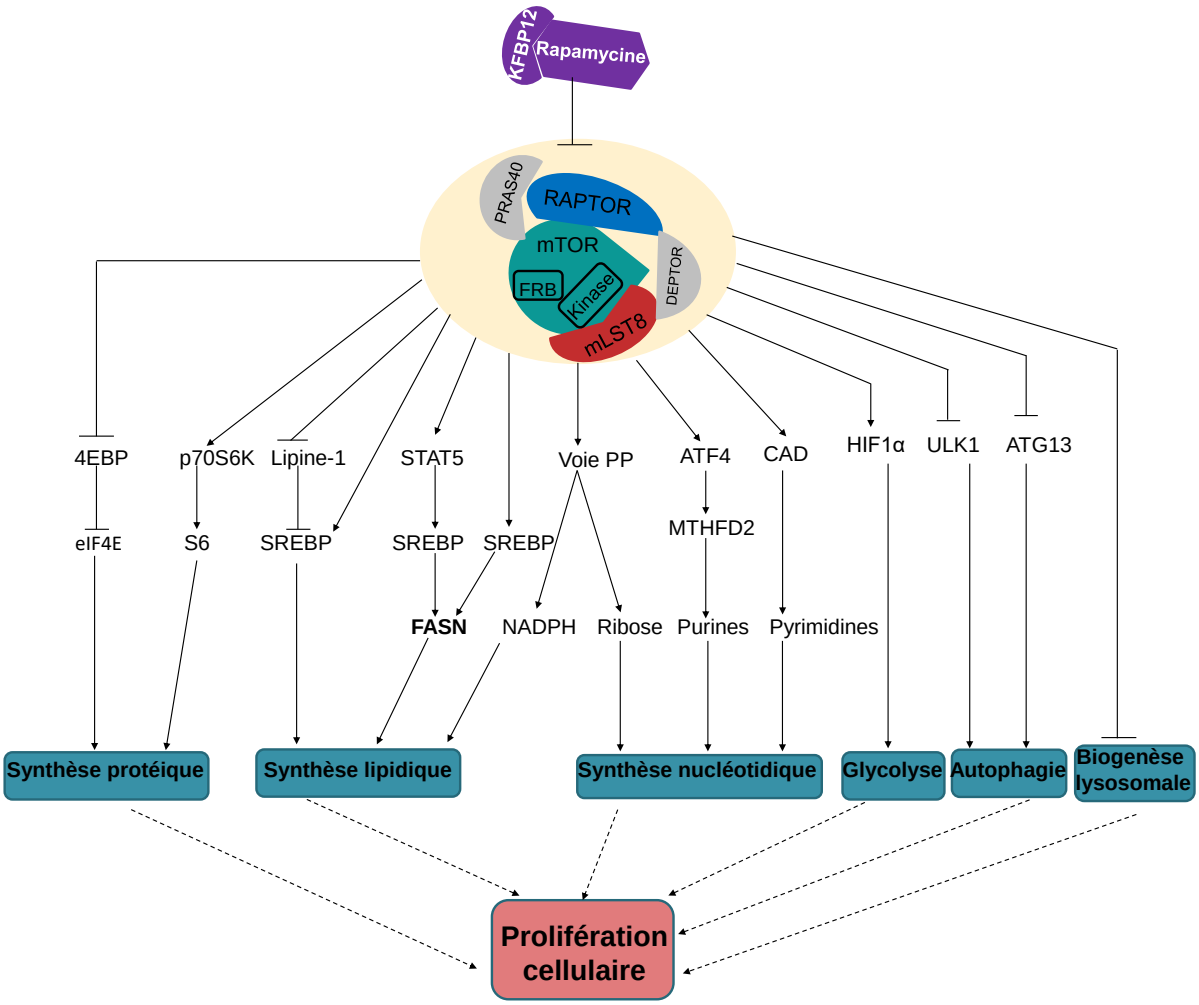


Figure 33 : Les fonctions de mTOR. mTOR favorise la prolifération cellulaire *via* plusieurs mécanismes. Pour les détails, voir texte.

3. Régulation de l'activité de mTOR

En réponse aux facteurs de croissance ou autres facteurs mitogènes, une cascade de phosphorylations se met en place, permettant l'activation de la kinase AKT qui en retour active tout un ensemble de processus (***cf 6.4 page 79***). Ainsi, la phosphorylation inhibitrice de de TSC1/2 par AKT active mTOR (Inoki et al., 2002). En revanche, lors de l'élévation du ratio AMP/ATP, l'AMPK phosphoryle et active

TSC1/2 conduisant à l'inhibition de mTOR (Dibble and Manning, 2013). Une étude *in vitro* a rapporté qu'en présence d'insuline, AKT active mTOR en phosphorylant et inhibant PRAS40, l'inhibiteur endogène de mTOR qui s'associe à RAPTOR et supprime l'activation de mTOR induite par Rheb (Vander Haar et al., 2007). En réponse à la stimulation par les acides aminés, mTOR est recrutée à la surface lysosomale où elle est activée par Rheb (H. Yang et al., 2017). De manière surprenante, la privation en glucose favorise l'activation de la voie mTOR et la synthèse protéique dans des cellules musculaires squelettiques de rat (Miniaci et al., 2015).

Plusieurs études ont montré une régulation réciproque entre la voie PI3K/AKT/mTOR et la *O*-GlcNAcylation. Comme décrit plus haut, en réponse à l'insuline l'OGT est transloquée du noyau vers la membrane plasmique où elle interagit avec les PIP3 *via* son domaine PPO (Yang et al., 2008). L'activation du facteur de transcription c-Myc par la voie mTOR stabilise l'OGT *via* la chaperonne Hsp90A (Sodi et al., 2015). En retour, l'OGT *O*-GlcNAcyle plusieurs acteurs de la voie mTOR, tels que IRS-1, PI3K, PDK1, AKT, AMPK, 4E-BP1 et p70S6K. En revanche, l'impact de cette *O*-GlcNAcylation sur la signalisation mTOR n'est pas totalement décrit. Par exemple, la *O*-GlcNAcylation d'IRS-1 et AKT (Park et al., 2005) inhibe leur activité soit en perturbant leur interaction avec PI3K et PDK1 respectivement (études menées dans les adipocytes 3T3-L1 et les cellules du cancer du sein MCF-7), soit par un mécanisme de compétition Yin-Yang avec la phosphorylation (Park et al., 2005). La *O*-GlcNAcylation améliore également la stabilité de 4E-BP1 *in vitro* et *in vivo* dans la rétine de rat en empêchant sa dégradation dépendante du système phosphorylation-ubiquitinylation (Miller et al., 2016). Enfin, il a été montré par mon équipe que l'inhibition de la *O*-GlcNAcylation affecte l'activation de la voie mTOR dans des cellules cancéreuses coliques. La signalisation mTOR est à la fois dépendante du flux HBP et des niveaux de *O*-GlcNAcylation (Very et al., 2018).

Enfin, il a été montré que l'inhibition pharmacologique de la FAS , dans des cellules cancéreuses ovariennes, inhibe l'activation de la voie mTOR et ce à de multiples niveaux (Wagner et al., 2017). Dans une autre étude, Bruning et collaborateurs ont rapporté que l'inhibition de la FAS induit l'accumulation de son substrat, le malonyl-CoA, qui inhibe mTOR en la modifiant sur le résidu Lys1218, altérant ainsi sa phosphorylation activatrice et par conséquent l'angiogenèse (Bruning et al., 2018).

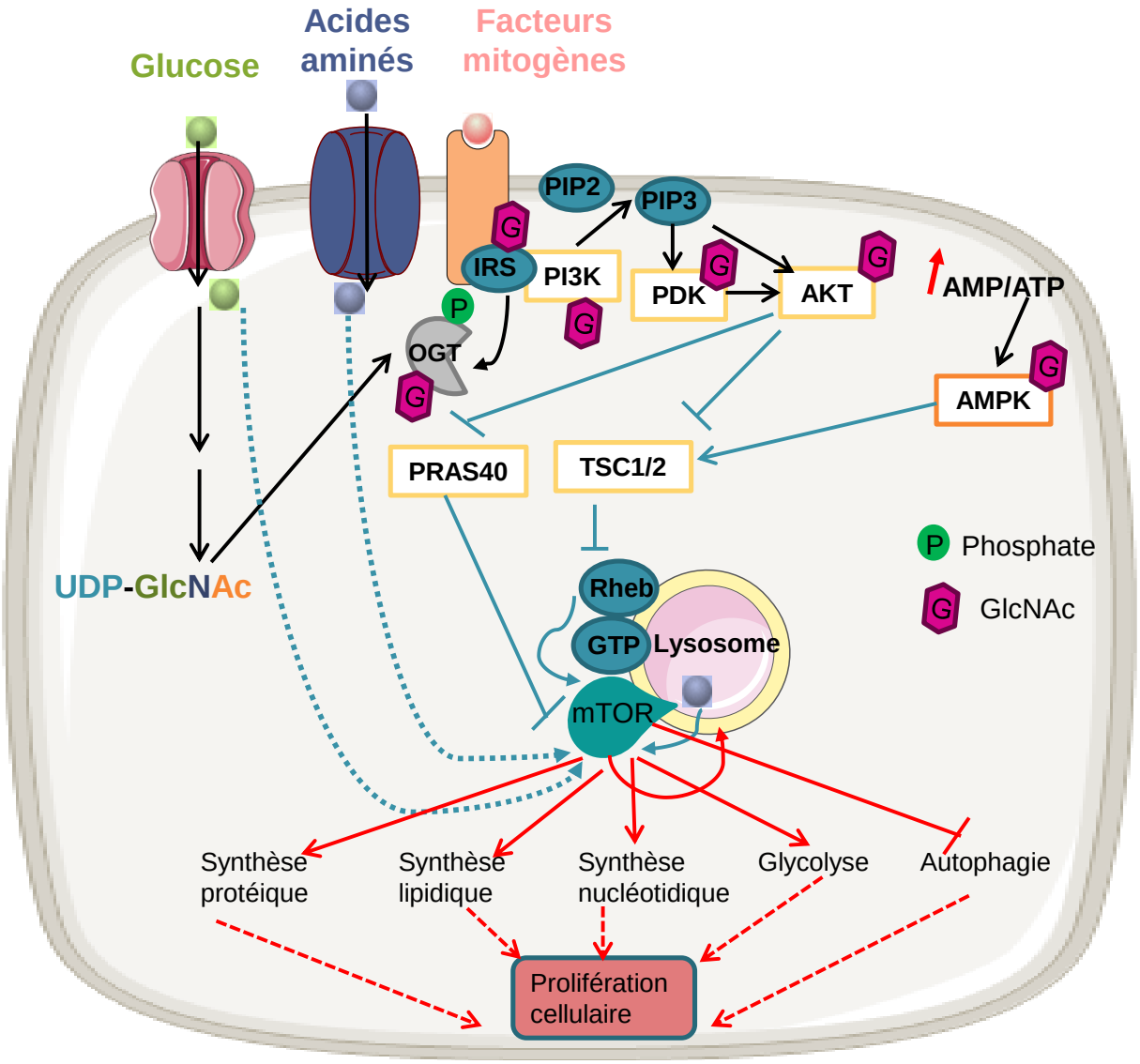


Figure 34 : Activation de la voie mTOR. La voie mTOR est activée en réponse aux nutriments et aux facteurs mitogènes. Pour les détails, voir texte.

4. mTOR dans le cancer

La voie mTOR est hyperactive dans 80 % des cancers où elle joue un rôle central dans le maintien de la croissance et de la survie des cellules cancéreuses (Grabiner et al., 2014). Il a été montré que la suractivation de la voie mTOR dans un modèle murin de délétion de TSC1 était suffisante pour induire le CHC (Menon et al., 2012). De plus, Zhou et collaborateurs ont rapporté que la voie mTOR était associée au grade avancé et à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CHC (Zhou et al., 2010).

Bien qu'elle soit peu ou pas mutée elle-même, mTOR est hautement régulée en amont par l'oncogène PIK3CA (sous-unité catalytique de PI3K) et le surpresseur de tumeur PTEN fréquemment mutés dans

le cancer (Wong et al., 2010). Des lésions génétiques codant Ras, AKT, TSC2, Notch et les récepteurs tyrosines kinase favorisent également l'activation de la voie mTOR (Shaw and Cantley, 2006). Par conséquent, la suractivation de mTOR due à une ou plusieurs de ces mutations fait de cette kinase une cible attractive dans le traitement du cancer.

L'utilisation clinique de la rapamycine (appelée sirolimus) est limitée par sa faible solubilité et stabilité dans l'eau. Les rapalogues, analogues de la rapamycine, possédant des propriétés pharmacocinétiques améliorées sont les inhibiteurs cliniques de première génération qui inhibent l'activité de mTOR dans divers cancers (Meng and Zheng, 2015). Par exemple, l'évérolimus a été approuvé pour le traitement des carcinomes rénaux avancés (Motzer et al., 2008; Buti et al., 2016). Il permet également de prolonger la survie des patients atteints de tumeurs neuroendocrines pancréatiques avancées (Yao et al., 2011). De plus, l'évérolimus est le premier médicament approuvé pour traiter les tumeurs pulmonaires et gastro-intestinales progressives (Yao et al., 2016). Le temsirolimus est un autre paralogue utilisé pour le traitement du carcinome rénal avancé (Hudes et al., 2007) qui améliore la survie chez les patients atteints de lymphome (Hess et al., 2009). Enfin, le ridaforolimus est le plus récent paralogue ; il a été utilisé dans le traitement des sarcomes. En revanche, un essai international en phase III a montré que le ridaforolimus ne retarde que faiblement la progression tumorale chez les patients atteints de sarcome métastatique (Demetri et al., 2013).

Ces paralogues n'inhibent que partiellement mTOR et, dans divers cancers, il a été montré qu'ils n'apportent pas d'avantages particuliers et n'améliorent pas la survie des patients (Zhu et al., 2014; Ohtsu et al., 2013). Par ailleurs, leur utilisation en association avec les inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinase a montré une activité antitumorale chez les patientes atteintes du cancer du sein résistantes au trastuzumab (Gandhi et al., 2014). En revanche, le problème de cette combinaison se manifeste par une toxicité élevée (Gandhi et al., 2014). Enfin, les inhibiteurs de mTOR de deuxième génération comprennent les molécules qui ciblent directement le site actif de la kinase. Les premiers essais cliniques ont montré que ces inhibiteurs peuvent être tolérés à des doses efficaces. Cependant, un traitement prolongé pourrait induire une résistance et par conséquent la réactivation de la voie mTOR (Rodrik-Outmezguine et al., 2016; Fan et al., 2017).

Partie 4 : La prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire est une des activités biologiques fondamentales et indispensables au développement, l'homéostasie et la régénération tissulaire. La séquence d'étapes se succédant au cours de la prolifération cellulaire est appelée cycle cellulaire aboutissant à la division cellulaire. Ce dernier se déroule suivant une chronologie bien définie et sa durée est variable selon le type cellulaire, en moyenne 24 heures pour des cellules humaines en culture (Rieder, 2011). La division cellulaire est

le processus fondamental par lequel une cellule-mère donne deux cellules-filles génétiquement et morphologiquement identiques entre elles et à la cellule-mère. Chez les mammifères, la division cellulaire implique des évènements moléculaires contrôlés et structurés en deux périodes distinctes : l'interphase, la période la plus longue du cycle cellulaire durant laquelle les chromosomes sont répliqués, et la mitose qui est la division proprement dite des cellules grâce à laquelle la ségrégation des chromosomes répliqués entre les deux cellules-filles est réalisée. La phase G0, quant à elle, est une période au cours de laquelle les cellules ne se divisent pas, elles sont dites en quiescence. Sous l'effet de signaux mitogènes, les cellules entament un cycle de division (**Fig. 35**)

1. Les phases du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est classiquement divisé en quatre phases, les trois premières constituant l'interphase.

Concernant la première phase, la phase G1 (Gap 1 ; Gap signifie intervalle), les cellules passent par le point de restriction R, sorte de point de non-retour à partir duquel le cycle est irréversiblement engagé et l'entrée en division ne dépend plus de la présence de facteurs mitogènes. G1 est composée de deux parties réparties de part et d'autre de R : la première partie est connue sous le nom de G1-pm pour G1-post mitotique, dépendante des facteurs mitogènes, et la deuxième partie connue sous le nom de G1-ps pour G1-pré-S indépendante des facteurs mitogènes (**Fig. 37**) (Zetterberg et al., 1995). La phase G1 prépare la cellule à la division : la taille de la cellule augmente pour induire la transcription des gènes et la synthèse des protéines nécessaires à la prochaine phase, la phase S (Schafer, 1998). C'est au cours de cette phase que l'ADN est répliqué, passant de 2n à 4n chromosomes, afin d'assurer le transfert du matériel génétique à chacune des cellules-filles. Les cellules continuent à transcrire activement les gènes des protéines nécessaires à leur survie et au maintien des fonctions spécialisées (Baserga, 1962). Une fois la phase de réplication terminée, la cellule entre en phase G2 (Gap 2), phase de préparation et de croissance de la cellule avant d'entrer en phase M, ou mitose. Au cours de cette dernière phase, les chromosomes dédoublés sont répartis dans les deux cellules-filles. Cette phase M est découpée en cinq périodes : la prophase, durant laquelle, les chromosomes se condensent, les centrosomes préalablement dupliqués migrent vers les deux pôles opposés de la cellule, et se termine par la rupture de l'enveloppe nucléaire ou NEBD (nuclear envelope breackdown) et la formation du fuseau mitotique durant la prométaphase. S'enchaîne alors la métaphase qui correspond au rassemblement des chromosomes condensés à 2 chromatides à l'équateur de la cellule pour former la plaque équatoriale, avant d'être séparés pendant l'anaphase. Enfin, la télophase qui correspond à la disparition du fuseau mitotique suivie d'une décondensation des chromosomes. Une nouvelle enveloppe nucléaire va se former autour des chromosomes et autres composants nucléaires ; se

mettra alors en place la cytokinèse ou division cytoplasmique, qui se traduit par la séparation physique des cellules-filles nouvellement formées. Les cellules-filles peuvent alors entamer un autre cycle cellulaire ou quitter le cycle et entrer en quiescence sous l'effet de signaux anti-mitogènes ou suite à la disparition des agents mitogènes (Rieder, 2011).

2. Les points de contrôles du cycle cellulaire

Les quatre phases s'enchainent de façon coordonnée, une phase ne peut commencer que lorsque la précédente s'est déroulée correctement. De nombreux mécanismes de contrôles « *checkpoints* » assurent une sorte de contrôle de qualité à chaque étape et bloquent le déroulement du cycle cellulaire lorsqu'une anomalie est détectée. A ce jour, il existe trois points de contrôle : le point de contrôle G1/S, ou point R (discuté plus haut), le point de contrôle G2/M ou point de contrôle de la réplication de l'ADN, et le point de contrôle de métaphase/anaphase, également connu comme point de contrôle de la broche. Le point R est principalement influencé par les facteurs de croissance, la taille et le statut nutritionnel des cellules et les dommages à l'ADN. Quant au point de contrôle de la réplication de l'ADN, il est influencé par une mauvaise réplication et des dommages à l'ADN. Enfin, le point de contrôle métaphase/anaphase est influencé par l'attachement chromosomique au fuseau mitotique (**Fig. 35**).

Le principal mécanisme d'action des points de contrôle du cycle cellulaire se fait par les variations d'activités de protéines-kinases spécialisées. Celles-ci sont constituées de deux sous-unités : une sous-unité catalytique appartenant à la famille des CDK et une sous-unité régulatrice, nécessaire à l'activité appartenant à la famille des cyclines (Morgan, 1997).

3. Régulation du cycle cellulaire par les complexes cycline-CDK

La synthèse et la destruction des cyclines se déroulent tout au long du cycle cellulaire, de ce fait, les CDK ne sont activées qu'à certains moments du cycle cellulaire (Irniger, 2002). Une fois activées par les cyclines, les CDK phosphorylent des substrats spécifiques qui déclenchent les évènements du cycle et de la division cellulaire. Les complexes cyclines-CDK sont régulés par les points de contrôle pendant le cycle cellulaire. Ces points de contrôle, comme mentionné ci-dessus, sont chargés de s'assurer que chaque processus antérieur a été correctement terminé avant que la cellule ne passe à la phase suivante du cycle cellulaire et ce, en activant un complexe cycline-CDK. En revanche, l'activation d'un point de contrôle, signifiant qu'une erreur a été détectée, induit l'arrêt du cycle cellulaire dans sa phase actuelle en bloquant l'activité cycline-CDK, ce qui empêche une reproduction cellulaire incorrecte (WENZEL and SINGH, 2018).

Chez l'Homme, neuf membres de la famille des CDK ont été identifiées, et il existe autant de groupes de cyclines, chacun comportant plusieurs variants. CDK4 et CDK6, associées à des cyclines de type D, régulent le déroulement de la phase G1. Puis CDK2/cycline E prend le relais pour assurer la transition G1/S, suivie par CDK2/cycline A qui assure le contrôle de la phase S. CDK1/cycline A intervient en G2 et CDK1/cycline B régule la transition G2/M et l'entrée en mitose (**Fig. 35**) (Pines, 1995).

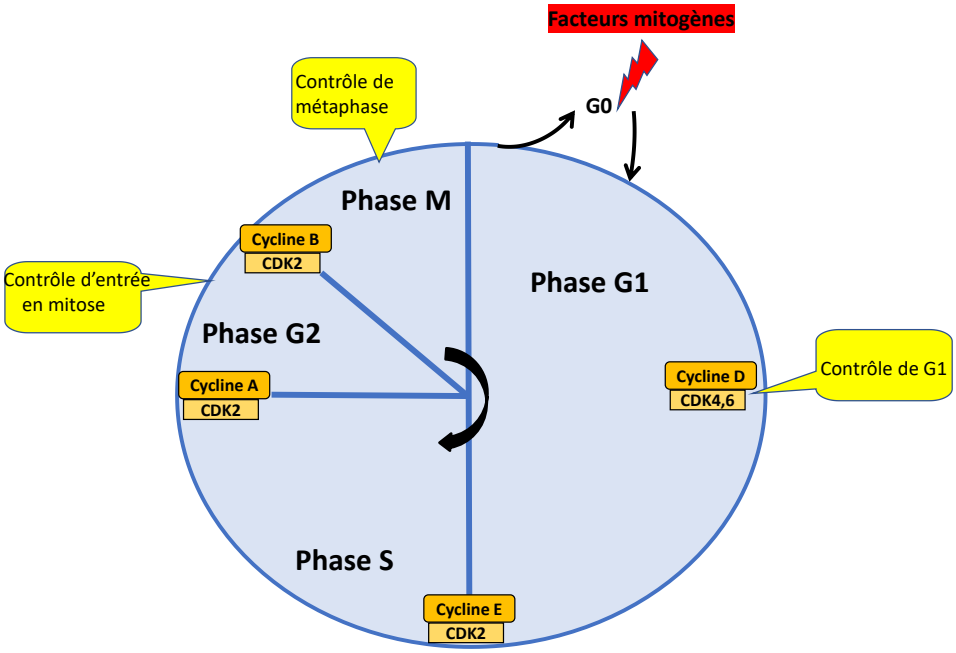


Figure 35 : **Les différentes phases du cycle cellulaire ainsi que leur régulation**. Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases qui se succèdent : G1, S, G2 et M. Sous l'influence de facteurs mitogènes, les cellules en G0 (dites quiescentes) reçoivent un signal de division et entrent en G1. Entre ces différentes étapes se situent des points de contrôle qui assurent le bon fonctionnement du cycle cellulaire. Ceci fait intervenir des complexes Cyclines/CDK à chaque phase du cycle cellulaire.

3.1. La transition G0/G1

Les facteurs de croissance agissent principalement en phase G0 et G1. Au début de G1 (G1-pm), la suppression des facteurs de croissance entraine la restauration des cellules en G0. En revanche, en fin G1 (G1-ps), lorsque les cellules ont dépassé le point R, les cellules continuent de progresser en phase S malgré l'élimination des facteurs de croissance (Schafer, 1998). Les facteurs mitogènes dont les facteurs de croissance agissent, en général, par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires de type tyrosine kinase. Ceci, entraine l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT (**Fig. 36**). Ces cascades conduisent à la stimulation de la transcription des gènes essentiels pour l'entrée en division, en particulier les cyclines D et CDKs (Jones and Kazlauskas, 2001). Ceci passe en partie par l'activation de l'oncogène Myc qui forme un hétérodimère avec la protéine Max et active la transcription des gènes des cyclines D et E, CDC25A (cell division cycle 25A), CDK4 et E2F (Pajic et al., 2000) (**Fig. 36**).

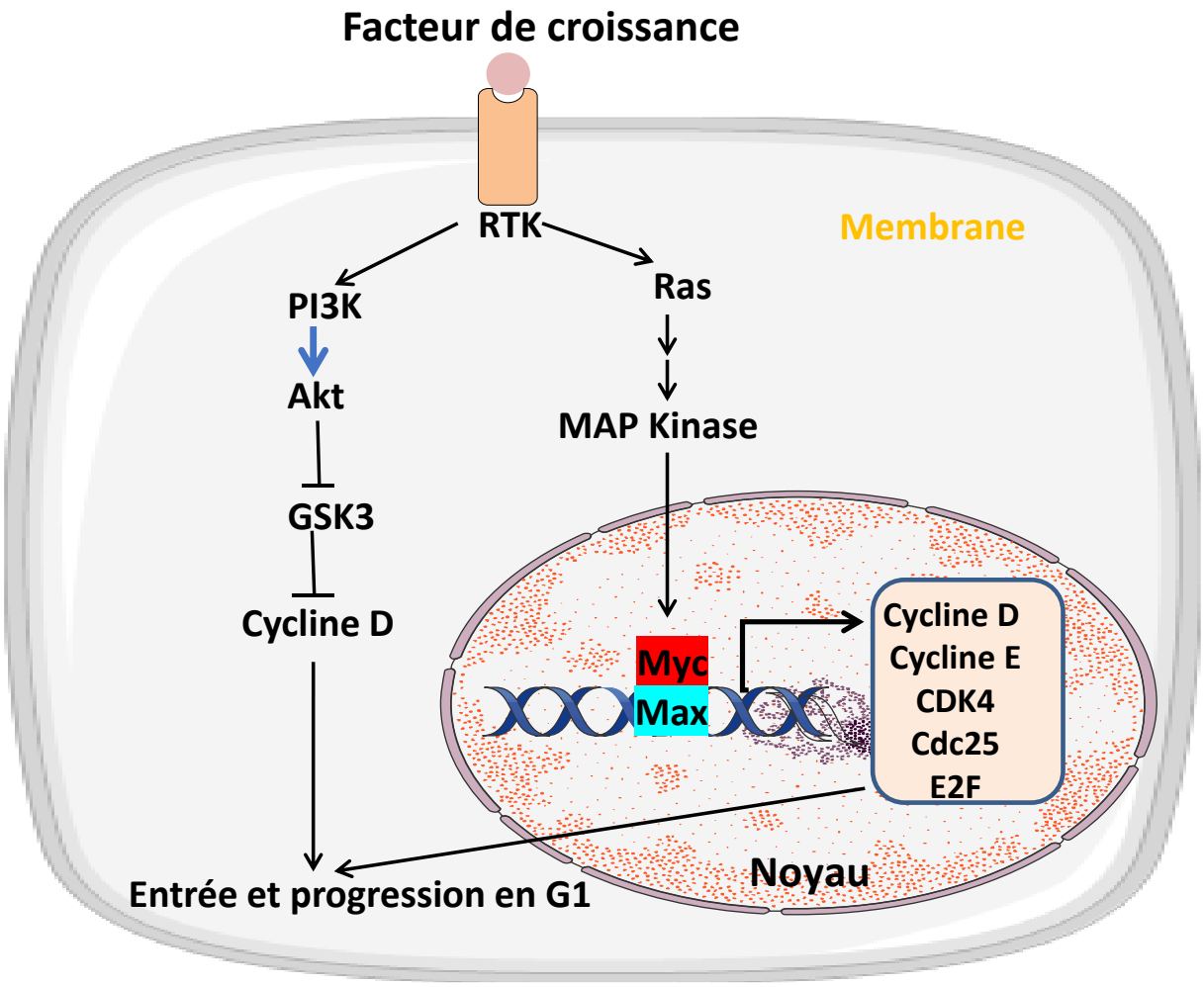


Figure 36 : **Activation de la phase G1 du cycle cellulaire**. En réponse aux facteurs de croissance, il y a activation des voies de signalisation Ras-MAPK et PI3K/AKT activant l'expression des gènes impliqués dans l'entrée en G1.

3.2. La transition G1/S

Les cellules sont maintenues en G1 grâce aux protéines de la famille du rétinoblastome, pRb (protéine du rétinoblastome), p107 et p130, connues sous le nom de protéines de poche (*pocket proteins*) et jouant le rôle de suppresseurs de tumeurs. À l'état hypophosphorylé, ces suppresseurs de tumeurs bloquent le cycle cellulaire en s'associant et séquestrant le facteur de transcription E2F.

Au cours de G1, les CDK4-6, associées aux cyclines D, initient la phosphorylation de pRb, le complexe pRb/E2F se dissocie et libère le facteur E2F, actif. Une phosphorylation supplémentaire de pRb par CDK2/cycline E libère totalement E2F assurant une activité maximale d'activateur transcriptionnel de gènes impliqués dans la transition G1/S et de gènes contrôlant la réplication tels que MCM (minichromosome maintenance) et cdc6 nécessaires à la synthèse d'ADN. En fin de phase G1, la synthèse de cycline A démarre pour former un complexe avec CDK2. Le complexe CDK2/cycline A régule la progression de la cellule en phase S *via* la phosphorylation de pRb (**Fig. 37**). Les facteurs de

transcription E2F se lient à l'ADN pour induire la transcription des gènes nécessaires à la progression en phase S (Xu et al., 1994).

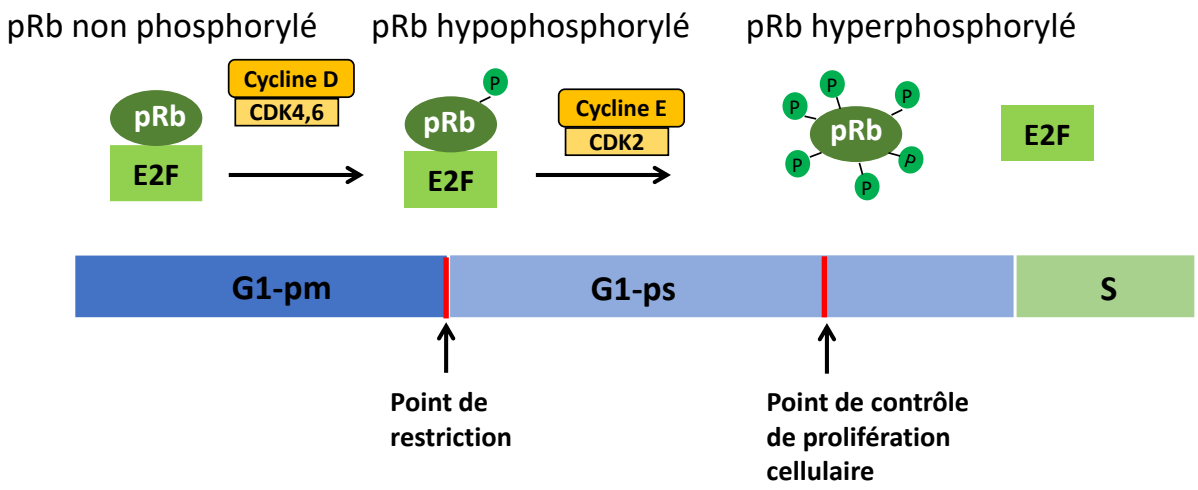


Figure 37 : **Régulation de pRb et progression du cycle cellulaire en phase G1**. PRb existe dans différents états de phosphorylation : non phosphorylé, hypophosphorylé et hyperphosphorylé. L'état hypophosphorylé est produit suite à la phosphorylation par les complexes cycline D/CDK4,6, pRb reste associé au facteur de transcription E2F incapable d'activer la transcription. PRb est ensuite hyperphosphorylé après activation complexe cycline E/CDK2. A ce stade, pRb se dissocie de E2F qui peut alors initier la transcription des gènes nécessaires à la progression en phase S. G1-pm, pour G1 post-mitotique, et G1-ps, pour G1 pré-S, constituent les deux parties de G1 de part et d'autre du point R.

3.2.1. Inhibition de la transition G1/S

Si l'ADN est endommagé, la transition G1/S est bloquée par des mécanismes de surveillance de l'ADN, c'est le point de contrôle de la réplication de l'ADN. Ces mécanismes aboutissent d'une part à la dégradation de Cdc25A *via* sa phosphorylation par la kinase Chk1, ce qui induit l'arrêt du cycle cellulaire puisque les complexes Cycline D/CDK4 et Cyclines E, A/CDK2 ne peuvent plus être activés par Cdc25A (**Fig. 38**). Les CDK sont maintenues dans un état inactif par phosphorylation par des protéines kinases de la famille de Week1, Mik1 ou Myt1. L'étape limitante pour leur activation se fait *via* leur déphosphorylation par Cdc25A (Donzelli and Draetta, 2003).

L'autre mécanisme de surveillance passe par l'accumulation du suppresseur de tumeur p53. La phosphorylation de p53 par les kinases effectrices Chk2 ou Chk1, empêche sa liaison à Mdm2 (murine double minute-2), une ubiquitine ligase qui neutralise p53 en activant sa dégradation protéasomale. P53 stable induit alors l'expression de p21, inhibiteur des complexes cyclines E, A/CDK2 bloquant la transition G1/S (**Fig. 38**). P53 induit également la transcription des enzymes de réparation de l'ADN (Wesierska-Gadek et al., 2005).

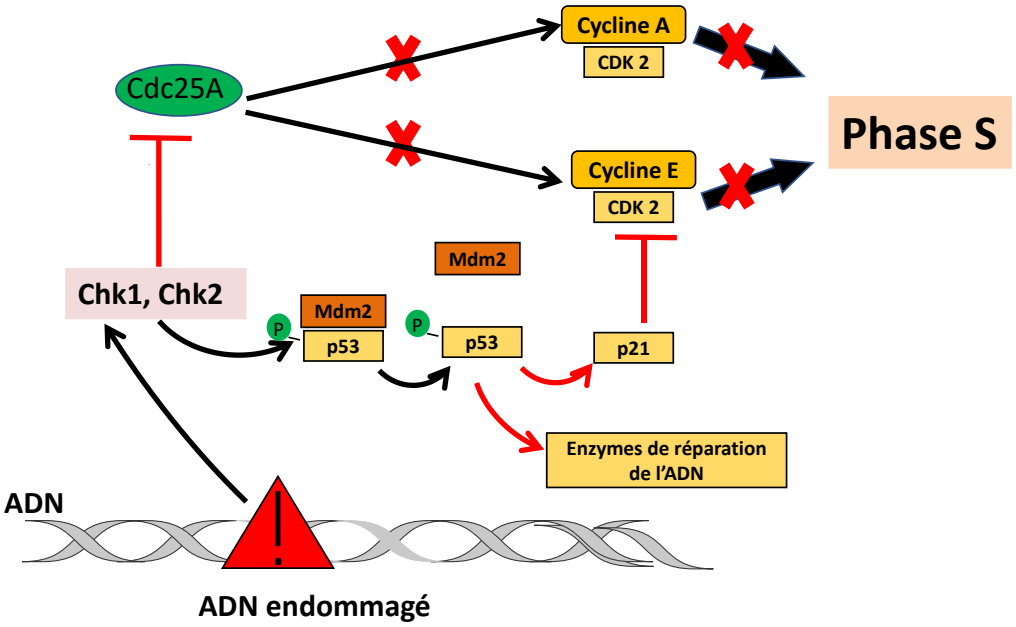


Figure 38 : **Surveillance de la transition G1/S**. Si l'ADN est endommagé, l'activation de deux voies inhibitrices des complexes Cyclines/CDK de la phase S permet d'arrêter le déroulement de la phase S.

3.3. La transition G2/M

La phase G2 est souvent présentée comme une phase de préparation à la mitose. C'est la phase durant laquelle se fait la réplication des centrosomes mais la séparation des chromosomes-frères n'est pas encore réalisée. La transition G2/M est contrôlée par la kinase CDK1/cycline B. En revanche, des études ont montré que la kinase CDK1/cycline A exprimée en G2 est le véritable facteur déclencheur de l'entrée en mitose (Vigneron et al., 2018). En effet, le complexe CDK1/cycline A phosphoryle la protéine kinase Bora, puis Aurora A, et favorise l'activation, par phosphorylation, de la kinase Plx1. Cette kinase phosphoryle et active la phosphatase Cdc25C qui à son tour active CDK1/cycline B suivie de l'entrée des cellules en mitose (Vigneron et al., 2018). Après la mitose, les cellules filles peuvent soit quitter le cycle cellulaire pour se développer, atteindre leur maturation et éventuellement mourir, soit passer en phase de repos (G0) et revenir plus tard dans le cycle cellulaire en réponse à un stimulus externe.

Comme pour la phase S, G2 connait un point de contrôle de dommage à l'ADN. Ce point de contrôle veille à ce que la mitose ne soit pas amorcée tant que la réplication n'est pas totalement achevée ou des lésions détectées dans l'ADN répliqué pas réparées. Pour cela, deux mécanismes se mettent en place pour bloquer le processus d'activation de CDK1. Tout d'abord, en réponse à divers types de dommage à l'ADN, il y a activation de la protéine ATM (ataxia telangiectasia mutated) qui phosphoryle la kinase Chk1. Une fois phosphorylée, Chk1 empêche les cellules endommagées d'entrer en mitose en inactivant, par phosphorylation, la phosphatase Cdc25C. Chk2 est également activée par ATM en réponse à des cassures d'ADN simple ou double brin et, par conséquent elle phosphoryle et active p53

qui induit la transcription de p21, provoquant l'inhibition du complexe cycline B/CDK1 et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (**Fig. 39**) (Prasad Tharanga Jayasooriya et al., 2018).

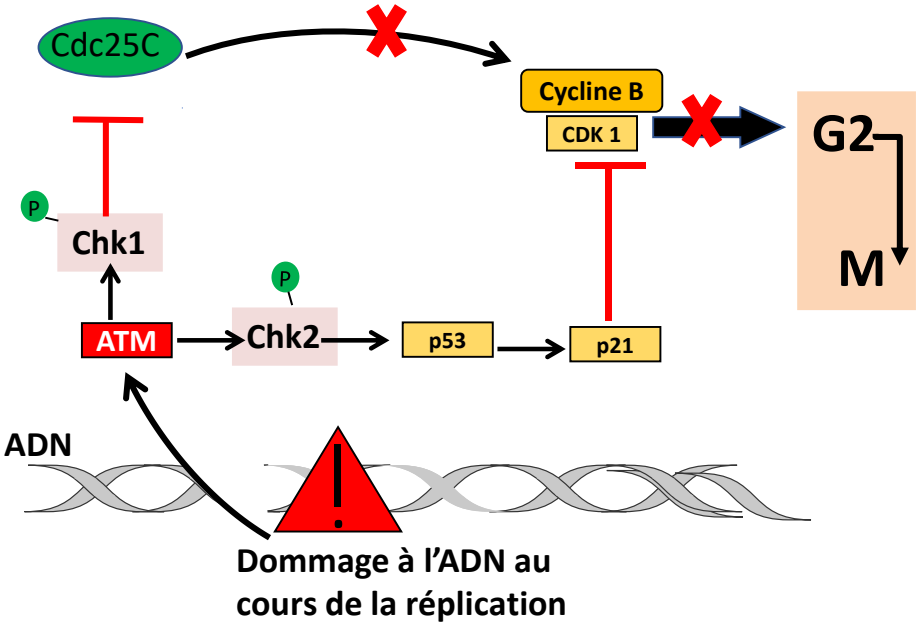


Figure 39 : **Surveillance de la réplication de l'ADN en phase G2**. Dans une situation où l'ADN est lésé, ou la réplication inachevée, des voies inhibitrices du complexe Cycline B/CDK1 sont activées, bloquant l'entrée en mitose.

3.4. La transition métaphase/anaphase

En métaphase (après la réplication), les chromatides restent associés grâce à des complexes protéiques connus sous le nom de cohésines. En début d'anaphase, la cohésine est détruite par une protéase, la séparase, maintenue sous forme inactive par association avec une autre protéine, la sécurine. C'est l'APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) lié à la protéine cdc20 qui permet l'ubiquitination de la sécurine et sa dégradation protéasomale conduisant à l'activation de la séparase.

Chaque kinétochore non correctement attaché au fuseau envoie un signal inhibiteur bloquant l'activation d'APC-cdc20. Ce signal correspond à la protéine Mad2 : un seul kinétochore mal attaché induit la liaison de Mad2 sur le complexe APC-cdc20, l'inhibant. Donc, Mad 2 maintient l'inhibition de la sécurine sur la séparase ce qui bloque la transition vers l'anaphase (Orr et al., 2007).

4. Dérégulation du cycle cellulaire et cancer

Un cancer survient à partir d'une cellule normale altérée par un certain nombre d'anomalies et de mutations d'ADN qui ne sont pas réparées par les processus habituels cités ci-dessus. La cellule devient anormale et, si elle n'est pas détruite, se multiplie pour former une tumeur. La mutation de gènes critiques, notamment les gènes suppresseurs de tumeurs, des oncogènes et des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, conduit à une instabilité génétique et à une perte progressive de la

différenciation. Les cellules transformées perdent leur capacité d'interaction et présentent une croissance anarchique et incontrôlée. L'évolution se fait d'abord localement, puis s'étend *via* le sang et la lymphe ailleurs dans l'organisme où se forment les métastases.

4.1. La dérégulation des acteurs du cycle cellulaire

Les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs jouent un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire, particulièrement ceux des voies p53 et pRb impliqués dans les points de contrôle.

4.1.1. p53 et Mdm2

Comme décrit ci-dessus, le gène suppresseur de tumeur p53 répond aux dommages à l'ADN au cours de la phase G1 et initie la transcription de p21, protéine qui inactive des CDKs nécessaires à la phosphorylation de pRb, et donc empêche la progression vers la synthèse d'ADN (**Fig. 38**) (Wesierska-Gadek et al., 2005). P53 est également impliqué dans l'apoptose en cas de dommages non réparés (Clarke et al., 1994). Les mutations de p53 sont extrêmement courantes dans le cancer et entrainent une diminution de transcription de p21. Ceci induit donc un dysfonctionnement dans l'arrêt en G1 même en présence de dommages à l'ADN. Par conséquent, les mutations ou les dommages deviennent permanents dans le génome (Greenblatt et al., 1994). L'association de p53 avec l'oncogène Mdm2 induit la dérégulation du point de contrôle en bloquant p53. Mdm2 peut donc surmonter les propriétés inhibitrices de croissance régulées par p53 (Finlay, 1993) (**Fig. 40B**).

4.1.2. pRb et p16

La mutation de pRb, dont le mécanisme d'action et de régulation ont été décrits ci-dessus, dans les cellules du cancer du col de l'utérus HeLa, entraine sa dissociation du facteur de transcription E2F et son activation, induisant alors la transcription non contrôlée de ses gènes cibles et l'activation du cycle cellulaire. Il a été montré que l'oncoprotéine virale E1A se lie à pRb et l'inactive ce qui active E2F et la progression du cycle cellulaire (Arroyo and Raychaudhuri, 1992) (**Fig. 40A**).

Un autre mécanisme de régulation de pRb passe par les CKI (cyclin-dependent kinase). La protéine p16 est un inhibiteur de cycline D/CDK empêchant la phosphorylation de pRb ce qui induit l'arrêt des cellules en phase G1. La délétion de p16 a été rapportée dans environ 50% des gliomes, 40-60% des tumeurs nasopharyngées, 40% des tumeurs pancréatiques et 20 à 30% des leucémies lymphoblastiques aigües (Hall and Peters, 1996) (**Fig. 40A**).

4.1.3. CDKs et leurs enzymes activatrices

L'activation des CDK est régulée par déphosphorylation par les phosphatases de la famille Cdc25. La dérégulation ou la surexpression de ces phosphatases active de manière non programmée des complexes cyclines-CDKs avec formation possible de tumeurs. Cdc25B est surexprimée dans 32% des

cancers du sein primitifs. La transcription des gènes de Cdc25A et Cdc25B est activée par c-Myc, oncogène muté dans plusieurs types de cancers humains (Galaktionov et al., 1996). L'altération des CDKs est également impliquée dans le cancer mais avec une fréquence moindre. La surexpression de CDK4 a été identifiée dans le mélanome humain (Wölfel et al., 1995) (**Fig. 40C**).

4.1.4. Cyclines

La cycline D agit comme un capteur de croissance et établit un lien entre les stimulus mitogènes et le cycle cellulaire. L'amplification du gène de la cycline D1 a été identifiée dans le carcinome du sein, de l'œsophage, de la vessie, et du poumon (Hall and Peters, 1996). Les cyclines A et E sont quant à elles surexprimées dans le carcinome pulmonaire et la surexpression de la cycline A, mais pas de la cycline E, corrèle avec une survie plus courte (Dobashi et al., 1998) (**Fig. 40C**).

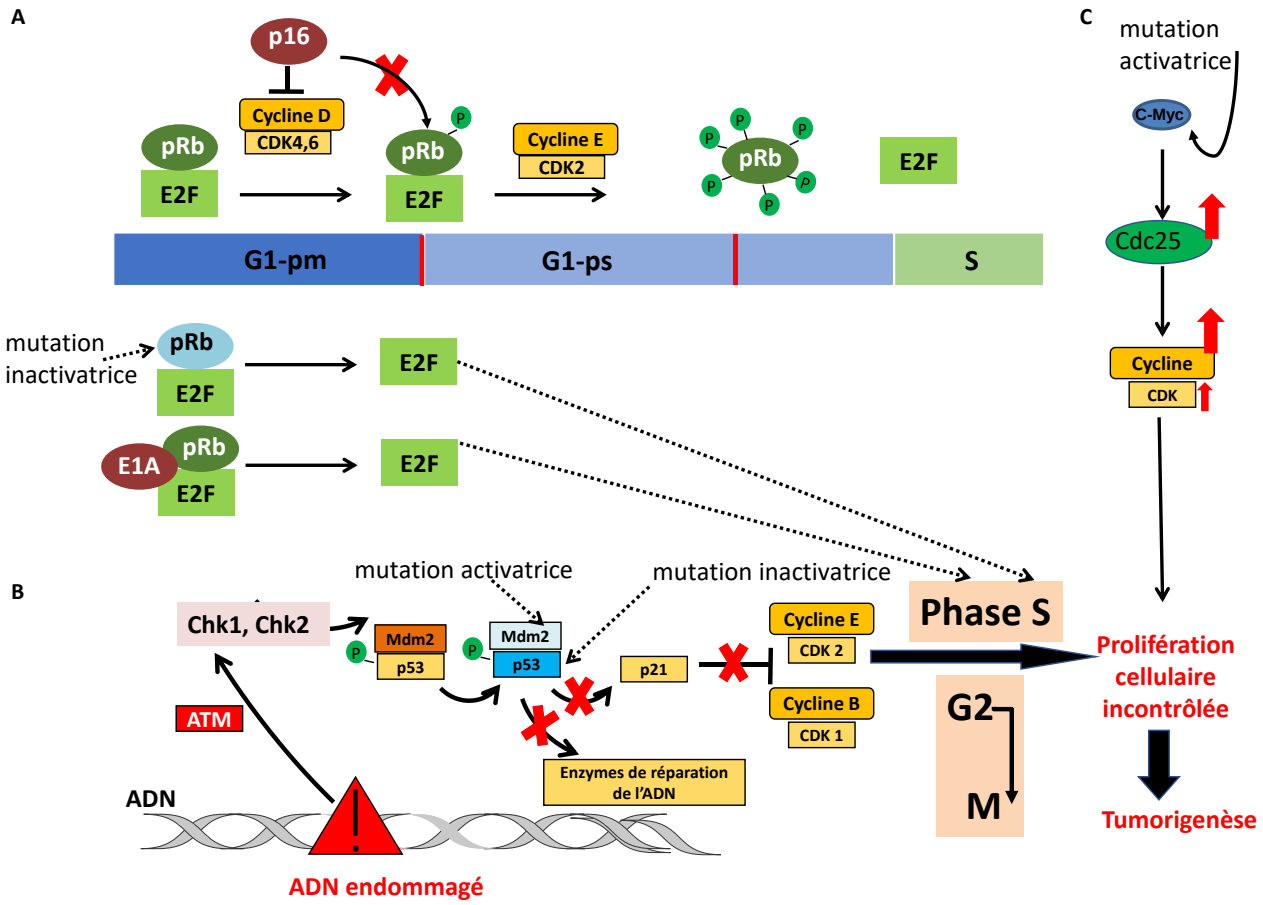


Figure 40 : **Dérégulation des acteurs du cycle cellulaire dans le cancer**. (**A**) Dérégulation de la voie pRb et p16. **(B)** Dérégulation de p53 et Mdm2. **(C)** mutation de l'oncogène c-Myc et suractivation des phosphatases Cdc25, activatrices des complexes cyclines-CDKs. Pour les détails, voir texte.

5. Cycle cellulaire et métabolisme

La relation entre le métabolisme et le cycle cellulaire est bidirectionnelle. En effet, la division cellulaire est un processus métaboliquement exigeant. Elle nécessite la production de grandes quantités

d'énergie et de biomasse. La décision d'une cellule d'initier la division est donc liée à son statut métabolique et à la disponibilité en nutriments. À l'inverse, la machinerie du cycle cellulaire s'engage à réguler les réseaux métaboliques afin de soutenir la survie et la prolifération cellulaire.

5.1. Implication du métabolisme dans le cycle cellulaire

5.1.1. Métabolisme du glucose

Dès 1974, il a été montré que les cellules en absence du glucose s'arrêtent au point de contrôle G1/S. Cela démontre que ce nutriment est central sur le plan métabolique du cycle cellulaire (Pardee, 1974). Ainsi, il a été montré que les cellules engagées dans la mitose, surexpriment transitoirement l'activateur glycolytique PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3) au niveau du point de contrôle sensible aux nutriments, et que le blocage de la glycolyse ou la réduction de la disponibilité du glucose altère le passage à travers ce point de restriction. La surexpression nucléaire de PFKFB3 est accompagnée d'une augmentation de l'expression de la cycline D3, promotrice de la phase G1. De plus, PFKFB3 stimule la prolifération en augmentant l'expression de la kinase et phosphatase mitotiques CDK1 et Cdc25C respectivement, et en diminuant l'expression de $p27^{Kip1}$, inhibiteur de CDK1 (Yalcin et al., 2009). Comme pour PFKFB3, la PK, enzyme qui catalyse l'étape finale limitante de la glycolyse et produit de l'ATP et le pyruvate, joue également un rôle non métabolique dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire. En effet, en réponse à la stimulation par l'EGF (epidermal growth factor), l'isoforme PKM2 (pyruvate kinase M2) se déplace vers le noyau où elle forme un complexe avec la β-caténine et se localise aux promoteurs du gène de la cycline D1 *CCND1* et *c-myc* pour favoriser leur expression. Ainsi, en induisant l'expression de la cycline D1, PKM2 régule la transition G1/S (W. Yang et al., 2017) (**Fig. 41B**). Jiang et collaborateurs ont montré que PKM2 joue également un rôle durant la progression en mitose en régulant la fixation des microtubules sur les kinétochores et la ségrégation correcte des chromosomes (Jiang et al., 2014).

5.1.2. Métabolisme des lipides

Comme expliqué précédemment, les lipides jouent un rôle indispensable dans de nombreux processus notamment la différenciation cellulaire ou la morphogenèse des organes, et sont intimement associés à la progression du cycle cellulaire. En plus d'être des composants majeurs des membranes cellulaires, les lipides sont également des médiateurs des voies de signalisation. En effet, il a été montré que la synthèse des phospholipides est augmentée durant la phase G1 et cesse en G2/M dans les macrophages (Cornell et al., 1977). De plus, dans leur revue, Kaplon et collaborateurs reviennent sur le fait que la biosynthèse des lipides est accrue en phase G1 puis diminuée en phase S (Kaplon et al., 2015). L'inactivation des enzymes du métabolisme lipidique telles que SMPD4 (sphingomyéline phosphodiestérase 4), GALC (galactosylcéramidase) et DGAT2 (diacylglycérol *O*-acyltransférase 2)

entraine des défauts de division cellulaire et des changements cytosquelettiques dans les cellules en interphase (Atilla-Gokcumen et al., 2014). Par ailleurs, l'inhibition de la biosynthèse du cholestérol induit l'arrêt du cycle cellulaire en G0 (Singh et al., 2013) (**Fig. 41B**). Enfin, les bicouches lipidiques de l'enveloppe nucléaire et de la membrane plasmique présentent des propriétés différentes selon le stade du cycle cellulaire, vraisemblablement pour s'adapter au stress mécanique lors de la division cellulaire (Atilla-Gokcumen et al., 2014). Les mécanismes de régulation du cycle cellulaire par le métabolisme lipidique ne sont pas bien clairement décrits. Un des objectifs de ma thèse a été d'étudier la régulation de la FAS , enzyme clé de lipogenèse, au cours du cycle cellulaire.

5.1.3. Acétyl-CoA

L'acétyl-CoA cytoplasmique et nucléaire n'est pas uniquement un intermédiaire important pour la biosynthèse de macromolécules, c'est aussi un précurseur de modification des protéines par acétylation. L'acétylation des histones est un processus essentiel au relâchement de la chromatine en vue de sa réplication et donc de la progression du cycle cellulaire. Ainsi, en régulant l'acétylation des histones, l'acétyl-CoA contrôle le cycle cellulaire (Li et al., 2007).

5.1.4. O-GlcNAcylation

L'implication de la *O*-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire a été proposée très tôt. En effet, dans les années 1990, Kearse et Hart ont observé que l'activation des lymphocytes T murins par des facteurs mitogènes est accompagnée par une diminution de la *O*-GlcNAcylation des protéines cytoplasmiques et une augmentation de celle des protéines nucléaires (Kearse and Hart, 1991b). Une autre étude a rapporté que des cellules traitées avec le PUGNAc progressent plus lentement dans le cycle cellulaire par rapport aux cellules non traitées (Slawson et al., 2005). Ces observations ont suggéré à cette époque que la *O*-GlcNAcylation jouait un rôle clé dans le cycle cellulaire.

Des études ultérieures ont montré que l'augmentation de l'OGT et de la *O*-GlcNAcylation lors de la stimulation mitogène était nécessaire pour la reprise du cycle cellulaire (transition G0/G1), et ce, en régulant l'expression de la cycline D1 (Olivier-Van Stichelen et al., 2012) et en stimulant l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K/AKT (Olivier-Van Stichelen et al., 2012; Perez-Cervera et al., 2013) (**Fig. 41A**).

A l'inverse, les niveaux de *O*-GlcNAcylation au cours de la transition G1/S sont diminués, accompagnés par l'augmentation de l'expression de l'OGA de manière indépendante de son activité, de celle de l'OGT en phase S (Drougat et al., 2012). En accord avec ces observations, l'inhibition d'HBP accélère la phase S (Slawson et al., 2005). Il a également été montré que pRb est hautement *O*-GlcNAcylé ce qui empêche sa phosphorylation et bloque les cellules en phase G1 (Wells et al., 2011). En début de phase

S, la *O*-GlcNAcylation des histones, telles que H1, H2A, H2B, H3 et H4 est diminuée par rapport aux phases G1, fin de S et G2 ce qui pourrait favoriser la liaison du complexe pré-réplicatif avec la chromatine, régulant ainsi la réplication de l'ADN (Zhang et al., 2011) (**Fig. 41A**). De plus, les protéines MCM2-7 impliquées dans l'initiation de la réplication de l'ADN sont *O*-GlcNAcylées (Leturcq et al., 2018). Une dérégulation de l'homéostasie de leur *O*-GlcNAcylation déstabilise leur liaison avec la chromatine (Leturcq et al., 2018) (**Fig. 41A**).

Enfin, le rôle de la *O*-GlcNAcylation au cours de la transition G2/M a initialement été démontré en utilisant comme modèle les ovocytes de Xénope, bloqués physiologiquement en prophase de première division méiotique. En réponse à la stimulation à la progestérone, l'ovocyte immature reprend la méiose dans une phase de transition analogue à G2/M. Il a été montré que cette maturation est corrélée avec une augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation (Lefebvre et al., 2004) (**Fig. 41A**) et que l'inhibition de l'OGT interfère avec la transition G2/M (Lefebvre et al., 2004; Dehennaut et al., 2008). L'OGT et la *O*-GlcNAcylation sont localisées au niveau du fuseau méiotique et des chromosomes dans des ovocytes de Xénope en métaphase II. La même expression a été retrouvée en phase M du cycle cellulaire des cellules MEF et HEK293 (Yang et al., 2012a). A cela, Slawson et collaborateurs ont rapporté que l'OGT est essentielle à la bonne formation du fuseau mitotique et à la ségrégation des chromosomes durant la mitose (Slawson et al., 2005) **(Fig. 41A)**. La même équipe a montré que l'OGT et l'OGA sont des partenaires d'interaction de la kinase Aurora B et la phosphatase 1 pour réguler la stabilité du *Mid body* et la phosphorylation et/ou la *O*-GlcNAcylation de la vimentine en phase M (Slawson et al., 2008). En accord avec cette étude, il a été montré que la délétion de l'OGT ou de l'OGA induit une diminution de l'expression de la cycline B1 et donc l'altération de la transition G2/M, indiquant que l'expression et l'activité correctes des deux enzymes de la *O*-GlcNAcylation est nécessaire à la progression du cycle cellulaire (Yang et al., 2012b).

La *O*-GlcNAcylation joue donc un rôle fondamental dans la régulation du cycle cellulaire. Elle augmente tout au long du cycle avec une tendance à la baisse en G1/S. Des études ultérieures seront nécessaires pour comprendre les mécanismes moléculaires intimes de régulation des différentes phases du cycle cellulaire par *O*-GlcNAcylation.

5.1.5. Le ratio ATP/AMP

Le ratio ATP/AMP reflète le statut énergétique de la cellule. Comme mentionné plus haut, le complexe protéique qui régule le statut énergétique cellulaire est la protéine kinase AMPK. En effet, dans des conditions de stress énergétique telles que la privation en glucose et de faibles niveaux d'ATP, l'AMPK est activée et régule négativement les processus métaboliques tels que la synthèse des protéines et des lipides, tout en favorisant la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras productrice

d'énergie (Hardie et al., 2012). Récemment, il a été montré que l'AMPK contrôle les niveaux d'énergie en régulant directement la machinerie du cycle cellulaire. L'activation de l'AMPK par privation en glucose induit l'arrêt des cellules en phase G1. Cet arrêt de la prolifération cellulaire est associé à la phosphorylation de p53 sur la Ser115 et à la régulation positive de l'expression de CKI $p21^{Cip1}$, une cible de p53 activé (Jones et al., 2005) (**Fig. 41B**). De plus, l'activation de l'AMPK par le bleu de méthylène dans les cellules de glioblastome réduit l'expression des cyclines A2, B1 et D1, entrainant un arrêt du cycle cellulaire (Poteet et al., 2013). Ainsi, l'AMPK joue un rôle de premier plan en tant que point de contrôle métabolique du cycle cellulaire, empêchant l'entrée du cycle cellulaire dans des conditions de faible disponibilité en nutriments.

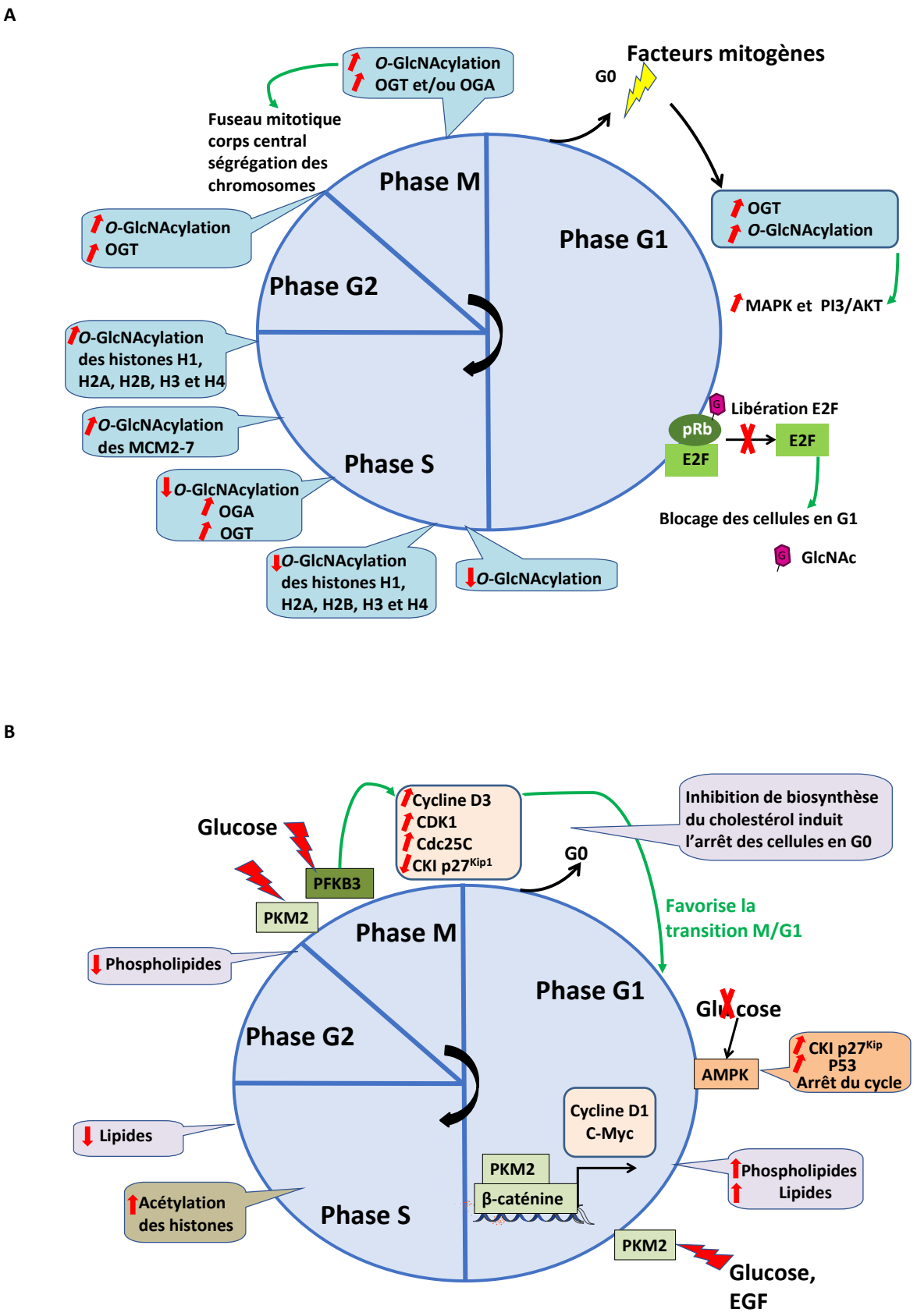


Figure 41 : **Rôle du métabolisme dans le cycle cellulaire**. (**A**) Les niveaux et le rôle de la *O*-GlcNAcylation au cours du cycle cellulaire. **(B)** Implication du métabolisme lipidique dans le cycle cellulaire. Pour les détails, voir texte.

5.2. Implication des acteurs du cycle cellulaire dans le métabolisme

Des études ont montré chez la levure, que les métabolites de synthèse des nucléotides, des protéines et des lipides fluctuent cycliquement en fonction de la progression du cycle cellulaire. Ceci soutient l'idée selon laquelle le métabolisme est directement régulé par des modulateurs du cycle cellulaire (Bp et al., 2007). En ce sens, l'implication de la voie CDK/pRb/E2F et les cyclines dans la régulation du métabolisme a été rapportée.

5.2.1. Les cyclines de type D

Le rôle des cyclines D dans le métabolisme a été démontré pour la première fois chez des souris déficientes en cycline D2 présentant un phénotype diabétique dû à l'altération de la fonction des cellules β-pancréatiques (Kushner et al., 2005). Ce phénotype est renforcé par la co-délétion de la cycline D1 (Kushner et al., 2005). Des souris déficientes en cycline D3 présentent des adipocytes de taille réduite et une sensibilité accrue à l'insuline ce qui induit l'inactivation du récepteur PPARγ, régulateur clé de l'adipogenèse (Sarruf et al., 2005) (**Fig. 42**). Enfin, la cycline D1 est plus fortement exprimée dans les cellules cancéreuses du sein. Parmi ses fonctions, elle diminue l'activité de l'enzyme glycolytique HK2 (hexokinase 2) (Sakamaki et al., 2006) et sa délétion dans des cellules mammaires normales ou cancéreuses, entraine une augmentation de l'enzyme glycolytique PK ainsi que des enzymes lipogéniques ACC et FAS (Sakamaki et al., 2006). Dans les hépatocytes, la cycline D1 bloque l'induction des gènes de la lipogenèse *via* la répression de ChREBP et HNF4α (facteur nucléaire 4 alpha hépatocytaire) (**Fig. 42**), deux régulateurs importants dans la détection du glucose et le métabolisme lipidique (Hanse et al., 2012). De plus, la cycline D1 régule négativement les fonctions mitochondriales en inhibant NRF1 (nuclear respiratory factor 1) (Wang et al., 2006) (**Fig. 42**). Enfin, une analyse par spectrométrie de masse a révélé une interaction entre la cycline D1 et de nombreuses protéines métaboliques telles que les enzymes lipogéniques FAS et ACC, ainsi que COX (cytochrome c oxydase) et l'ATP synthase, des composants de la chaine de transport d'électrons dans la membrane interne mitochondriale (Bienvenu et al., 2010). Ensemble, ces observations démontrent que la cycline D1, en réduisant la glycolyse, la lipogenèse ainsi que l'activité mitochondriale, régule à la baisse l'activité métabolique.

Comme décrit ci-dessus, l'activité de la cycline D1 s'accélère en phase G1 en réponse aux facteurs de croissance, lorsque l'activité métabolique est importante (W. Yang et al., 2017). Si l'activité métabolique augmente l'expression de la cycline D1 en phase G1 pour initier le cycle cellulaire, la cycline D1, à son tour, applique une boucle de rétroaction négative puisqu'elle s'oppose au métabolisme, empêchant ainsi la ré-entrée en G1 tant que la transition G1/S n'est pas terminée (Buchakjian and Kornbluth, 2010) (**Fig. 42**).

5.2.2. CDK/pRB/E2F

Les facteurs de transcription E2Fs fonctionnent comme activateurs ou répresseurs de la transcription : ainsi les régulateurs du cycle cellulaire font-ils montre d'un double rôle dans la modulation du métabolisme.

Il a été montré que E2F et son activateur en amont, CDK4, régulent l'adipogenèse en régulant positivement PPARγ (Fajas, Landsberg, et al., 2002; Abella et al., 2005). En accord avec ces résultats, il a été montré que pRb agit positivement sur la différentiation adipocytaire en stade terminal en se liant directement sur le facteur de transcription CCAAT/protéine de liaison d'activateur (C/EBP) facilitant ainsi sa transactivation (Chen et al., 1996). En revanche, pRb lié à l'histone désacétylase HDAC3 réprime PPARγ, ce qui inhibe la différenciation des adipocytes durant les premiers stades (Fajas, Egler, et al., 2002) (**Fig. 42**).

Outre l'adipogenèse, la voie E2F/pRb est également impliquée dans le métabolisme du glucose des cellules β pancréatiques. Des souris porteuses d'une délétion de E2F présentent un phénotype diabétique résultant d'une intolérance au glucose et d'une sécrétion déficiente en insuline (Fajas et al., 2004). Il a été montré que E2F stimule la glycolyse en régulant positivement l'expression de l'enzyme PFK2 (phosphofructokinase-2) (Darville et al., 1995) (**Fig. 42**). De plus, la délétion de E2F1 augmente l'expression des régulateurs de la biogenèse et de la fonction mitochondriales tel la topoisomérase I (Goto et al., 2006). En accord avec ce résultat, E2F1 régule à la baisse la phosphorylation oxydative et induit l'expression des gènes glycolytiques (Blanchet et al., 2011). Ainsi, la voie pRB-E2F1 favorise le passage du métabolisme oxydatif au métabolisme glycolytique, ce qui favorise le phénotype métabolique typique des cellules en prolifération.

Nous constatons que le cycle cellulaire est intimement régulé par la disponibilité en nutriments ainsi que par des évènements moléculaires dépendants des MPTs telles que la phosphorylation, la méthylation, l'acétylation, l'ubiquitination et la glycosylation. **L'objectif majeur de ma thèse a été d'étudier le rôle des dérégulations métaboliques dans l'émergence du cancer *via* la régulation de l'enzyme lipogénique FAS par OGT et mTOR au cours de la prolifération cellulaire hépatique.**

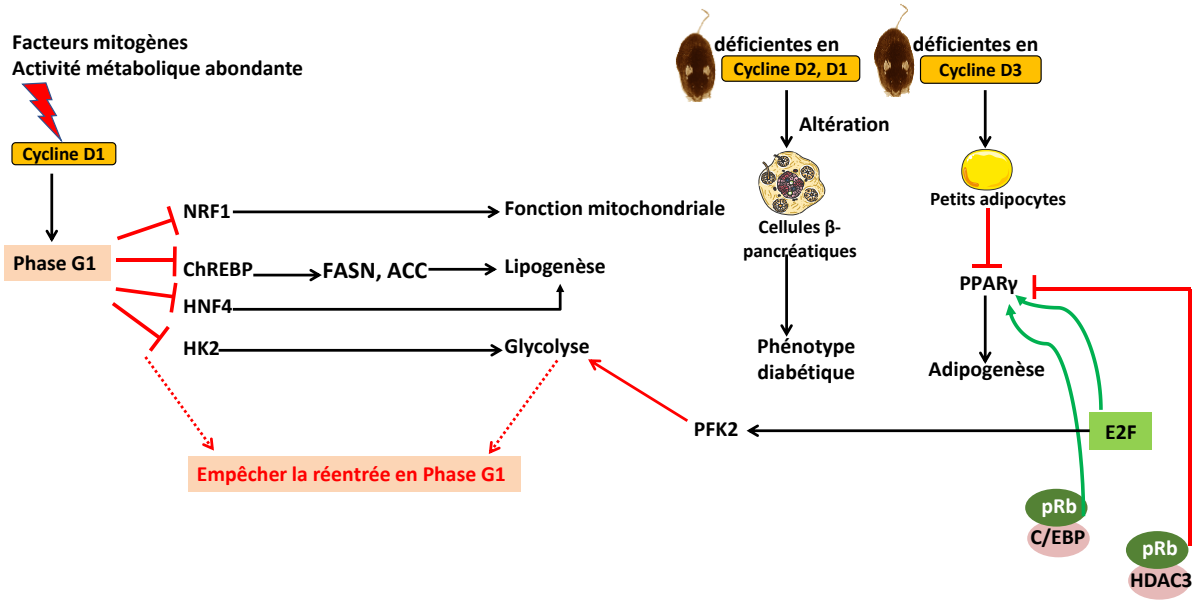


Figure 42 : **Rôle des acteurs du cycle cellulaire dans la régulation du métabolisme.** L'activité métabolique abondante et les facteurs mitogènes activent la cycline D1 qui autorise l'entrée en phase G1 du cycle cellulaire. Pour empêcher la ré-entrée en phase G1 tant que la transition G1/S n'est pas achevée, la cycline D1 applique un rétrocontrôle négatif en bloquant la glycolyse, la lipogenèse et la fonction mitochondriale. Ensemble, les cyclines D1 et D2 sont impliquées dans le phénotype diabétique en altérant les cellules β-pancréatiques dans un modèle murin déficient en cyclines D1 et D2. Les souris déficientes en cycline D3 présentent des adipocytes de taille réduite ce qui induit l'inhibition du régulateur de l'adipogenèse, PPARγ. L'adipogenèse est également régulée par pRb/E2F. E2F favorise aussi le métabolisme glycolytique.

Projet de thèse

Objectifs des travaux de thèse

Une des caractéristiques des cellules cancéreuses est leur haute capacité à proliférer imposant une accélération du rythme de synthèse lipidique et un niveau d'expression élevé de la FAS, enzyme clé de la lipogenèse. Comme discuté dans l'introduction, la FAS contrôle la synthèse des composants membranaires et la composition des lipides rafts nécessaires à la localisation et à l'activité des récepteurs impliqués dans l'activation des voies mitogènes. La surexpression de la FAS constitue une des altérations phénotypiques les plus fréquentes des cellules cancéreuses faisant de cette enzyme un oncogène métabolique potentiel. L'expression de l'OGT est également élevée dans les cancers ; cette glycosyltransférase modifie tout un ensemble de protéines de manière nutrition dépendante dont la la FAS (Baldini et al., 2016). Les travaux de mon équipe d'accueil ayant porté sur la lipogenèse hépatique ont montré que la FAS est *O*-GlcNAcylée de manière nutrition dépendante (Baldini et al., 2016). La *O*-GlcNAcylation de la FAS résulte en une réduction de sa dégradation protéasomale et par conséquent en une augmentation de son expression et de son activité catalytique (Baldini et al., 2016). Certains cancers dont le CHC sont intimement dépendants des conditions nutritionnelles, un déséquilibre alimentaire ou une pathologie métabolique favorisant leur incidence. Selon Globocan 2020, le cancer hépatique représente le 6ème cancer par sa fréquence dans le Monde (905.677 nouveau cas/an). L'augmentation constante des cancers du foie primitif s'explique par le nombre croissant des cirrhoses liées à l'alcoolisme et aux hépatites B et C. L'obésité et le diabète jouent également un rôle dans l'incidence du cancer hépatique. Chaque année il serait responsable de 830.180 décès, soit le 3ème cancer en termes de mortalité dans le monde (Sung et al., 2021).

L'équipe a également montré une régulation réciproque entre la *O*-GlcNAcylation et la voie PI3K/AKT/mTOR activée en réponse aux facteurs mitogènes et aux nutriments telle que décrit précédemment (Very et al., 2018). Les activités de mTOR et de l'OGT étant directement liées aux conditions nutritionnelles (Ben-Sahra and Manning, 2017), la synthèse et la dégradation de la FAS pourraient être toutes deux liées à la disponibilité en nutriments par le biais de mTOR et de l'OGT. Ainsi, l'objectif principal de ma thèse a été de mieux comprendre le lien entre la *O*-GlcNAcylation, la voie mTOR et l'expression de la FAS au cours de la prolifération cellulaire, et d'essayer de relier ces éléments à l'émergence du cancer hépatique. Nous proposons que la suractivation de l'axe mTOR/OGT/FAS dans un contexte de dérégulation nutritionnelle soit un facteur lié à la cancérisation (**Fig. 43**).

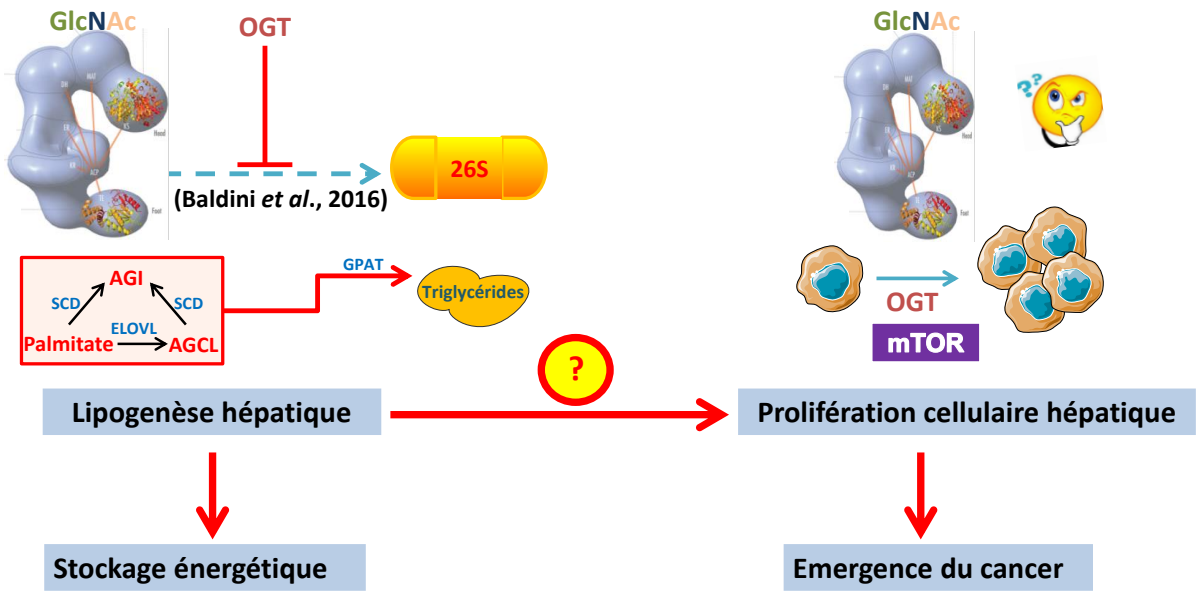


Figure 43 : **Régulation hypothétique de la FAS par *O*-GlcNAcylation et la voie mTOR au cours de la prolifération cellulaire hépatique.** L'expression de la FAS au cours de la lipogenèse hépatique dépend de sa *O*-GlcNAcylation (gauche) (Baldini et al., 2016). Or la *O*-GlcNAcylation et la voie mTOR, toutes deux dépendantes des conditions nutritionnelles, se régulent de manière réciproque (Very et al., 2018). Pour se diviser, la cellule nécessite une disponibilité nutritionnelle suffisante pour doubler les composants qui la constituent notamment les acides gras. Ainsi l'expression de la FAS pourrait être à la fois dépendante de l'OGT et de la voie mTOR (droite). Une perte de contrôle des processus de *O*-GlcNAcylation et/ou de la voie mTOR sur l'expression et l'activité de la FAS favoriserait l'émergence tumorale.

Ce projet a été mené sur des cellules cancéreuses hépatiques HepG2 et Hep3B et la lignée hépatique non cancéreuse IHH (immortalized human hepatocyte), des foies de souris obèses, un modèle murin d'activation chronique de la voie mTOR (souris PTEN KO), et des tumeurs hépatiques humaines issues de patients atteints de CHC et présentant ou non des pathologies hépatiques.

Grâce à des approches alliant culture cellulaire, biochimie des protéines, microscopie par fluorescence, PLA, et RT-qPCR, nous avons essayé de répondre au mieux à chacun des objectifs que nous nous étions fixés, à savoir :

- **Mesurer les niveaux d'expression de FAS et OGT ainsi que le niveau d'activation de la voie mTOR dans les différents modèles**
- **Contrôler la localisation subcellulaire respective de FAS et OGT**
- **Déterminer l'interaction FAS -OGT au cours du cycle cellulaire**
- **Déterminer l'impact de l'OGT sur l'expression de FAS dans des cellules synchronisées par privation de sérum**

- **Déterminer l'impact de la voie mTOR sur l'expression de la FAS au cours de la phase G1 du cycle cellulaire**
- **Déterminer en retour l'effet de l'inhibition de la FAS sur l'expresssion de l'OGT et le niveau d'activation de la voie mTOR**

Travaux personnels :

Partie 1 : La double régulation de l'expression de l'acide gras synthase (FAS) par la *O*-GlcNAc transférase (OGT) et la voie mTOR au cours de la prolifération cellulaire hépatique

1. Contexte de l'étude

Comme décrit dans l'introduction, le rôle de la *O*-GlcNAcylation dans la tumorigenèse a largement été étudié. En revanche, le rôle de cette glycosylation dans la lipogenèse liée à la tumorigenèse est très peu investigué. Mon équipe a montré que la FAS , enzyme clé de la lipogenèse, est *O*-GlcNAcylée de manière nutrition dépendante réduisant sa susceptibilité à la dégradation protéasomale et, par conséquent, augmentant son expression et son activité catalytique. Ces travaux avaient été réalisés dans un contexte de lipogenèse et de mise en réserve énergétique. Nous nous sommes intéressés à l'étude du rôle de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression de la FAS dans un contexte de prolifération cellulaire hépatique avec en point de mire le souhait de mieux connaitre et comprendre les processus de carcinogenèse hépatique. Il existe un lien entre la voie mTOR (elle-même dépendante de la nutrition et hyperactivée dans le cancer) et la *O*-GlcNAcylation. Notre hypothèse de travail a été qu'en ciblant la *O*-GlcNAcylation et la voie mTOR, l'expression et l'activité de la FAS pouvaient être impactées au cours de la prolifération des cellules cancéreuses hépatiques. Nous proposons que la suractivation de l'axe mTOR/OGT/FAS dans un contexte de dérégulation nutritionnelle soit un facteur lié à la cancérisation.

Ce travail a fait l'objet d'un article original publié dans le journal *Cellular and Molecular Life Sciences*

Sadia Raab, Alexis Gadault, Ninon Very, Amélie Decourcelle, Steffi Baldini, Céline Schulz, Marlène Mortuaire, Quentin Lemaire, Stéphan Hardivillé, Vanessa Dehennaut, Ikram El Yazidi-Belkoura, Anne-Sophie Vercoutter-Edouart, Ganna Panasyuk, and Tony Lefebvre (2021). Dual regulation of fatty acid synthase (FAS) expression by *O*-GlcNAc transferase (OGT) and mTOR pathway in proliferating liver cancer cells. *Cellular and Molecular Life Science.*

Les principaux résultats de cette étude sont décrits ci-dessous.

2. Résultats

2.1. Lien moléculaire entre la FAS et OGT

Dans un premier temps, pour essayer de mieux comprendre la relation entre OGT et LA FAS, nous avons cherché à préciser la localisation subcellulaire de chacune des enzymes dans nos modèles cellulaires. Nous avons montré par immunofluorescence (**Fig. 44A**) et par fluorescence directe, en utilisant les protéines de fusion OGT-GFP (OGT-green fluorescent protein), FAS -Cherry (**Supp. Fig. 44A**) que la FAS et OGT co-localisent majoritairement dans le cytoplasme des cellules cancéreuses hépatiques HepG2 (**Fig. 44A**) et Hep3B (**Supp. Fig. 44B**). Pour mieux définir la localisation subcellulaire de ces deux enzymes, les cellules HepG2 synchronisées par privation-remise en sérum (localisées en phases G0 et G1 du cycle cellulaire) ont été fractionnées pour obtenir les fractions cytosolique, membranaire et nucléaire (**Supp. Fig. 44C**). Cette expérience corrobore ce que nous avons observé par microscopie, à savoir que la FAS et OGT co-localisent dans le cytoplasme, avec une fraction localisée au niveau de la membrane plasmique. De manière intéressante, le niveau de la FAS et d'OGT augmente dans le cytoplasme des cellules stimulées par le sérum (comme l'atteste la présence de la kinase AKT sous sa forme phosphorylée dans la fraction membranaire). Comme attendu, l'OGT a également été retrouvée dans le noyau alors que nous n'avons pas détectée de la FAS dans la fraction nucléaire (**Supp. Fig. 44C**) contrairement aux travaux de Madigan et collaborateurs (Madigan et al., 2014). Nous sommes par conséquent en désaccord avec cette étude.

Au-delà de la co-localisation de la FAS et d'OGT au niveau subcellulaire, nous avons montré par co-immunoprécipitation (**Fig. 44B**) et par PLA (proximity ligation assay) (**Fig. 44C**) que ces deux enzymes sont des partenaires d'interaction dans les cellules HepG2. De plus, comme pour leur expression (**Supp. Fig. 44D**), nous avons montré que l'interaction FAS-OGT (**Supp. Fig. 44E**) est dépendante des concentrations en glucose.

Enfin, le traitement des cellules HepG2 asynchrones avec l'Ac_4-5S-GlcNAc a montré une baisse significative de l'expression de la FAS. De manière intéressante et en accord avec les travaux de mon équipe sur les cellules cancéreuses coliques, nous avons montré une diminution de l'activité de la voie mTOR dans les cellules HepG2 traitées à l'Ac_4-5S-GlcNAc par rapport aux cellules non traitées (**Fig. 44D**).

Ensemble, ces expériences montrent que FAS et OGT partagent, en partie, les mêmes compartiments subcellulaires, sont des partenaires d'interaction, et que leur expression et interaction dépendent des concentrations en glucose. De plus, l'expression de la FAS et l'activité de la voie mTOR sont dépendantes de l'activité catalytique de l'OGT dans les cellules HepG2 asynchrones.

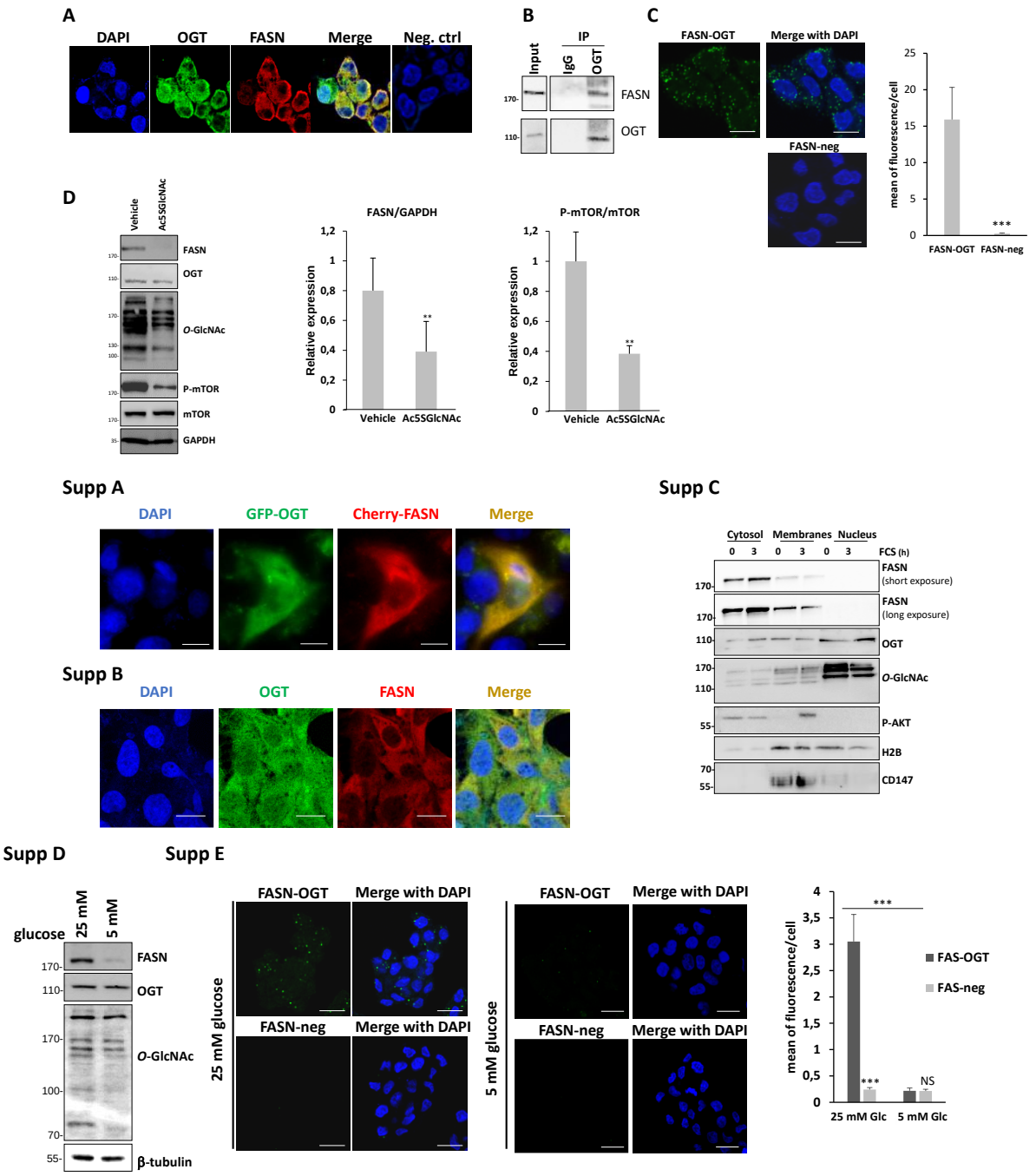


Figure 44 : **Lien moléculaire entre FAS et OGT**. Voir texte pour les détails.

2.2. Corrélation positive entre l'expression de la FAS et l'activation de la voie mTOR dans différents modèles

Nous avons par la suite supposé qu'en plus d'être régulée par *O*-GlcNAcylation, l'expression de la FAS pouvait également dépendre de la voie mTOR. Pour tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord exploité la base de données GEPIA (gene expression interactive analysis) et effectué des analyses de corrélation entre les gènes codant la FAS et certains composants de la voie mTOR. Ces données ont montré une corrélation positive et significative entre les niveaux de transcrits dans le foie et le côlon/rectum et les tissus cancéreux correspondants (**Supp. Fig. 45A**). Nous avons ensuite analysé les niveaux d'expression de la FAS et OGT, et l'activation de la voie mTOR dans quatre lignées cellulaires asynchrones hépatiques et coliques. Nous avons montré par WB (Western blot) que l'expression de la FAS est plus élevée dans les cellules cancéreuses du côlon HT29 et HCT116 par rapport à la lignée colique non cancéreuse CCD841CoN. De plus, la FAS est plus fortement exprimée dans les cellules d'hépatocarcinome HepG2 que dans les cellules cancéreuses coliques. De manière intéressante, l'expression de la FAS est positivement corrélée à la *O*-GlcNAcylation et l'activation de la voie mTOR dans les quatre lignées cellulaires (**Supp. Fig. 45B**).

Pour mieux caractériser le lien entre FAS, *O*-GlcNAcylation et la voie mTOR, nous avons exploité deux modèles murins pour lesquels la suractivation de la voie mTOR a été décrite. Le premier modèle *in vivo* a consisté en des souris obèses *ob/ob versus* souris contrôle C57Bl6. Nous avons montré par WB à partir de lysats de foie une forte augmentation des niveaux d'expression de FAS chez les souris *ob/ob* par rapport aux souris témoins, et ce de manière concomitante à l'élévation des niveaux de *O*-GlcNAc et d'activation de la voie mTOR (**Fig. 45A, B**). Les niveaux protéiques et d'ARNm de l'OGT sont inchangés dans les deux groupes (**Fig. 45C**), suggérant que l'augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation observée dans les foies de souris obèses serait liée à un changement d'activité de l'OGT. L'analyse des transcrits de FAS et ceux de son facteur de transcription SREBP par RT-qPCR (real-time polymerase chain reaction) a montré une augmentation des niveaux d'ARNm dans les foies de souris *ob/ob* (**Fig. 45C**), indiquant que FAS est régulée à la hausse au niveau transcriptionnel chez les souris obèses. En revanche, l'augmentation des niveaux protéiques de FAS ne peut pas être expliquée uniquement par l'augmentation de ses transcrits (augmentation de 80 fois pour la protéine contre 2.5 fois pour l'ARNm) suggérant que la régulation transcriptionnelle de FAS n'est qu'en partie responsable de sa surexpression et donc que FAS doit également être régulée au niveau post-traductionnel dans le foie de souris obèses.

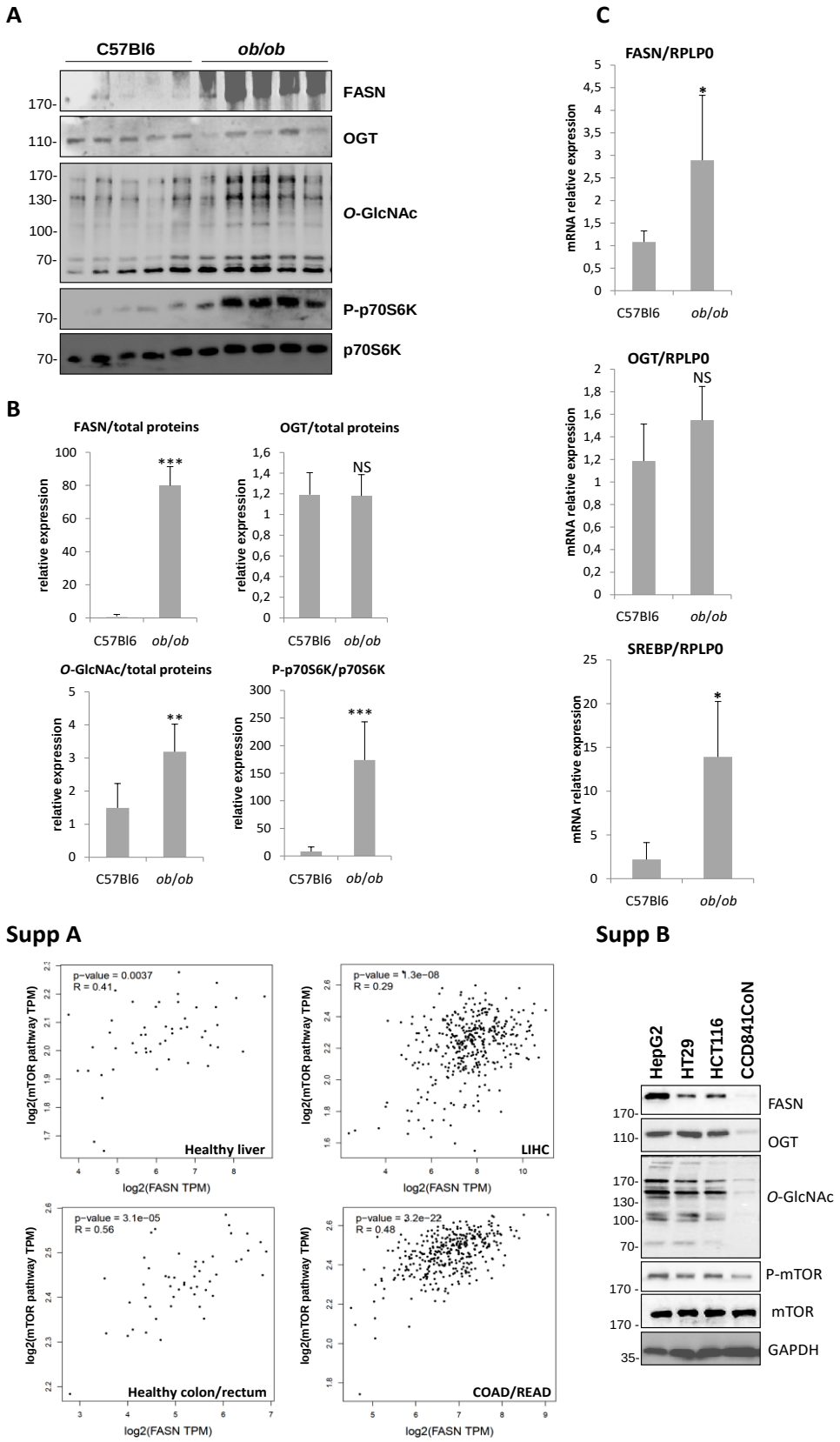


Figure 45 : **Lien entre FAS, *O*-GlcNAcylation et mTOR chez les souris obèses *ob/ob versus* contrôles C57Bl6**. Voir texte pour les détails.

Nous avons ensuite utilisé un modèle murin d'activation chronique de la voie mTOR résultant de l'inactivation de PTEN hépatique. En effet, les souris KO pour le gène codant PTEN développent une hypertrophie hépatique sévère et une stéatose en raison d'une augmentation de DNL (*de novo* lipogenesis) dépendante de l'activité transcriptionnelle de PPARγ. Ces souris développent également des tumeurs hépatiques à partir du neuvième mois. Après avoir vérifié l'efficacité du KO, nous avons montré par WB (**Fig. 46A, B**) et IHC (immunohistochimie) (**Fig. 46C, D**) que les niveaux d'expression de la FAS et l'activation de la voie mTOR sont plus fortement élevés dans les foies de souris PTEN KO par rapport aux souris WT et corrèlent positivement avec les niveaux de *O*-GlcNAcylation. En revanche et de manière surprenante, nous avons observé une diminution significative de l'expression de l'OGT chez les souris PTEN KO par rapport aux souris WT (**Fig. 46A, B**). Il serait intéressant de mesurer les niveaux d'expression de l'OGA ce qui permettrait d'expliquer, tout ou en partie, la légère augmentation des niveaux de *O*-GlcNAcylation. Enfin, nous n'avons observé aucune différence dans les niveaux protéiques de SREBP entre les deux groupes de souris (**Fig. 46A, B**).

A ce stade, ces observations indiquent que la lipogenèse *de novo* exercée par la FAS et la signalisation mTOR corrèlent positivement avec l'augmentation de *O*-GlcNAcylation dans deux modèles murins de désordre métabolique et de stéatose hépatique.

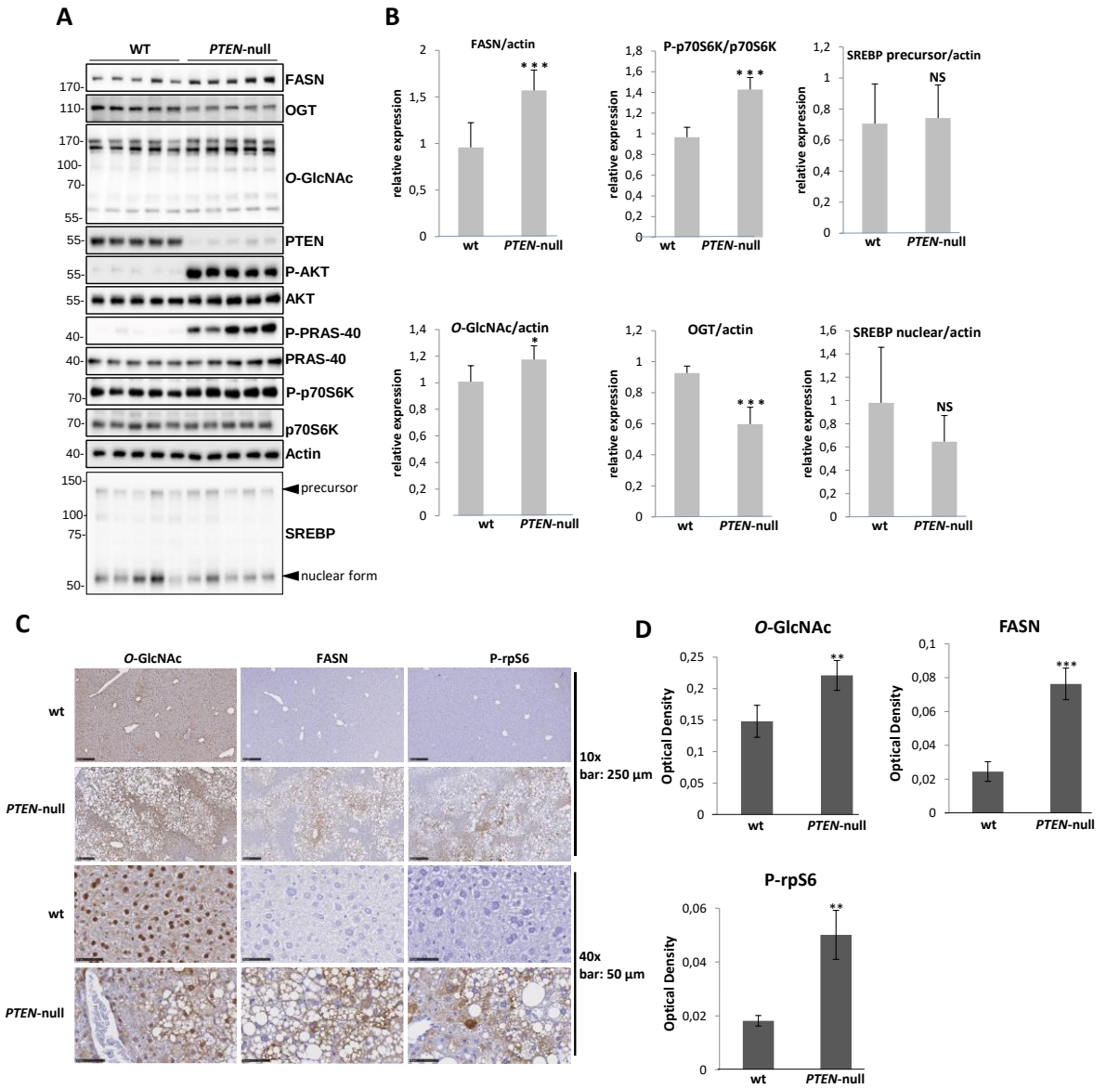


Figure 46 : **Lien entre FAS, *O*-GlcNAcylation et mTOR chez les souris PTEN KO *versus* souris WT**. Voir texte pour les détails.

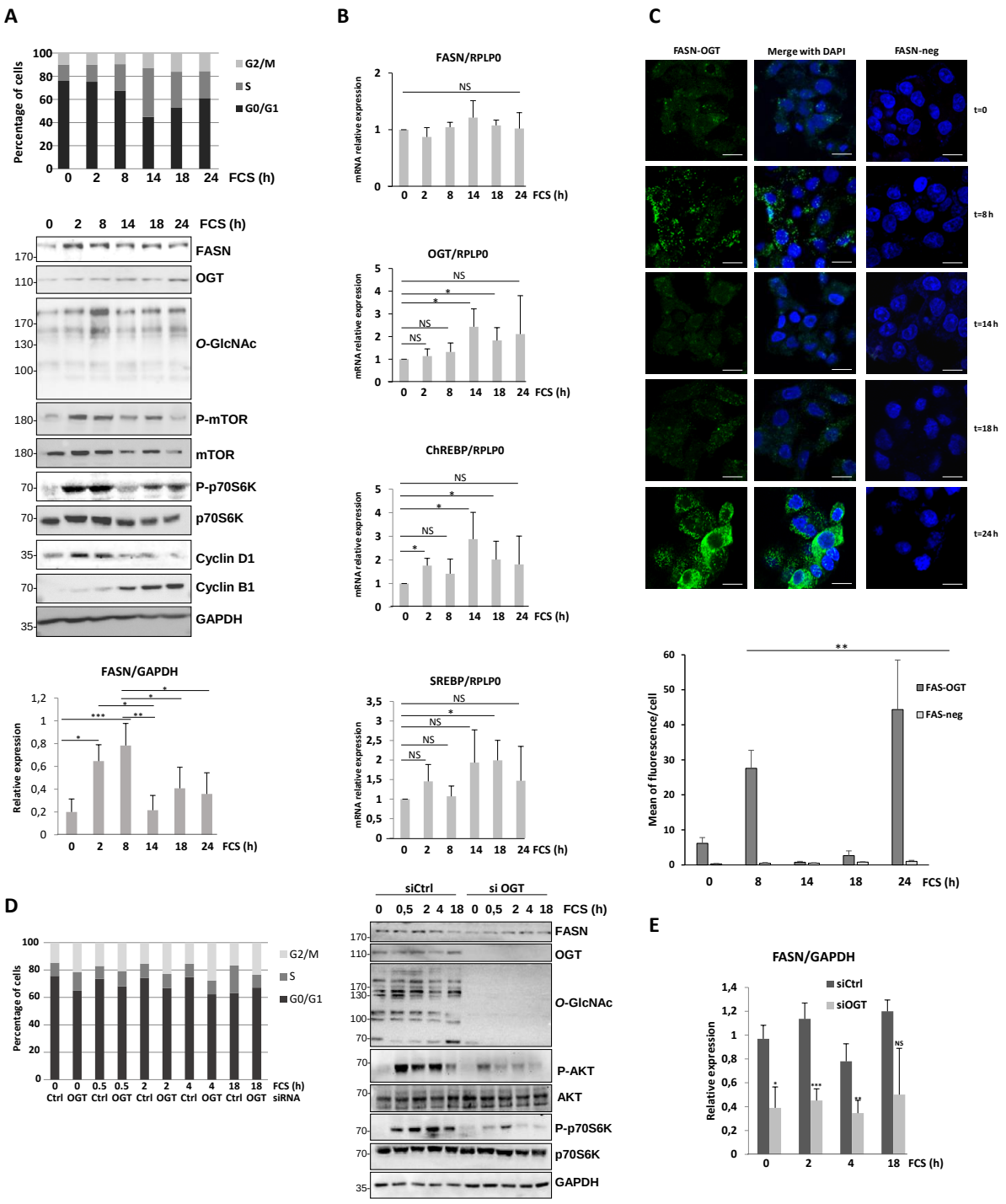
2.3. L'expression de la FAS est dépendante de l'activité de l'OGT dans des cellules stimulées par le sérum

Dans le but de déterminer le rôle de la *O*-GlcNAcylation au cours de la prolifération cellulaire, nous avons tout d'abord analysé le profil d'expression de la FAS au cours du cycle cellulaire. Pour cela, une cinétique de privation et remise en sérum pendant 24 h a été réalisée sur les HepG2. En réponse au sérum, nous observons une augmentation de l'expression de la FAS : son niveau calque en partie le profil de la cycline D1 et d'activation de la voie mTOR. Son expression est ensuite diminuée pour être minimale 14 heures après remise en sérum des cellules, partie du cycle où la cycline D1 est dégradée et l'activation de mTOR, diminuée : il s'agit de la phase S du cycle cellulaire. L'expression de la FAS ré-augmente plus tard lorsque la cycline B1 est exprimée au cours de la phase G2/M (**Fig. 47A**). Cette

expérience nous a permis de mettre en évidence l'expression cyclique de la la FAS au cours du cycle cellulaire ; elle augmente progressivement au cours de la phase G1, diminue en phase S puis ré-augmente en phase G2. Des fluctuations similaires de l'expression de la FAS ont été observées dans la lignée IHH (**Supp. Fig. 47A**). Concernant l'OGT, son niveau d'expression augmente progressivement tout au long du cycle cellulaire comme décrit au préalable par mon équipe (**Fig. 47A**). Nous montrons également que les niveaux d'ARNm de l'OGT et de deux des facteurs de transcription contrôlant l'expression de la FAS, SREBP et ChREBP, augmentent légèrement de manière peu ou non significative au cours de la même cinétique de privation et remise en sérum. En revanche, les ARNm de la FAS restent inchangés (**Fig. 47B**). Ainsi, les variations d'expression du niveau protéique de la FAS au cours du cycle cellulaire résultent plutôt de la protéostase et de MPTs que de processus transcriptionnels. Nous nous sommes ensuite demandés si l'interaction la FAS -OGT change également au cours du cycle cellulaire. Pour cela, l'interaction entre ces deux enzymes a été analysée par PLA dans les cellules HepG2 synchronisées. Nous montrons que l'interaction entre FAS et OGT augmente après 8h de stimulation par le sérum lorsque la plupart des cellules sont en phase G1, diminue en phase S (t=14 h) et ré-augmente au temps 24 h qui correspond à G2/M (**Fig. 47C**). Nous constatons que l'interaction FAS -OGT suit plus ou moins l'expression cyclique de la FAS au cours de la progression du cycle cellulaire.

Enfin, nous avons montré que l'OGT est nécessaire pour l'induction correcte de l'expression de la la FAS et l'activation de la voie mTOR au cours du cycle cellulaire (**Fig. 47D, E**).

Ensemble, ces expériences ont mis en évidence que la FAS interagit avec l'OGT et est exprimée de manière cyclique au cours du cycle cellulaire, et que son induction correcte est dépendante de l'expression et de l'activité de l'OGT.


A
Percentage of cells
G2/M
S
G0/G1
FCS (h)
FASN
OGT
O-GlcNAc
P-mTOR
mTOR
P-p70S6K
p70S6K
Cyclin D1
Cyclin B1
GAPDH
FASN/GAPDH
Relative expression
B
FASN/RPLP0
OGT/RPLP0
ChREBP/RPLP0
SREBP/RPLP0
mRNA relative expression
NS
C
FASN-OGT
Merge with DAPI
FASN-neg
t=0
t=8 h
t=14 h
t=18 h
t=24 h
Mean of fluorescence/cell
FAS-OGT
FAS-neg
D
siCtrl
si OGT
siRNA
E
siCtrl
siOGT

Supp A

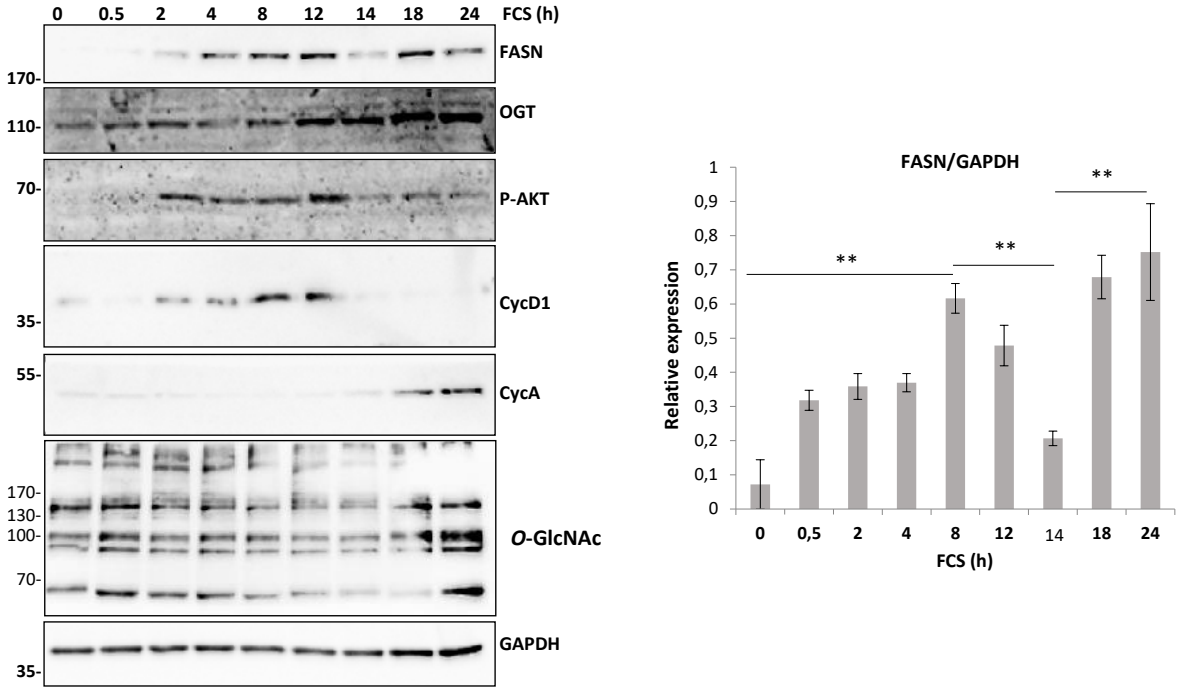


Figure 47 : **L'expression de la FAS est dépendante de l'activité catalytique de l'OGT dans les cellules stimulées par le sérum**. Voir texte pour les détails.

2.4. L'expression de la FAS est dépendante de l'activation de la voie mTOR au cours de la phase G1 du cycle cellulaire

Comme indiqué dans l'introduction, la voie mTOR a une forte activité pendant la phase G1 du cycle cellulaire. Pour savoir si l'expression de FAS est dépendante de la voie mTOR, les cellules HepG2 ont été privées de sérum pendant 48 h puis remises en sérum et traitées pendant 3h à la rapamycine, inhibiteur de mTOR. Nous montrons par WB une baisse significative de l'expression de la FAS en présence de la rapamycine par rapport aux cellules non traitées. En revanche dans notre modèle, la rapamycine n'affecte ni l'expression ni la maturation de SREBP (**Fig. 48A**). De plus, l'analyse des transcrits par RT-qPCR montre que le blocage de mTOR n'affecte pas les niveaux d'ARNm de FAS et des facteurs de transcription SREBP et ChREBP (**Fig. 48B**).

Nous avons ensuite traité des cellules IHH asynchrones avec l'Ac_4-5S-GlcNAc et la rapamycine, inhibiteurs d'OGT et de mTOR respectivement, et avons montré par WB que les deux inhibiteurs induisent une diminution de l'expression de FAS. Cependant, l'action combinée de ces deux molécules n'a entrainé qu'un effet synergique très modéré (**Supp. Fig. 48A**).

Ces résultats montrent que l'induction de l'expression de FAS en début de cycle cellulaire est dépendante de l'activité mTOR qui régule son niveau protéique mais pas son niveau transcriptionnel.

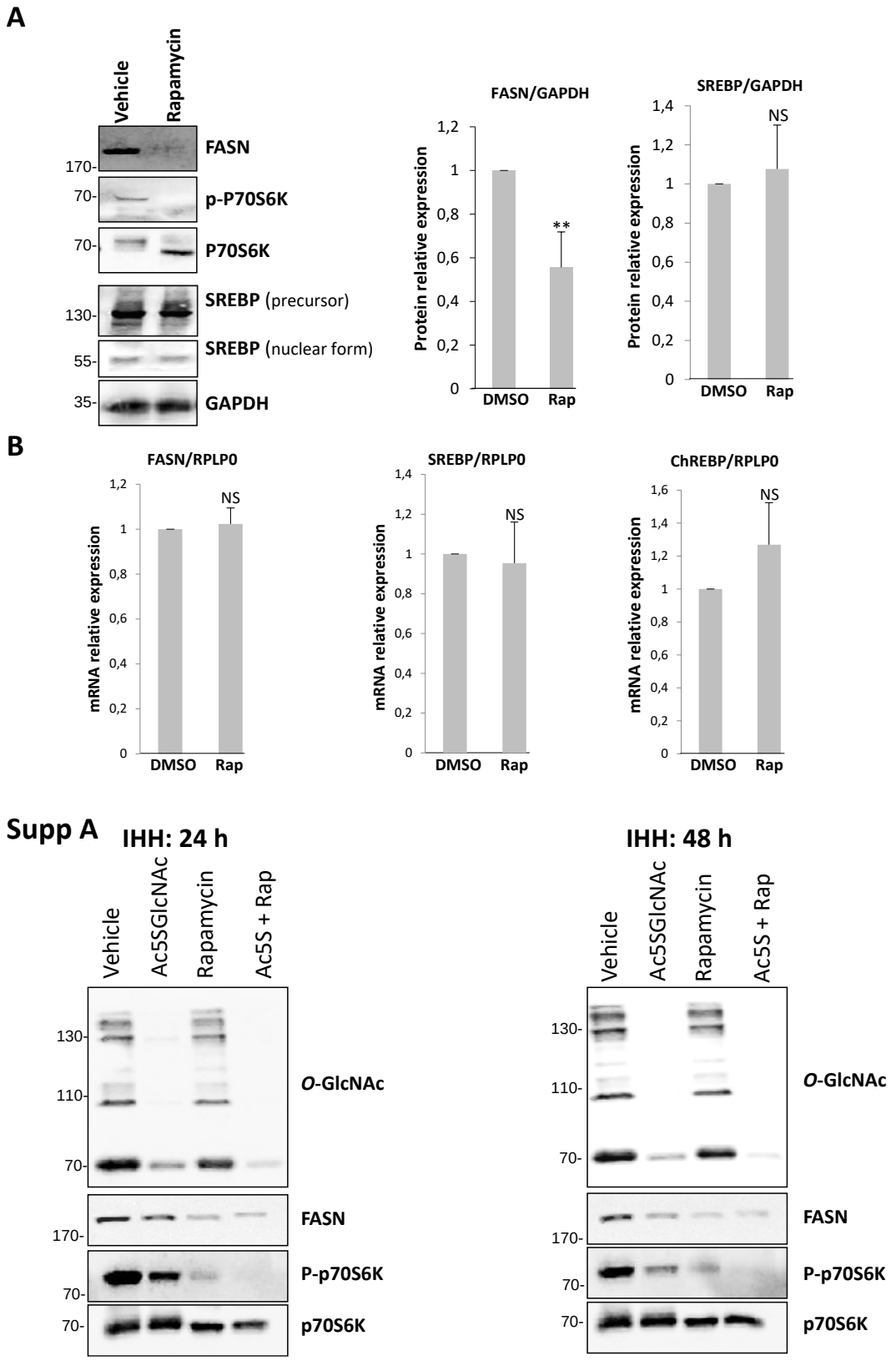


Figure 48 : **L'expression de FAS est dépendante de l'activation de la voie mTOR au cours de la phase G1 du cycle cellulaire**. Voir texte pour les détails.

2.5. Le blocage de l'activité FAS affecte l'expression de l'OGT et l'activation de la voie mTOR

Après avoir montré que l'expression de FAS est dépendante de l'activité de l'OGT et de la voie mTOR, nous nous sommes demandés si FAS exerçait un rétrocontrôle sur les deux enzymes. Pour tenter d'y répondre, des cellules HepG2 asynchrones ont été traitées pendant 72 h au C75, inhibiteur de FAS. Après vérification de l'efficacité de l'inhibiteur par le test MTS (**Fig. 49A**), nous montrons par WB une baisse significative des niveaux d'expression d'OGT de manière dose dépendante de C75 (60 à 100 µM). Quant aux niveaux de *O*-GlcNAc et d'activation de la voie mTOR, ils sont significativement réduits à 100 µM de C75 (**Fig. 49B, C**).

L'inhibition de FAS affecte à la fois la *O*-GlcNAcylation et l'activation de la voie mTOR mettant en évidence une régulation réciproque entre FAS, OGT et mTOR.

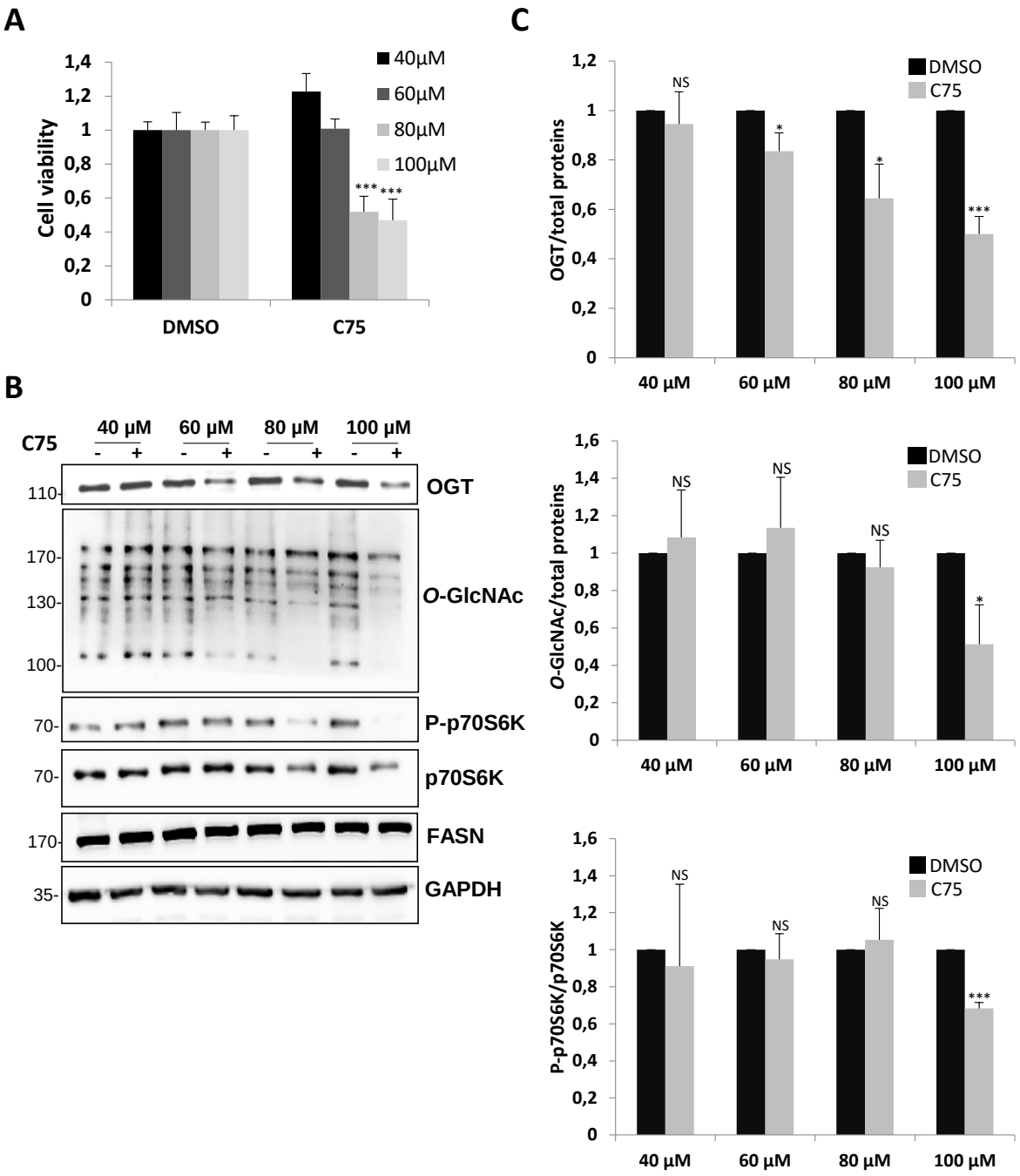


Figure 49 : **L'expression de l'OGT et l'activation de la voie mTOR sont dépendantes de l'activité de la FAS.** Voir texte pour les détails.

3. Publication I

Cellular and Molecular Life Sciences
https://doi.org/10.1007/s00018-021-03857-z

ORIGINAL ARTICLE

Dual regulation of fatty acid synthase (FASN) expression by *O*-GlcNAc transferase (OGT) and mTOR pathway in proliferating liver cancer cells

Sadia Raab[1] · Alexis Gadault[2] · Ninon Very[1] · Amélie Decourcelle[3] · Steffi Baldini[1] · Céline Schulz[1] · Marlène Mortuaire[1] · Quentin Lemaire[1] · Stéphan Hardivillé[1] · Vanessa Dehennaut[3] · Ikram El Yazidi-Belkoura[1] · Anne-Sophie Vercoutter-Edouart[1] · Ganna Panasyuk[2] · Tony Lefebvre[1]

Received: 19 February 2021 / Revised: 30 April 2021 / Accepted: 15 May 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2021

Abstract

Fatty acid synthase (FASN) participates in many fundamental biological processes, including energy storage and signal transduction, and is overexpressed in many cancer cells. We previously showed in a context of lipogenesis that FASN is protected from degradation by its interaction with *O*-GlcNAc transferase (OGT) in a nutrient-dependent manner. We and others also reported that OGT and *O*-GlcNAcylation up-regulate the PI3K/AKT/mTOR pathway that senses mitogenic signals and nutrient availability to drive cell cycle. Using biochemical and microscopy approaches, we show here that FASN co-localizes with OGT in the cytoplasm and, to a lesser extent, in the membrane fraction. This interaction occurs in a cell cycle-dependent manner, following the pattern of FASN expression. Moreover, we show that FASN expression depends on OGT upon serum stimulation. The level of FASN also correlates with the activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway in hepatic cell lines, and in livers of obese mice and in a chronically activated insulin and mTOR signaling mouse model (*PTEN*-null mice). These results indicate that FASN is under a dual control of *O*-GlcNAcylation and mTOR pathways. In turn, blocking FASN with the small-molecule inhibitor C75 reduces both OGT and *O*-GlcNAcylation levels, and mTOR activation, highlighting a novel reciprocal regulation between these actors. In addition to the role of *O*-GlcNAcylation in tumorigenesis, our findings shed new light on how aberrant activity of FASN and mTOR signaling may promote the emergence of hepatic tumors.

Keywords Cell proliferation · Protein interactions · Proximity ligation assay · siRNA · Ob/ob mice

Abbreviations

ALL	Acute lymphoblastic leukemia
ChREBP	Carbohydrate Responsive Element Binding Protein
Co-IP	Co-immunoprecipitation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Elovl	Elongation of very long chain fatty acids proteins
FASN	Fatty acid synthase
FCS	Fetal calf serum
GEPIA	Gene Expression Profiling Interactive Analysis
GFAT-1	Glutamine:fructose–6–phosphate amidotransferase–1
GPCR	G protein coupled-receptors
HBP	Hexosamine biosynthetic pathway
HRP	Horseradish peroxidase
IHH	Immortalized human hepatocytes
LPA	Lysophosphatidic acid
MEF	Mouse embryonic fibroblasts
MEM	Minimal Essential Medium
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NaDOC	Sodium deoxycholate
OD	Optical density
OGA	*O*-GlcNAcase
OGT	*O*-GlcNAc transferase

✉ Tony Lefebvre
tony.lefebvre@univ-lille.fr

1 Université de Lille, CNRS, UMR 8576-UGSF-Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, 59000 Lille, France

2 Institut Necker-Enfants Malades (INEM), INSERM U1151/CNRS UMR 8253, Université de Paris, 75014 Paris, France

3 Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277-CANTHER-Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, 59000 Lille, France

Published online: 27 May 2021

p70S6K	p70 Ribosomal protein S6 Kinase
PAF	Paraformaldehyde
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PIP3	Phosphatidylinositol–3,4,5–triphosphate
PLA	Proximity ligation assay
PRAS40	Proline-rich AKT substrate of 40 kDa
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTM	Post-translational modification
rpS6	Ribosomal protein S6
RT	Room temperature
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	Small interfering RNA
SREBP	Sterol Responsive Element Binding Protein
TBS	Tris-buffered saline
VLDL	Very low density lipoproteins
WB	Western blot

Introduction

Fatty acid synthase (FASN) is the major enzyme responsible for the synthesis of fatty acids. It is a very large protein comprising six different catalytic domains. The best studied role played by FASN is energy storage via lipogenesis, a metabolic process in which de novo fatty acids are synthesized from carbohydrates. Fatty acids can then be condensed with glycerol to form triglycerides to be stored into lipid droplets in adipocytes or secreted in the form of VLDL (very low density lipoproteins) by the liver. But, the activity of FASN is not confined solely to "fat accumulation". FASN also produces palmitoyl–CoA that serves to covalently modify cell signaling proteins such as the small G-protein N-Ras [1] and the secreted factor Wnt1 whose *S*-palmitoylation reduces degradation of β-catenin in immortalized prostate cell lines [2]. In addition, with microsomal elongases (Elovl, elongation of very long chain fatty acids proteins), FASN takes part in the production of long-chain saturated fatty acids which are crucial for the building of lipid microdomains that ensure the correct localization and activation of receptors, hence potentiating mitogenic signal transduction [3, 4]. Finally, FASN participates in the production of secondary messengers like PIP3 (phosphatidylinositol–3,4,5–triphosphate) and LPA (lysophosphatidic acid) that, respectively, activate the mitogenic PI3K/AKT pathway [5] and GPCR (G protein coupled-receptors) [6]. Many of these functions are particularly valued by cancer cells in which FASN activity is important for membrane growth, sustaining the high proliferation rate of these cells [7]. To enhance tumor cell division, FASN is upregulated in many cancers among which breast [8], colon [9], prostate [10], stomach [11], esophageal [12], melanoma [13], lung [14], pancreatic [15], and ovarian [16] cancers. Blocking FASN activity with the small-molecule inhibitor C75 [17] or more recently with G28UCM in two ovarian cell lines [18] proved to have anticancer properties in vitro, making this enzyme a promising target for cancer therapy. Recently, FASN has been defined as a poor prognosis factor in acute lymphoblastic leukemia (ALL) [19]. The authors proposed that phytochemicals extracted from ginger may be used as inhibitors of FASN to oppose resistance to glucocorticoids in childhood ALL.

O-GlcNAc transferase (OGT) that modifies a large subset of cytoplasmic, nuclear and mitochondrial proteins by *O*-GlcNAcylation is also more heavily expressed and active in cancers [20]. Silencing or inhibiting OGT impairs breast cancer cell growth and invasion [21]. *O*-GlcNAcase (OGA) antagonizes the activity of OGT by removing the sugar moiety from proteins, making *O*-GlcNAcylation a dynamic post-translational modification (PTM) akin to phosphorylation with which it can competes on the same or on neighboring serine or threonine residues [22, 23]. *O*-GlcNAcylation regulates fundamental cellular functions among which signaling, transcription, subcellular localization or protein fate [24, 25]. Concerning the latter role played by *O*-GlcNAcylation, we previously reported that FASN was a substrate of OGT and that its modification by *O*-GlcNAc moieties reduced its proteasomal degradation in a context of lipogenesis [26]. Similarly, Hsieh and collaborators showed that the silencing or inhibition of GFAT-1 (glutamine:fructose–6–phosphate amidotransferase–1), the rate-limiting enzyme of HBP (hexosamine biosynthetic pathway) providing UDP-GlcNAc necessary for OGT catalytic activity, reduced the expression of FASN and other lipogenic actors and inhibited adipogenesis [27]. Of crucial importance, increased activity of HBP is a general hallmark of highly proliferating cancer cells [28]. Besides, inactivation of Emeg32—the glucosamine–6–phosphate acetyltransferase belonging to HBP—decreases MEF (mouse embryonic fibroblast) proliferative rate, underlying the pivotal function of UDP-GlcNAc in cell proliferation [29].

Importantly, *O*-GlcNAcylation levels fluctuate all along the cell cycle. In a general way, an increase in *O*-GlcNAcylation tends to activate cell cycle, as shown in pre-B cells for which the treatment with the OGT inhibitor OSMI-1 leads to a cell cycle arrest [30]. On the other hand, blocking HBP flux with azaserine or DON treatment dramatically reduces MCF7 cells proliferation while inhibition of OGA by NButGT increases proliferation [31]. Interfering with the expression of either OGT or OGA is also deleterious for cell cycle progression as demonstrated especially in HeLa and 3T3-L1 cells [32]. Moreover, we reported that stimulation of starved cells by growth factors [33] or insulin [34] elevates

the expression of OGT and *O*-GlcNAc levels when cells enter G1 phase. The *O*-GlcNAc content decreases in G1/S transition [35], and then re-increases at the G2/M transition [36, 37]. Thus, available literature suggests that FASN and OGT are both critical for proliferation, but how FASN is regulated by *O*-GlcNAcylation during this process has never been explored.

The mTOR (mechanistic target of rapamycin) pathway is another signaling pathway that senses nutrient availability and growth factor or hormones to enable cell growth [38]. *O*-GlcNAc cycling and mTOR pathway are closely linked, a reciprocal control of each other being demonstrated [39, 40]. In this study, we provided additional evidence reinforcing previous findings that *O*-GlcNAcylation takes part in the regulation of FASN expression and activation of mTOR pathway. This suggests that FASN, OGT and mTOR pathway have a synergistic effect on cell cycle and proliferation. Using several cellular and mouse models we show a correlation between the steady-state level of FASN and mTOR activation. Moreover, we provide the evidence that FASN is cyclically expressed along the cell cycle and its level is not only dependent upon *O*-GlcNAcylation but also mTOR activation during G1 phase. In turn, blocking FASN activity decreases OGT activity and reduces mTOR signaling pathway, defining a novel feedback loop between *O*-GlcNAc cycling, the growth factors/nutrient-dependent pathway and the lipogenic enzyme. Overall, these findings provide evidence of a complex cross-regulation between *O*-GlcNAcylation processes, FASN and mTOR pathway, and that a deregulation in any of them could impact the two others leading to loss of control of cell cycle and ultimately to carcinogenesis.

Materials and methods

Reagents, siRNA and antibodies

Ac5SGlcNAc (kind gift from Pr. David Vocadlo's laboratory), Rapamycin (Santa Cruz, sc-3504), and C75 (CliniSciences, sc-1547-1) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a concentration of 50 mM, 1 mM, and 50 mM as stock solutions, respectively. Control siRNA (siCtrl) (MISSION siRNA universal negative control) and siRNA targeting human OGT (siOGT) were from Sigma-Aldrich. The antibodies used are listed in Supp. table 1.

Cell culture

All cell lines were provided from the ATCC except the IHH cells that is from the EGID (European Genomic Institute For Diabetes) in Lille. The human hepatocarcinoma HepG2 and the human colon carcinoma HCT116 cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Lonza) supplemented with 25 mM glucose. The human hepatocarcinoma Hep3B cell line was cultured in Minimal Essential Medium (MEM, Biowest) supplemented with 5 mM glucose. The immortalized human hepatocyte IHH cell line was cultured in William's E Medium (Lonza) supplemented with 10 mM glucose, and human fetal colon CCD841CoN cells were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, Lonza) supplemented with 5 mM glucose. All cells were maintained in medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) (Dominique Dutscher) and 2 mM L-glutamine and incubated at 37 °C, in a 5% (v/v) CO_2-enriched, humidified atmosphere.

Cell cycle synchronization, cell treatment and cell transfection

The cells were synchronized by preventing them from serum. Twenty-four hours after seeding, cells were washed twice with Phosphate-Buffered Saline (PBS) and kept in serum-free medium for 24 h or 48 h (time 0 h). Then they were stimulated with 10% (v/v) FCS for the indicated times. The cell cycle progression was monitored by propidium iodide (PI) staining and analysis by flow cytometry, as previously described [41].

Serum-starved HepG2 cells were treated, respectively, with the OGT inhibitor Ac5SGlcNAc (50 µM) or the mTOR inhibitor rapamycin (50 nM) for the indicated time periods. For time-course experiments, cells were pre-treated 1 h prior stimulation with serum. Regarding the FASN inhibitor C75, HepG2 cells were treated for 72 h at concentrations ranging from 40 µM to 100 µM. For each inhibitor, DMSO was used as negative control (vehicle).

HepG2 cells were cultured in DMEM-10% (v/v) FCS on coverslips and when 70% of confluence was reached, cells were transiently co-transfected for 24 h with GFP-OGT and Cherry-FAS (1 µg/well in 6-wells plate) using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen).

For small interfering RNA (siRNA) reverse transfection, siCtrl or siRNA targeting OGT (siOGT, 10 nM) were administered to HepG2 cells (1×10^6 cells/100-mm dish) with Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) as described in [41]. Forty-eight hours later, cells were serum-starved for 24 h and then stimulated with serum for the indicated time periods.

Cell viability assay

HepG2 cells were seeded in 96-well plates treated with C75 at various concentrations (40–100 µM) for 72 h. Efficiency of C75 was evaluated by measuring cell viability using the

MTS reagent (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Fluorescence microscopy and proximity ligation assay (PLA)

For cells transfected with GFP-OGT and Cherry-FAS, cells were washed three times in ice-cold PBS before fixation in 4% (w/v) paraformaldehyde (PAF) in PBS at room temperature for 20 min. After three washes with PBS, the nuclei were labeled with a DAPI solution at 50 µg/mL for 10 min. The coverslips were rinsed with ultrapure water and mounted on slides using Mowiol medium (Calbiochem, Merck chemicals). The fluorescence was detected on a Leica AF 6000LX microscope and the images were analyzed with Fiji software (inter-Schindelin).

For indirect immunofluorescence and PLA, the fixation with PAF was followed by quenching with 100 mM glycine (pH 7.4) in PBS for 20 min and three washes in PBS (5 min per wash, at RT). Then cells were permeabilized with 0.5% (v/v) Triton X-100 in PBS for 20 min. After three washes, coverslips were incubated with blocking buffer (2% (v/v) FCS, 2% (w/v) bovine serum albumin and 0.2% (w/v) gelatin in PBS) for 1 h at RT and subsequently incubated with the primary antibodies (1:100 for OGT (DM17) and 1:50 for FAS) (Supp. Table 1) diluted in the blocking buffer, overnight at 4 °C. For immunofluorescence, coverslips were washed tree times with PBS and incubated with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:600 in blocking buffer) (Supp. Table 1) for 1 h in the dark, at RT (Alexa 488 (rabbit) and Alexa 568 (mouse). For PLA (Duolink in situ kit, Sigma-Aldrich), after primary antibodies incubation and two washes in PBS, the coverslips were incubated with PLA PLUS and MINUS probes for mouse and rabbit, respectively, for 1 h, followed by 30 min incubation with the ligase (ligation step), and followed by incubation with the polymerase for 3 h (amplification step, Duolink in situ detection reagents Green, $\lambda_{ex} = 495$ nm and $\lambda_{em} = 527$ nm) in a humidifier chamber at 37 °C. Two washes with buffer A (Tris–HCl, NaCl, Tween-20, pH 7.4) were performed between each step as described in [41]. Finally, coverslips were washed twice with buffer B (Tris–HCl, NaCl, pH 7.5) for 10 min before mounting slides in mounting solution which also allows to stain the nucleus (ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI, Molecular Probes). Negative controls were done using only the secondary antibodies for immunofluorescence and using only one primary antibody for PLA. The fluorescence was detected with an inverted Zeiss LSM700 confocal microscope with a 40 × oil immersion lens at room temperature and data were collected with the ZEN 2010 software (Zeiss, Oberkochen, Germany). The images were analyzed with ImageJ.

Cell fractionation

HepG2 cells were fractionated using a commercial kit (Subcellular Proteome Extraction Kit, Calbiochem) according to the manufacturer's instructions.

Co-immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation (Co-IP) experiments were conducted as described in [42]. Briefly, cell lysis was performed in a buffer containing 10 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Triton-X100, 0.5% (m/v) sodium deoxycholate (NaDOC), pH 7.5 (Co-IP buffer). The cell lysates were centrifuged at 20,000×*g* for 15 min at 4 °C. Thirty µg of proteins were set aside for control (input) and 1 mg was precleared with a mix of protein A and protein G-coupled Sepharose beads (50:50 ratio) (GE Healthcare) in Co-IP buffer for 1 h at 4 °C (20 µL per mg of proteins). After centrifugation at 1200×*g* for 5 min, the supernatant was incubated with anti-OGT (Ti14) antibodies overnight at 4 °C (5 µg antibodies per mg of proteins). Then, protein A-coupled Sepharose beads were added and incubated for 1 h (30 µL per mg of proteins). After centrifugation at 200×*g* for 5 min, beads were washed three times with Co-IP buffer (5 min), once in high-salt containing Co-IP buffer (450 mM NaCl), and a last one with Co-IP buffer, and finally boiled in Laemmli buffer before resolution by SDS-PAGE and analysis by Western blotting.

Western blotting

Cells were first washed twice with ice-cold PBS and then incubated for 20 min with lysis buffer (10 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 0.1% (m/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% (v/v) Triton-X100, 0.5% (m/v) sodium deoxycholate (NaDOC), pH 7.5) containing protease inhibitors (protease cocktail inhibitors, Sigma-Aldrich), 50 mM sodium fluoride (NaF, Sigma-Aldrich) and 1 mM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich). The cell lysates were then centrifuged at 20,000×*g* for 15 min at 4 °C. The supernatants were collected and protein concentrations were measured using the micro BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Proteins (20 µg per lane) were resolved by 6 or 8% SDS-PAGE in electrophoresis buffer (25 mM Tris–HCl, 192 mM glycine, 0.1% (m/v) SDS, pH 8.8) and transferred onto nitrocellulose membranes (HybondTM-C EXTRA, GE Healthcare) in transfer buffer (25 mM Tris–HCl, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, pH 8.8). Membranes were stained with Ponceau red (5% (v/v) acetic acid and 0.1% (w/v) Ponceau red) to assess

equal loading. Membranes were destained with TBS (Tris-Buffered Saline)—Tween20 (20 mM Tris–HCl, 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween20 (Sigma-Aldrich), pH 7.5) (TBS-T), subsequently blocked in 5% (w/v) nonfat dry milk or BSA in TBS-T, and probed overnight at 4 °C with primary antibodies (Supp. Table 1). After three TBS-T washes, membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-mouse or anti-rabbit IgG-HRP linked, Supp. Table 1) for 1 h at room temperature. After three TBS-T washes, blots were developed using enhanced chemiluminescence (West Pico Plus, ThermoScientific). The images were acquired using a CCD camera (Fusion Solo, Vilbert Lourmat). For additional probing, the membranes were stripped in the *Antibody Stripping Buffer* (Gene Bio-Application L.T.D.) for 15 min at RT, washed in TBS-T and re-probed with antibodies. Densitometry analyses of Western blot images were done using Image J software.

mRNA extraction and RT-qPCR analysis

Extraction of mRNA was performed using the Nucleospin "DNA, RNA and protein purification" kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. Assay of RNA was carried out using a Nanodrop type system. Reverse transcription was carried out on 1 µg of RNA with the Maxima First Strand cDNA Synthesis kit for RT-qPCR (Thermo Scientific) and the following incubation step: 10 min at 25 °C, 30 min at 50 °C and 5 min at 85 °C. The FASN, OGT, SREBP, ChREBP and RPLP0 transcripts were analyzed by RT-qPCR using Mx4000 Multiplex Quantitative PCR system (Stratagene). Each PCR reaction contains 12.5 µL of SyberGreen, 300 nM of each primer (Supp. Table 2) and 2 µL of cDNA for a total volume of 25 µL.

In vivo experiments

All the procedures were carried out according to the French guidelines for the care of experimental animals and the experimental procedure was approved by the Animal Care Committee of the French Research Ministry (Autor. APAFiS #1879-2018121918307521 and A75-14-08). Eight-weeks-old C57BL6 and *ob/ob* obese male mice were purchased from Charles River Elevage (Saint-Germain sur l'Arbresle, France) and adapted to the environment for 1 week prior to experiments. The mice were maintained in a 12 h light/12 h dark cycle with free access to water and food. The body weight and blood glucose levels were determined. Before being sacrificed, mice were fasted by preventing access to food for 18 h. Livers were collected and lysed in 1 mL of lysis buffer for proteins or 1 mL of RA1 buffer (containing chaotropic salt) for mRNA extraction. Gentle MACS Dissociator (MACS Miltengi Biotec) and gentle MACS M Tubes were used for tissue disruption. The soluble fractions were obtained after centrifugation at 1000×*g* for 3 min (mRNA) and 20,000×*g* for 15 min (proteins).

Hepatic mouse mutant of PTEN has been previously described [43]. Pre-tumoral male mice between 5–6 months of age were used in the experiments. Animals were maintained in grouped cages in a temperature-controlled pathogen-free facility on 12 h/12 h (8 am–8 pm) light/dark cycle and had free access to water and standard chow (Teklad global protein diet; 20% protein, 75% carbohydrate, 5% fat). Animals were sacrificed in random fed state between 2 and 4 pm (ZT6-ZT8).

Histological and morphometric analyses

For immunohistochemical analysis, liver tissue was fixed overnight in phosphate-buffered 10% (w/v) formalin and embedded in paraffin. Four µm sections were cut and processed for immunohistochemical analyses. Immunohistochemistry of liver tissue sections was performed using anti-phospho-rpS6, anti-FASN or anti-*O*-GlcNAc antibodies (see Supp. Table 1 for references) following manufacturer guidelines and procedure described before [44]. The signal was quantified using Fiji as previously detailed in [45]. Results were expressed as optical densities (OD) calculated from intensity values as follows: OD = log (max intensity/mean intensity) in a total area of at least ten sequential fields of 33,500 μm^2 tissue analyzed.

Results

OGT and FASN functionally interact.

OGT is mainly expressed in the cytoplasm and the nucleus [46], while the mOGT mitochondrial isoform of OGT (mOGT) localizes to the mitochondria [47]. Cytoplasmic localization of FASN has been extensively reported albeit Madigan and collaborators have detected the enzyme in the nucleus of prostate cancer cells and in prostate cancer tissues of patients [48]. By immunofluorescence (Fig. 1A) and using fusion proteins (Supp. Fig. 1A) we observed that both OGT and FASN are distributed in the cytoplasm of the hepatocellular carcinoma HepG2 cell line. A similar observation was made in the hepatocellular carcinoma Hep3B cell line (Supp. Fig. 1B). Subcellular fractionation of cell cycle phase synchronized HepG2 cells depleted from serum (G0 phase) or serum-depleted and then stimulated with serum to re-enter the G1 phase strengthened that OGT and FASN co-localize in the cytoplasmic fraction (Supp. Fig. 1C). OGT was also found in the nucleus, as expected, while we did not detect FASN in the nuclear fraction. Both enzymes

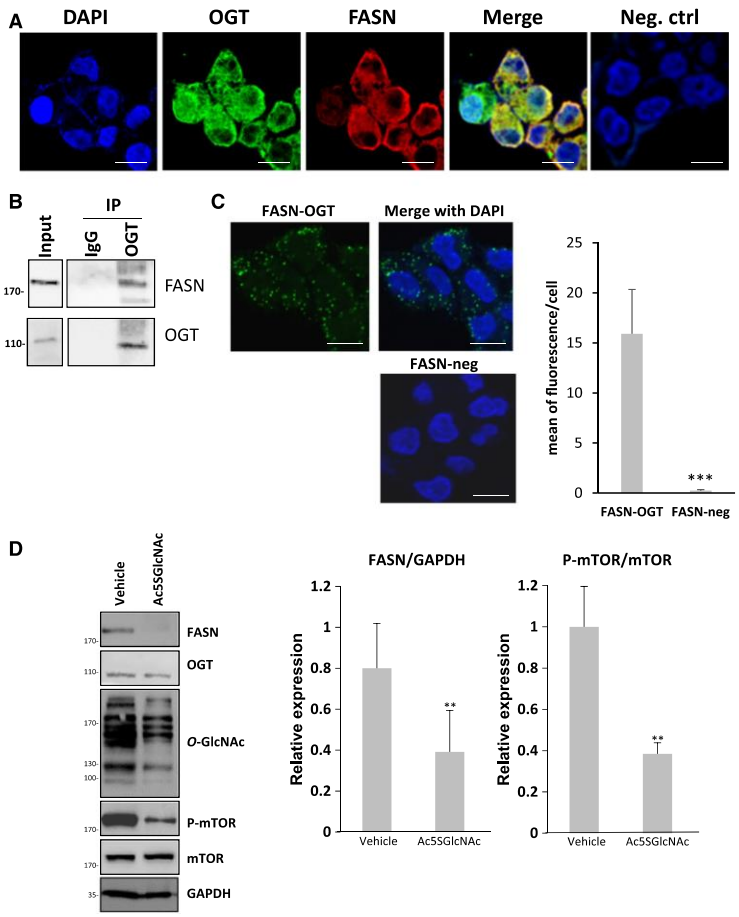


Fig. 1 OGT interacts with FASN and inhibition of its catalytic activity reduces FASN expression. **a** Confocal microscopy analysis of HepG2 cells indicate that OGT and FASN are mainly co-expressed in the cytoplasm (bar size: 15 µm). **b** Co-IP and **c** in situ PLA approach (bar size: 15 µm) reveal that OGT and FASN are interacting partners (negative control was performed by omitting one of the two primary antibodies). Nuclei were counterstained with DAPI. Quantification of PLA is presented at the right. **d** Asynchronous HepG2 cells were treated with Ac5SGlcNAc, an inhibitor of OGT, for 18 h or with vehicle (DMSO). Efficiency of OGT inhibition was checked by staining proteins with an anti-*O*-GlcNAc antibody, and mTOR inactivation was evaluated with an anti-phospho-mTOR (Ser2448) antibody. Analysis of protein lysates by Western blot shows that OGT inhibition reduces FASN expression and mTOR activation. Optical densities corresponding to FASN, phospho-mTOR and mTOR were measured and accordingly FASN/GAPDH ($n=6$) and phospho-mTOR/mTOR ($n=3$) were calculated and reported. For Western blots, molecular mass markers are indicated on the left (kDa). Bar size: 15 µm. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$

are also detected in the membrane fraction, as previously reported for the glycosyltransferase [34, 49]. Interestingly, the cytoplasmic levels of FASN and OGT increase following serum stimulation of starved cells (attested by the presence of phosphorylated-AKT in the membrane fraction) (Supp. Fig. 1C). Co-IP experiments (Fig. 1B) and in situ proximity ligation assays (PLA) (Fig. 1C) corroborated the interaction between FASN and OGT in HepG2 cells, as we previously showed [26]. As shown by PLA, OGT and FASN are found in close proximity mainly in the cytoplasm (Fig. 1C). Since *O*-GlcNAcylation levels are dependent upon glucose concentration [50, 51], we evaluated the interaction between FASN and OGT in a physiological concentration of glucose (5 mM) versus in high glucose conditions (25 mM) (Supp. Fig. 2A). Interestingly, this interaction seems to be dependent upon glucose concentration since a higher PLA signal was observed in the high glucose condition compared to the low glucose one. Western blot analysis showed that FASN and *O*-GlcNAcylation levels are much more elevated in high glucose concentration (Supp. Fig. 2B) indicating that an increased interaction between the two enzymes would result in a greater part from an increased expression of FASN.

Owing to that (i) FASN expression is dependent on *O*-GlcNAcylation in a context of lipogenesis [26], and (ii) that activation of mTOR pathway is under the control of *O*-GlcNAcylation status and reciprocally [40], we further investigate whether both the level of FASN and activation of mTOR are dependent on OGT activity. Treatment of HepG2 cells with Ac5SGlcNAc, a potent OGT's inhibitor, for 24 h

revealed that both the steady-state level of FASN and activation of mTOR, as evaluated by phosphorylation at Ser2448, are significantly reduced when OGT is inhibited (Fig. 1D).

FASN protein expression positively correlates with mTOR activation

We then hypothesized that, in addition to be regulated by *O*-GlcNAcylation, FASN expression depends on mTOR status. To test this hypothesis, we explored GEPIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis) database and performed correlation analyses to evaluate the pair-wise co-expression of the gene encoding FASN versus a PI3K/AKT/mTOR signaling signature (*PI3KCA, AKT, MTOR, RPTOR, RPS6KB1, EIF4E*) (Supp. Fig. 3A). Data showed a significant positive correlation between the levels of these transcripts in healthy liver or colon/rectum and corresponding cancer tissues, with a correlation coefficient values of $R = 0.41$ ($n = 50$; p value, 0.0037) for healthy liver, $R = 0.29$ ($n = 369$; p value, 1.3e−8) for LIHC (liver hepatocarcinoma), $R = 0.56$ ($n = 51$; p value, 3.1e−05) for healthy colon and rectum, and $R = 0.48$ ($n = 367$, p value, 3.2e−22) for colorectal cancer (COAD/READ). Next, we analyzed the expression levels of FASN and OGT, and the activation status of mTOR in four different liver or colon asynchronous cell lines (Supp. Fig. 3B). As shown by Western blot, expression of FASN is higher in HT29 and HCT116 colon cancer cells compared with the non-cancerous CCD841CoN colon cell line. Moreover, FASN protein is more strongly expressed in hepatocarcinoma HepG2 cells compared to colon cancer cells. Interestingly, the expression of FASN positively correlated with the *O*-GlcNAcylation profile and the phosphorylation of mTOR in the four cell lines (Supp. Fig. 3B).

Next we used two distinct mouse models in which upregulation of mTOR was described: the *ob/ob* (obese) mice [52] and mice with liver-specific deletion of *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) [43]. To further characterize the relationship between FASN, *O*-GlcNAcylation and mTOR activation, we first compared livers from C57Bl6 mice to those from *ob/ob* mice (Fig. 2). Prior animal sacrifice, mice were starved for 18 h, and blood glucose levels and body weights were measured (Supp. Fig. 4). While no significant difference between the two groups was found for the blood glucose concentrations, *ob/ob* mice had a double weight compared to the control group as expected (Supp. Fig. 4). As shown by Western blotting from liver lysates, a dramatic increase in the FASN expression level was observed in *ob/ob* mice compared to control mice, concomitantly to higher *O*-GlcNAc levels and mTOR activation which was assessed by the phosphorylation of the downstream target p70S6K (p70 Ribosomal protein S6 Kinase) at Thr389 (Fig. 2A, B). The protein and mRNA levels of OGT were steady between the two groups suggesting that the increase *O*-GlcNAcylation levels observed in livers of obese mice may be due to changes in OGT activity (Fig. 2A, B). RT-qPCR analysis showed an increase in mRNA expression of FASN and SREBP (Sterol Responsive Element Binding Protein), a driver of FASN transcription (Fig. 2C), indicating that FASN expression is upregulated at the transcriptional level in obese mouse liver. However, the increase in FASN protein levels (Fig. 2A, B) cannot be only explained by the increase in FASN transcripts (80-fold increase for the protein versus 2.5-fold increase for mRNA), suggesting that FASN protein expression is likely also upregulated in a post-translational manner in *ob/ob* mice. Overall, in obese mice, increased FASN protein expression positively correlates with mTOR activation and levels of *O*-GlcNAc.

Then, we used a mouse model of chronically activated insulin and mTOR signaling due to hepatocyte specific inactivation of lipid phosphatase PTEN (AlbCre^{+}:PTEN$^{f/f}$ versus PTEN$^{f/f}$ mice) [43]. The hepatic specific PTEN KO develop severe liver hypertrophy and steatosis due to increased de novo lipid synthesis dependent on transcriptional activity of PPARγ [44, 53]. As *PTEN*-null mice develop hepatic adenomas, followed by hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma with 100% penetrance, they represent a pertinent liver cancer model recapitulating major manifestations of human disease associated with fatty liver [43]. Thus, we asked whether marked liver steatosis in pre-tumoral PTEN mutants correlated with changes in *O*-GlcNAc pathway. For this, livers from 5–6-months-old pre-tumoral *PTEN*-null mice were analyzed by Western blot (Fig. 3A, B) and IHC (Fig. 3C, D). As expected, in line with activated insulin signaling, Western blot analyses revealed an activation of AKT as well as a significant increase in phosphorylation of p70S6K (Fig. 3A, B). The activation of mTOR was also evidenced by the phosphorylation of AKT substrate PRAS40 (proline-rich AKT substrate of 40 kDa) protein, an inhibitor of mTOR of which phosphorylation at Thr246 relieves its repressive function on mTORC1. Furthermore, the immunohistological analyses demonstrated increased phospho-rpS6 (ribosomal protein S6, effector of p70S6K) levels in the liver tissue of PTEN mutants compared to controls (Fig. 3C, D). Consistent with previous reports and in line with increased steatosis of PTEN mutants, the expression of FASN protein was significantly upregulated and most evidently observed in steatosis regions of liver tissue (Fig. 3C, D). Notably, both increased FASN and activated mTOR signaling were positively correlated with increased *O*-GlcNAc levels (Fig. 3C, D). Surprisingly, we found that OGT protein levels were decreased in livers of PTEN mutants compared to age-matched controls (Fig. 3A, B). No difference in protein levels of unprocessed and mature form of SREBP (nuclear form ~ 50 kDa) was observed between the two groups of mice (Fig. 3A, B). Altogether, the observations in these two distinct animal models

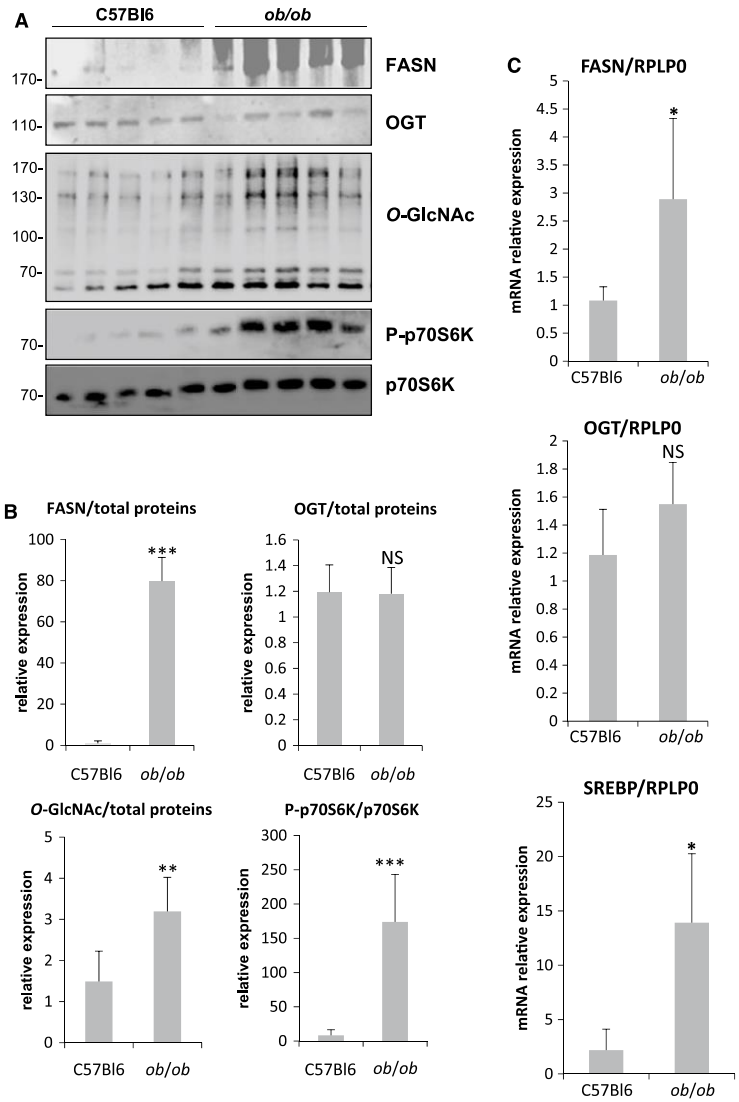


Fig. 2 Obese mice exhibit high FASN and *O*-GlcNAcylation contents, and mTOR activation in liver. **a** Livers from *ob/ob* mice versus C57Bl6 mice were analyzed according to their FASN, OGT and *O*-GlcNAc levels by Western blot. Activation of the mTOR pathway was evaluated using an anti-phospho-p70S6K antibody. Molecular mass markers are indicated on the left (kDa). **b** Optical densities corresponding to FASN, OGT, *O*-GlcNAcylation, P-p70S6K, and p70S6K were measured and accordingly FASN/total proteins, OGT/total proteins, *O*-GlcNAc/total proteins, and P-p70S6K/p70S6K ratios were calculated and reported. **c** Levels of mRNA encoding FASN, OGT and SREBP were measured by RT-qPCR. Values were normalized to RPLP0. *NS* non-significant; $*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$ ($n=5$)

of hepatic steatosis indicate that FASN-driven activated de novo lipogenesis and mTOR signaling are positively correlated with increased *O*-GlcNAcylation.

Expression of FASN depends on OGT activity in serum stimulated-cells

FASN is not only necessary for energy storage, it is also crucial for cell proliferation, a process in which the enzyme plays diverse functions including the supply in fatty acids that contribute to the building of membranes in dividing cells. To analyze the expression profile of FASN along the

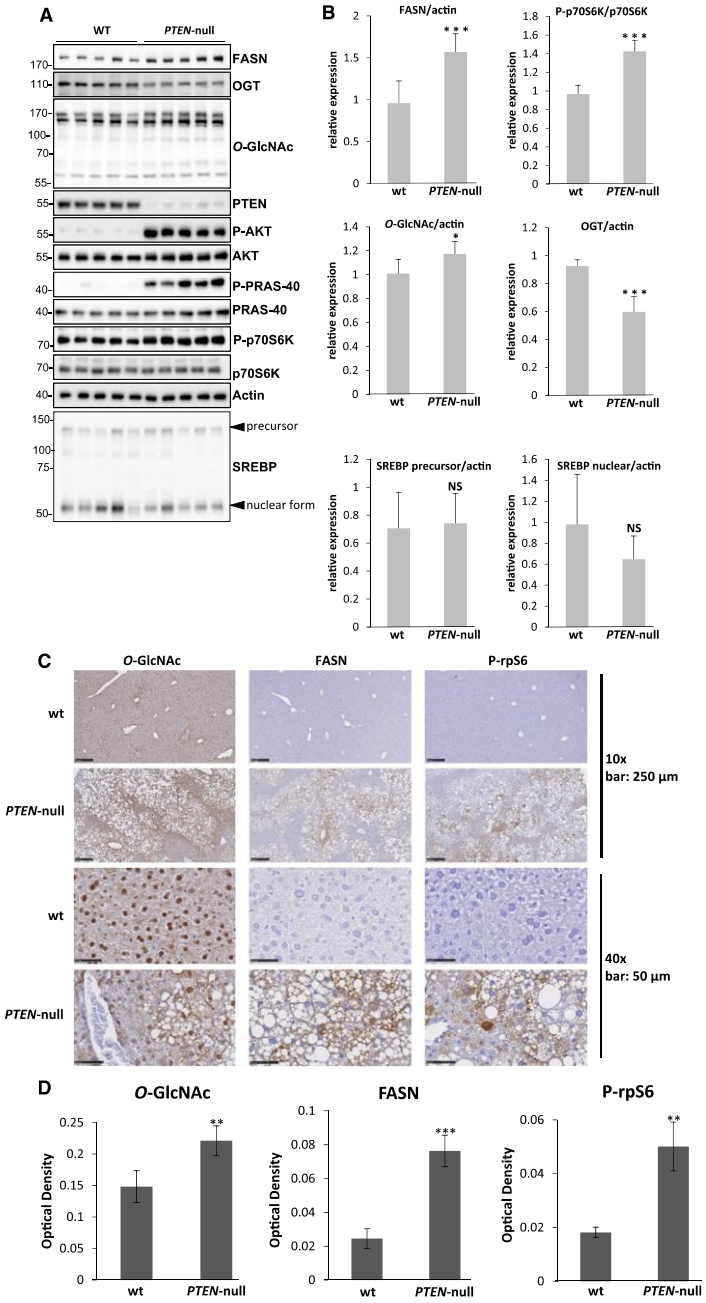


Fig. 3 *PTEN*-null mice show hepatic FASN and *O*-GlcNAcylation increase levels and enhanced mTOR activation. **a** Livers from hepatic *PTEN* mutants versus wild type mice were analyzed by Western blot with indicated antibodies. Molecular mass markers are indicated on the left (kDa). **b** Optical densities corresponding to FASN, OGT, *O*-GlcNAcylation, SREBP (precursor and nuclear form), P-p70S6K, and p70S6K were measured and accordingly FASN/actin, OGT/actin, *O*-GlcNAc/actin, SREBP (precursor or nuclear form)/actin, and P-p70S6K/p70S6K ratios were calculated and reported. **c** The same samples were also analyzed by immunohistochemistry for expression of FASN, activation of mTOR pathway (phospho-rpS6) and evaluation of *O*-GlcNAcylation levels. **d** Quantification was done with Fiji software and values were accordingly represented as histograms. *NS* non-significant; $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$ ($n=5$)

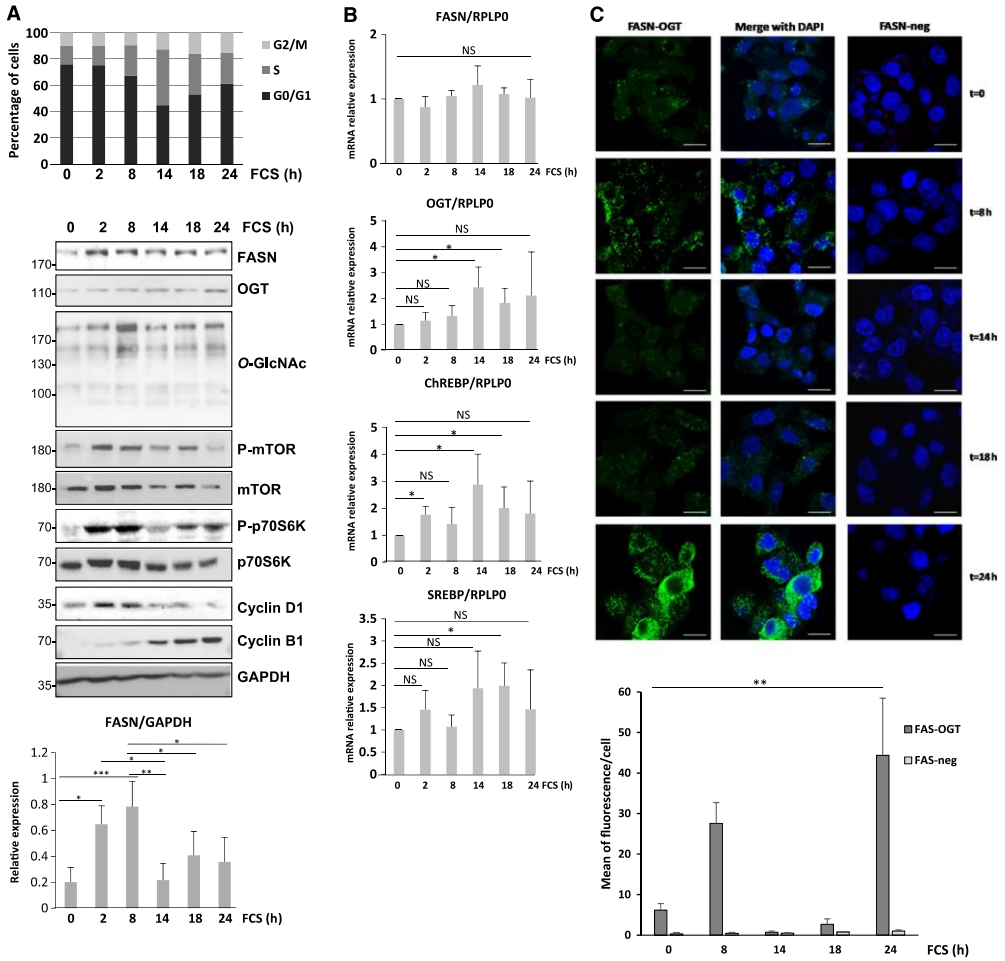


Fig. 4 FASN expression is induced by serum, and FASN and OGT interact differentially along cell cycle progression. **a** HepG2 cells were serum-starved for 24 h and then cell cycle was released by addition of serum. Serum-induced cells were collected at the indicated time periods after serum addition and analyzed by FACS: the percentage of cells in G0/G1, S and G2/M phases are indicated. Cell lysates were analyzed by Western blot according to their FASN, OGT and *O*-GlcNAc contents. Phosphorylation of mTOR and p70S6K attests of activation of the mTOR pathway. Progression of the cells along cell cycle is visualized by expression of cyclins D1 and B1. GAPDH serves as equal loading control. Molecular mass markers are indicated on the left (kDa). Optical densities corresponding to FASN were measured (four independent experiments) and accordingly FASN/GAPDH ratios were calculated and reported. **b** Levels of mRNA encoding FASN, OGT, ChREBP and SREBP were measured by RT-qPCR. Values were normalized to RPLP0. HepG2 cells were serum-starved for 24 h and then cell cycle was released by addition of serum. **c** Cells were analyzed by in situ PLA to visualize the interaction between the two partners at different time periods (bar: 15 µm). Negative controls were performed by omitting one of the two primary antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI. Quantification of PLA is presented at the right. Molecular mass markers are indicated on the left (kDa). *NS* non-significant; $*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$ ($n=4$ for proteins, $n=3$ for mRNA)

cell cycle, we synchronized HepG2 cells at G0/G1 using the serum-starvation method followed by serum addition [33]. Serum-induced cells were collected at the indicating times for expression analyses during cell cycle progression (Fig. 4A). The efficiency of cell synchronization and cell cycle progression was monitored by FACS analysis and

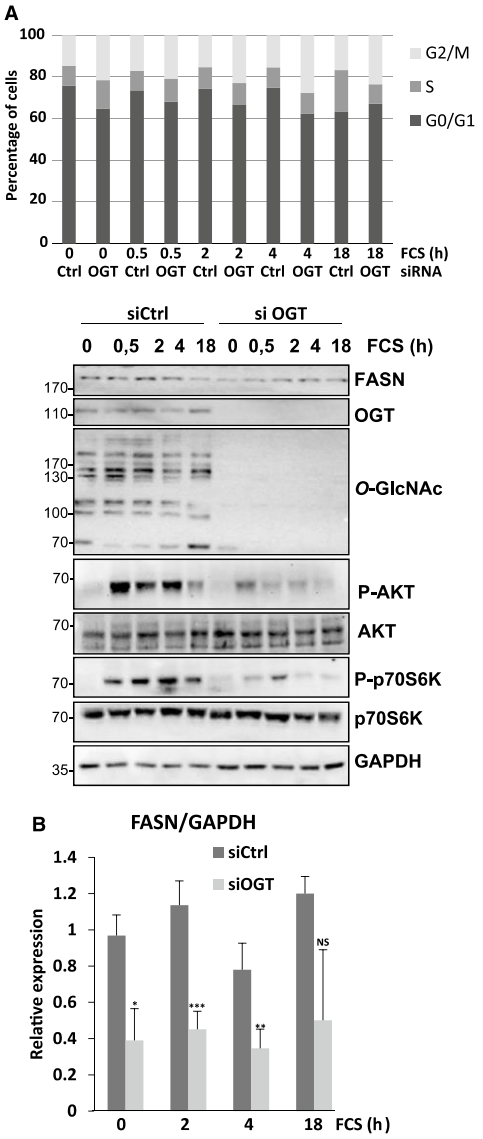


Fig. 5 Silencing OGT reduces FASN expression concomitantly to the inactivation of the mTOR pathway during cell cycle progression. **a** HepG2 cells were transfected with siRNA targeting OGT mRNA prior to serum starvation. Then cell cycle was released by addition of serum and cells were collected at the indicated time periods after serum addition and analyzed by FACS: the percentage of cells in G0/G1, S and G2/M phases are indicated. Cell lysates were analyzed by Western blot according to their FASN, OGT and *O*-GlcNAc contents. Phosphorylation of AKT was evaluated, and activation of the mTOR pathway attested by monitoring the phosphorylation of p70S6K. Molecular mass markers are indicated on the left (kDa). **b** Optical densities corresponding to FASN were measured and accordingly FAS/GAPDH ratios were calculated and reported. *NS* non-significant; $*P<0.05$; $**P<0.01$; $***P<0.001$ ($n=4$)

expression of cyclin D1 (G1 phase progression) and cyclin B1 (G2/M transition) (Fig. 4A and Supp. Fig. 5). FASN expression is rapidly induced upon serum stimulation and its level follows cyclin D1 profile and activation of the mTOR pathway as attested by phosphorylation of mTOR at Ser2448 and phosphorylation of its downstream target p70S6K at Thr389 (Fig. 4A). Then, the enzyme content decreased to be minimal fourteen hours after cell cycle release (cyclin D1 is degraded, both phosphorylation of mTOR and p70S6K decrease, and S phase is maximal) and slightly re-increased later when cyclin B1 was expressed (Fig. 4A). Similar fluctuation of FASN expression during cell cycle was also observed in the immortalized human hepatocyte cell line IHH (Supp. Fig. 6). As we previously reported [33], upon mitogenic stimulation, the OGT level is increased in a constant manner (Fig. 4A and Supp. Fig. 6). Notably, the effect on FASN protein levels was post-transcriptional since its transcript levels were unmodified throughout our serum stimulation experiments (Fig. 4B). At the same time, the transcripts of OGT, SREBP and ChREBP (Carbohydrate Responsive Element Binding Protein), another transcriptional factor driving FASN mRNA transcription, varied along cell cycle (Fig. 4B). Thus, the cell cycle phase dependent fluctuation of FASN protein rather results from proteostasis and PTMs than from transcriptional processes. This experiment shows that the expression of FASN progressively increases during G1 phase, decreases in S phase and then re-augments in G2 phase. Moreover, OGT regularly increased upon stimulation all along the cell cycle as previously observed for serum [33] or insulin [34] stimulation.

Next, we wondered whether the complex between OGT and FASN changes along the cell cycle progression. For this the synchronized HepG2 cells were analyzed using PLA (Fig. 4C). The basal interaction between the partners observed in starved cells ($t=0$) increased after 8 h of serum stimulation when cells were mostly in G1 phase. Then the interaction decreased in S phase ($t=14$ h) and re-increased 24 h after stimulation, when the cell population was in G2/M. The changes in the interaction between OGT and FASN are likely to follow the cyclic expression of FASN during cell cycle progression. Finally, we performed the same time-course experiment in HepG2 cells transfected with siRNA targeting OGT (Fig. 5). As shown by Western blot, the strong decrease in *O*-GlcNAcylation in siOGT cells compared to siCtrl cells disturbed the serum-induced time-course expression of FASN, reduced the phosphorylation of

both AKT and p70S6K, and disturbed the distribution of the cells in the cell cycle. OGT expression is thus fundamental for the correct induction of FASN expression and activation of mTOR pathway during cell cycle entry.

Expression of FASN during G1 phase is dependent upon mTOR activation

We reported previously that expression of FASN was dependent upon *O*-GlcNAcylation status during lipogenesis [26] and that OGT and mTOR regulate each other in a reciprocal manner [40]. Here, we showed that induction of FASN expression follows the serum-induced activation of mTOR (Fig. 4), while inhibition or silencing OGT reduced FASN expression and mTOR activation concomitantly (Figs. 1D, 5). Altogether, these observations suggested that synthesis of FASN may also depend on mTOR pathway. We therefore investigated the role of mTOR pathway on FASN expression during G1 phase. Starved HepG2 cells were synchronized by serum starvation for 48 h and then re-stimulated with serum for 3 h, with or without the mTOR inhibitor rapamycin (Fig. 6). As shown by Western blotting, FASN levels significantly decreased upon mTOR inhibition which was ascertained by the lack of phosphorylation of p70S6K. At the same time mTOR inhibition by rapamycin did not affect neither expression nor maturation of SREBP (Fig. 6A). Moreover, qRT-PCR analysis revealed that blockade of mTOR did not impact the mRNA levels of FASN, SREBP or ChREBP (Fig. 6B).

Next, we tested the effect of Ac5SGlcNAc and rapamycin on IHH cells for 24 or 48 h (Supp. Fig. 7). Both inhibitors decreased the expression of FASN but the combined action of these two molecules resulted in only a very moderate synergistic effect. This indicates that FASN expression is not only under the control of *O*-GlcNAcylation and mTOR pathway in cancer-derived cells but also in immortalized human hepatocytes.

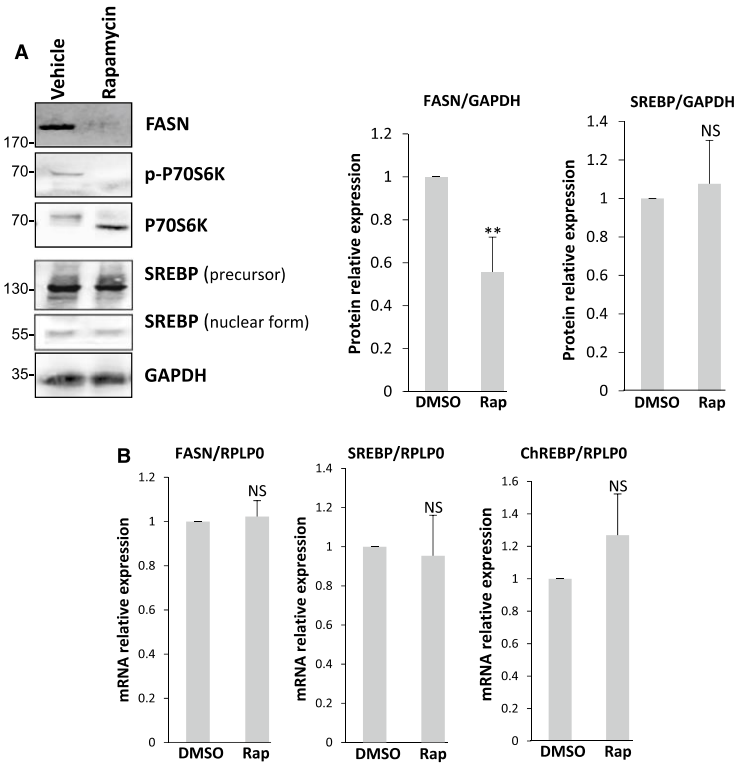


Fig. 6 Inhibition of mTOR drastically reduces FASN expression. **a** Serum-starved HepG2 cells were released from G0 to G1 by incubation with serum for 3 h with or without the potent mTOR inhibitor rapamycin. FASN and SREBP expression, and activation of mTOR were analyzed by Western blot. Molecular mass markers are indicated on the left (kDa). **b** Optical densities corresponding to FASN and SREBP were measured and accordingly FASN/GAPDH and SREBP/GAPDH ratios were calculated and reported. Levels of mRNA encoding FASN, ChREBP, SREBP, GK and ACC were measured by RT-qPCR. Values were normalized to RPLP0. *NS* non-significant; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$ ($n=3$)

Blockade of FASN activity impacts OGT expression and mTOR activation

Since we showed that FASN expression correlates with the activity of both OGT and mTOR, we wondered whether FASN could in turn control OGT, as well as activation of the mTOR pathway. To answer this question, we treated asynchronous HepG2 cells with increasing concentrations of the small-molecule inhibitor C75, a synthetic analog of the natural inhibitor of FASN cerulenin [54]. Efficiency of C75 was first evaluated by the MTS method [55]: we observed a 50% decrease in cellular viability at 80 µM and 100 µM of C75 (Fig. 7A). In treated cells, we observed a significant decrease in OGT expression level in a dose-dependent manner, from 60 to 100 µM C75; *O*-GlcNAcylation levels and activation of mTOR pathway were significantly reduced at 100 µM C75 (Fig. 7B, C). These results show that FASN inhibition affects both *O*-GlcNAc cycling and mTOR activation, highlighting a reciprocal regulation between FASN, OGT and mTOR pathway.

Discussion

FASN is a fundamental pillar of all living beings, its knockdown preventing implantation of embryos [56]. Using acetyl-CoA, malonyl-CoA and NADPH,H^+, FASN builds acyl-CoA which is widely used in cells, especially for sustaining membrane formation, this process being particularly high in cancer cells. Here, we show that serum mitogenic stimulation of starved cells induces FASN protein expression in an OGT- and PI3K/mTOR-dependent manner.

Induction of OGT expression is also dependent upon mitogenic pathways [33, 34]; in turn OGT activity is necessary for MAPK and PI3K pathways activation [34, 57–59]. Moreover, FASN expression is partly controlled by OGT as we previously reported [26] and observed herein. Inhibition of OGT impairs FASN expression in asynchronous cells, but also reduces mTOR activation as already described in colon cell lines [40]. Since the expression of both OGT and FASN responds to serum stimulation and is closely related

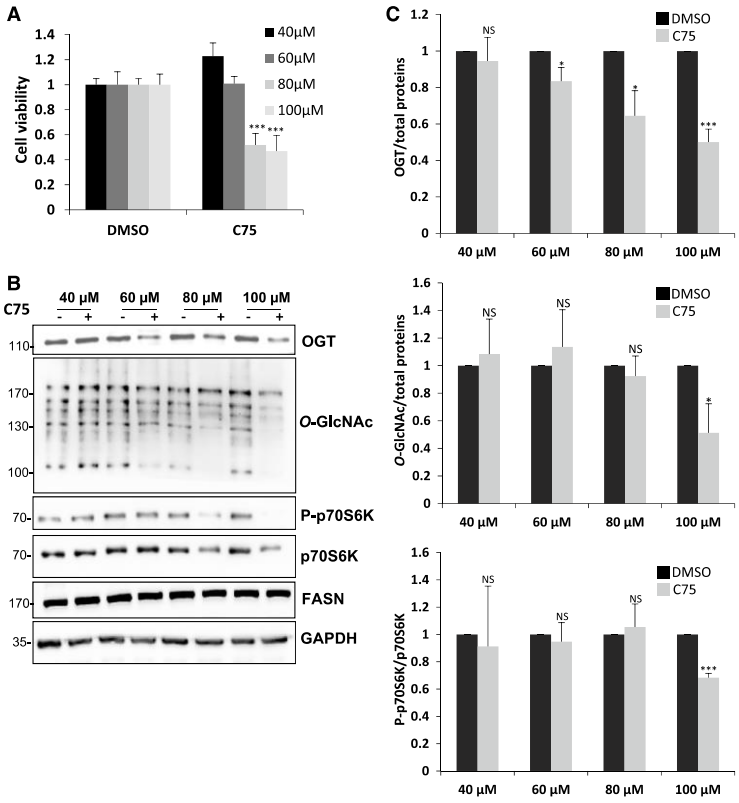


Fig. 7 Inhibition of FASN reduces OGT and *O*-GlcNAc levels, and inactivates mTOR. HepG2 cells were treated with increasing concentrations of the FASN inhibitor C75. **a** Cell viability was monitored to attest of the efficiency of C75. **b** Cell lysates were prepared and analyzed by Western blot according to their OGT, FASN and *O*-GlcNAc levels, and activation of mTOR pathway. Molecular mass markers are indicated on the left (kDa). **c** Optical densities corresponding to OGT, *O*-GlcNAc, P-p70S6K and p70S6K were measured and accordingly OGT/total proteins, *O*-GlcNAc/total proteins and P-p70S6K/p70S6K ratios were calculated and reported below their representative Western blot. *NS* non-significant; $^*P<0.05$; $^{***}P<0.001$ ($n=3$)

to mTOR pathway in HepG2 cells, we therefore, asked whether OGT activity was a prerequisite for FASN expression upon G0/G1 stimulation. We show that silencing of OGT delays the expression of FASN and decreases mTOR activation in synchronized HepG2 cells. Moreover, inhibition of mTORC1 by rapamycin prior to serum stimulation also prevented the expression of FASN, as reported in hepatocarcinoma mouse models [60]. Our findings are in accordance with reported observations of mTOR acting upstream of FASN expression at the protein level but not mRNA level in breast cancer cells [61]. It was reported that the PI3K/AKT/mTOR pathway regulates FASN by inducing the transcription factor SREBP under hypoxia conditions in human breast carcinoma cell lines [62]. But, in our hands, we did not observe any difference in the expression of SREBP in response to mTOR activation in HepG2 cells. To further understand the cross-regulation of FASN and *O*-GlcNAcylation by the mTOR pathway in a more physiological context, we moved on two mice models in which mTOR is aberrantly activated, namely the (*ob/ob*) obese mice [52] and the liver-specific PTEN mutant [43]. Our in vivo observations show that mTOR activation positively correlates with FASN accumulation and a slight increase in global *O*-GlcNAcylation in liver of both animal models. However, upregulation of *O*-GlcNAcylation was not related to an increase in OGT protein levels, indicating that *O*-GlcNAcylation contents depend also on the fine-control of the catalytic activity of OGT and likely of the antagonist enzyme OGA. In addition, our results suggest a reciprocal regulation of mTOR by FASN. Inhibition of the lipogenic enzyme with C75 led to a decrease in phosphorylation of the mTOR downstream target, p70S6K in liver cancer cells. Interestingly, in ovarian cancer cells, blockade of FASN interferes with mTORC1 activation at multiple levels [63]. In another work, Bruning and co-workers demonstrated that downregulation of endothelial FASN inhibits mTOR by accumulation of malonyl-CoA, the main substrate of FASN [64]. Indeed malonyl-CoA covalently links mTOR at Lys1218, hence impairing the kinase activity and consequently angiogenesis.

This cross-regulation between OGT, FASN and mTOR is of particular interest since each of these actors are dependent on the nutritional status. The highly conserved kinase mTOR is part of two complexes, namely mTORC1 and mTORC2. mTORC1, for which the bacterial macrolide rapamycin is an inhibitor [65], is involved in many key cellular processes that integrate various signals like growth factors, energy, oxygen, and nutrients levels to activate protein, lipid and nucleotide synthesis, glutamine metabolism and glycolysis [38]. *O*-GlcNAc homeostasis is directly link to nutrients availability through HBP that is highly dependent among other on glutamine metabolism [51]. Therefore, our data and others strongly suggest that activation of mTORC1 and OGT may converge towards the induction of FASN in a growth factor- and nutrient-dependent manner to coordinate cell cycle progression, especially G1 phase characterized by a sustained protein synthesis, and cellular proliferation. As suggested by our results, this may occur through direct interaction of FASN with OGT on one hand, and, probably, FASN and mTOR on the other hand. In addition, we show in the present study that a small fraction of FASN and OGT is localized at the plasma membrane, as reported in various cell lines [34, 49, 66, 67]. Indeed, at the membrane level, both FASN and OGT are more specifically found in lipid rafts [34, 66] in which the former controls the production of phospholipids [3]. Lipid rafts concentrate modulators of signal transduction and trafficking, thus playing a fundamental role in cell adhesion, migration and proliferation in physiological conditions and cancers [68]. Interestingly, FASN and OGT have been shown to be phosphorylated by tyrosine-kinase receptors [69, 70]. To further elucidate the functional reciprocal regulation of OGT and FASN, it could be interesting to determine whether their tyrosine-phosphorylation status may facilitate their recruitment to the plasma membrane, increases their activity and potentiates the activation of signaling pathways to drive cell proliferation.

While it is well-known that OGT and FASN play both a leading role in cell proliferation, our work sheds additional light on the dual regulation and concerted action of these two enzymes in cell cycle entry and progression in different cell lines and mice models. In addition to this duo, we bring new evidence supporting the crosstalk between FASN, OGT and the nutrient-dependent mTOR pathway, and consequently identifying a new enzymatic triad involved in cell cycle progression.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at https://doi.org/10.1007/s00018-021-03857-z.

Acknowledgements We are grateful to Dr. Julien Thévenet (INSERM, CHU Lille, UMR1190 Translational Research for Diabetes, European Genomic Institute for Diabetes, Lille, France) for helping in harvesting livers form C57Bl6 and *ob/ob* mice. We also thank Pr. David Vocadlo and Dr. Matthew Alteen from the Simon Fraser University for providing Ac5SGlcNAc and the SFR-Necker small animal histology and morphology platform for histological slide preparation.

Funding This research was supported by the University of Lille, the "Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)" and from the "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-JCJC-NUTRISENSPIK-16-CE14-0029) to G.P. SR is a recipient of a fellow from the "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" and from the "Région Hauts-de-France".

Declarations

Conflict of interest The authors declare neither conflict of interest nor competing interests.

Ethics approval All procedures were carried out according to the French guidelines for the care of experimental animals. Experimental

procedure was approved by the Animal Care Committee of the French Research Ministry (Autor. APAFiS #1879-2018121918307521 and A75-14-08).

References

1. Zambetti NA, Firestone AJ, Remsberg JR, Huang BJ, Wong JC, Long AM, Predovic M, Suciu RM, Inguva A, Kogan SC, Haigis KM, Cravatt BF, Shannon K (2020) Genetic disruption of N-RasG12D palmitoylation perturbs hematopoiesis and prevents myeloid transformation in mice. Blood 135(20):1772–1782
2. Fiorentino M, Zadra G, Palescandolo E, Fedele G, Bailey D, Fiore C, Nguyen PL, Migita T, Zamponi R, Di Vizio D, Priolo C, Sharma C, Xie W, Hemler ME, Mucci L, Giovannucci E, Finn S, Loda M (2008) Overexpression of fatty acid synthase is associated with palmitoylation of Wnt1 and cytoplasmic stabilization of beta-catenin in prostate cancer. Lab Investig 88(12):1340–1348
3. Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F, Van de Sande T, Heemers H, Heyns W, Verhoeven G (2003) Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. Biochem Biophys Res Commun 302(4):898–903
4. Helms JB, Zurzolo C (2004) Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. Traffic 5(4):247–254
5. Faes S, Dormond O (2015) PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer. Int J Mol Sci 16(9):21138–21152
6. Liu Y, An S, Ward R, Yang Y, Guo XX, Li W, Xu TR (2016) G protein-coupled receptors as promising cancer targets. Cancer Lett 376(2):226–239
7. Baldini SF, Lefebvre T (2016) O-GlcNAcylation and the metabolic shift in high-proliferating cells: all the evidence suggests that sugars dictate the flux of lipid biogenesis in tumor processes. Front Oncol 22(6):6
8. Milgraum LZ, Witters LA, Pasternack GR, Kuhajda FP (1997) Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. Clin Cancer Res 3(11):2115–2120
9. Rashid A, Pizer ES, Moga M, Milgraum LZ, Zahurak M, Pasternack GR, Kuhajda FP, Hamilton SR (1997) Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. Am J Pathol 150(1):201–208
10. Swinnen JV, Roskams T, Joniau S, Van Poppel H, Oyen R, Baert L, Heyns W, Verhoeven G (2002) Overexpression of fatty acid synthase is an early and common event in the development of prostate cancer. Int J Cancer 98(1):19–22
11. Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T (2002) Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. Histopathology 40(1):71–79
12. Orita H, Coulter J, Tully E, Abe M, Montgomery E, Alvarez H, Sato K, Hino O, Kajiyama Y, Tsurumaru M, Gabrielson E (2010) High levels of fatty acid synthase expression in esophageal cancers represent a potential target for therapy. Cancer Biol Ther 10(6):549–554
13. Innocenzi D, Alò PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G, Ricciardi G, Bosman C, Calvieri S (2003) Fatty acid synthase expression in melanoma. J Cutan Pathol 30(1):23–28
14. Visca P, Sebastiani V, Botti C, Diodoro MG, Lasagni RP, Romagnoli F, Brenna A, De Joannon BC, Donnorso RP, Lombardi G, Alo PL (2004) Fatty acid synthase (FAS) is a marker of increased risk of recurrence in lung carcinoma. Anticancer Res 24(6):4169–4173
15. Alo PL, Amini M, Piro F, Pizzuti L, Sebastiani V, Botti C, Murari R, Zotti G, Di Tondo U (2007) Immunohistochemical expression and prognostic significance of fatty acid synthase in pancreatic carcinoma. Anticancer Res 27(4B):2523–2527
16. Veigel D, Wagner R, Stübiger G, Wuczkowski M, Filipits M, Horvat R, Benhamú B, López-Rodríguez ML, Leisser A, Valent P, Grusch M, Hegardt FG, García J, Serra D, Auersperg N, Colomer R, Grunt TW (2015) Fatty acid synthase is a metabolic marker of cell proliferation rather than malignancy in ovarian cancer and its precursor cells. Int J Cancer 136(9):2078–2090
17. Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, Mani NS, Frehywot GL, Townsend CA (2000) Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase. Proc Natl Acad Sci USA 97(7):3450–3454
18. Grunt TW, Slany A, Semkova M, Colomer R, López-Rodríguez ML, Wuczkowski M, Wagner R, Gerner C, Stübiger G (2020) Membrane disruption, but not metabolic rewiring, is the key mechanism of anticancer-action of FASN-inhibitors: a multi-omics analysis in ovarian cancer. Sci Rep 10(1):14877
19. Ghaeidamini Harouni M, Rahgozar S, Rahimi Babasheikhali S, Safavi A, Ghodousi ES (2020) Fatty acid synthase, a novel poor prognostic factor for acute lymphoblastic leukemia which can be targeted by ginger extract. Sci Rep 10(1):14072
20. Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T (2013) O-GlcNAcylation: a new cancer hallmark? Front Endocrinol (Lausanne) 4:99. https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00099 **(eCollection 2013)**
21. Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, Vosseller K, Reginato MJ (2010) Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. Oncogene 29(19):2831–2842
22. Lefebvre T, Alonso C, Mahboub S, Dupire MJ, Zanetta JP, Caillet-Boudin ML, Michalski JC (1999) Effect of okadaic acid on O-linked *N*-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. Biochim Biophys Acta 1472(1–2):71–81
23. Olivier-Van Stichelen S, Dehennaut V, Buzy A, Zachayus JL, Guinez C, Mir AM, El Yazidi-Belkoura I, Copin MC, Boureme D, Loyaux D, Ferrara P, Lefebvre T (2014) O-GlcNAcylation stabilizes β-catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. FASEB J 28(8):3325–3338
24. Hardivillé S, Hart GW (2014) Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation. Cell Metab 20(2):208–213
25. Yang X, Qian K (2017) Protein O-GlcNAcylation: emerging mechanisms and functions. Nat Rev Mol Cell Biol 18(7):452–465
26. Baldini SF, Wavelet C, Hainault I, Guinez C, Lefebvre T (2016) The nutrient-dependent O-GlcNAc modification controls the expression of liver fatty acid synthase. J Mol Biol 428(16):3295–3304
27. Hsieh TJ, Lin T, Hsieh PC, Liao MC, Shin SJ (2012) Suppression of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase-1 inhibits adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes. J Cell Physiol 227(1):108–115
28. Vasconcelos-Dos-Santos A, de Queiroz RM, da Costa RB, Todeschini AR, Dias WB (2018) Hyperglycemia and aberrant O-GlcNAcylation: contributions to tumor progression. J Bioenerg Biomembr 50(3):175–187
29. Boehmelt G, Wakeham A, Elia A, Sasaki T, Plyte S, Potter J, Yang Y, Tsang E, Ruland J, Iscove NN, Dennis JW, Mak TW (2000) Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. EMBO J 19(19):5092–5104
30. Lee DH, Kwon NE, Lee WJ, Lee MS, Kim DJ, Kim JH, Park SK (2020) Increased O-GlcNAcylation of c-Myc promotes pre-B cell proliferation. Cells 9(1):158. https://doi.org/10.3390/cells9010158
31. Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir AM, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski JC, Lefebvre T (2012) The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of β-catenin and cell proliferation. Am J Physiol Endocrinol Metab 302(4):E417–E424

32. Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW (2005) Perturbations in O-linked beta-*N*-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. J Biol Chem 280(38):32944–32956
33. Olivier-Van Stichelen S, Drougat L, Dehennaut V, El Yazidi-Belkoura I, Guinez C, Mir AM, Michalski JC, Vercoutter-Edouart AS, Lefebvre T (2012) Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. Oncogenesis 1(12):e36
34. Perez-Cervera Y, Dehennaut V, Aquino Gil M, Guedri K, Solórzano Mata CJ, Olivier-Van Stichelen S, Michalski JC, Foulquier F, Lefebvre T (2013) Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. FASEB J 27(9):3478–3486
35. Drougat L, Olivier-Van Stichelen S, Mortuaire M, Foulquier F, Lacoste AS, Michalski JC, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS (2012) Characterization of O-GlcNAc cycling and proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. Biochim Biophys Acta 1820(12):1839–1848
36. Lefebvre T, Baert F, Bodart JF, Flament S, Michalski JC, Vilain JP (2004) Modulation of O-GlcNAc glycosylation during Xenopus oocyte maturation. J Cell Biochem 93(5):999–1010
37. Dehennaut V, Slomianny MC, Page A, Vercoutter-Edouart AS, Jessus C, Michalski JC, Vilain JP, Bodart JF, Lefebvre T (2008) Identification of structural and functional O-linked N-acetylglucosamine-bearing proteins in Xenopus laevis oocyte. Mol Cell Proteomics 7(11):2229–2245
38. Bar-Peled L, Sabatini DM (2014) Regulation of mTORC1 by amino acids. Trends Cell Biol 24(7):400–406
39. Sodi VL, Khaku S, Krutilina R, Schwab LP, Vocadlo DJ, Seagroves TN, Reginato MJ (2015) mTOR/MYC axis regulates O-GlcNAc transferase expression and O-GlcNAcylation in breast cancer. Mol Cancer Res 13(5):923–933
40. Very N, Steenackers A, Dubuquoy C, Vermuse J, Dubuquoy L, Lefebvre T, El Yazidi-Belkoura I (2018) Cross regulation between mTOR signaling and O-GlcNAcylation. J Bioenerg Biomembr 50(3):213–222
41. Leturcq M, Mortuaire M, Hardivillé S, Schulz C, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS (2018) O-GlcNAc transferase associates with the MCM2-7 complex and its silencing destabilizes MCM-MCM interactions. Cell Mol Life Sci 75(23):4321–4339
42. Masclef L, Dehennaut V, Mortuaire M, Schulz C, Leturcq M, Lefebvre T, Vercoutter-Edouart AS (2019) Cyclin D1 stability is partly controlled by O-GlcNAcylation. Front Endocrinol (Lausanne) 22(10):106
43. Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, Sasaki T, Hamada K, Sasaki J, Mizuno K, Hasegawa G, Kishimoto H, Iizuka M, Naito M, Enomoto K, Watanabe S, Mak TW, Nakano T (2004) Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. J Clin Investig 113(12):1774–1783
44. Patitucci C, Couchy G, Bagattin A, Cañeque T, de Reyniès A, Scoazec JY, Rodriguez R, Pontoglio M, Zucman-Rossi J, Pende M, Panasyuk G (2017) Hepatocyte nuclear factor 1α suppresses steatosis-associated liver cancer by inhibiting PPARγ transcription. J Clin Investig 127(5):1873–1888
45. Crowe AR, Yue W (2019) Semi-quantitative determination of protein expression using immunohistochemistry staining and analysis: an integrated protocol. Bio Protoc 9(24):e3465
46. Kreppel LK, Blomberg MA, Hart GW (1997) Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. J Biol Chem 272(14):9308–9315
47. Lazarus BD, Love DC, Hanover JA (2006) Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. Glycobiology 16(5):415–421
48. Madigan AA, Rycyna KJ, Parwani AV, Datiri YJ, Basudan AM, Sobek KM, Cummings JL, Basse PH, Bacich DJ, O'Keefe DS (2014) Novel nuclear localization of fatty acid synthase correlates with prostate cancer aggressiveness. Am J Pathol 184(8):2156–2162
49. Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM (2008) Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. Nature 451(7181):964–969
50. Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, Baldini SF, Dehennaut V, Toillon RA, Le Bourhis X, El Yazidi-Belkoura I, Lefebvre T (2016) Silencing the nucleocytoplasmic O-GlcNAc transferase reduces proliferation, adhesion, and migration of cancer and fetal human colon cell lines. Front Endocrinol (Lausanne) 25(7):46
51. Biwi J, Biot C, Guerardel Y, Vercoutter-Edouart AS, Lefebvre T (2018) The many ways by which *O*-GlcNAcylation may orchestrate the diversity of complex glycosylations. Molecules 23(11):2858
52. Feng D, Youn DY, Zhao X, Gao Y, Quinn WJ 3rd, Xiaoli AM, Sun Y, Birnbaum MJ, Pessin JE, Yang F (2015) mTORC1 downregulates cyclin-dependent kinase 8 (CDK8) and cyclin C (CycC). PLoS One 10(6):e0126240
53. Panasyuk G, Espeillac C, Chauvin C, Pradelli LA, Horie Y, Suzuki A, Annicotte JS, Fajas L, Foretz M, Verdeguer F, Pontoglio M, Ferré P, Scoazec JY, Birnbaum MJ, Ricci JE, Pende M (2012) PPARγ contributes to PKM2 and HK2 expression in fatty liver. Nat Commun 3:672
54. Pizer ES, Chrest FJ, DiGiuseppe JA, Han WF (1998) Pharmacological inhibitors of mammalian fatty acid synthase suppress DNA replication and induce apoptosis in tumor cell lines. Cancer Res 58(20):4611–4615
55. Rae C, Fragkoulis GI, Chalmers AJ (2020) Cytotoxicity and radiosensitizing activity of the fatty acid synthase inhibitor C75 is enhanced by blocking fatty acid uptake in prostate cancer cells. Adv Radiat Oncol 5(5):994–1005
56. Chirala SS, Chang H, Matzuk M, Abu-Elheiga L, Mao J, Mahon K, Finegold M, Wakil SJ (2003) Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. Proc Natl Acad Sci USA 100(11):6358–6363
57. Dehennaut V, Hanoulle X, Bodart JF, Vilain JP, Michalski JC, Landrieu I, Lippens G, Lefebvre T (2008) Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates *Xenopus* oocytes M-phase entry. Biochem Biophys Res Commun 369(2):539–546
58. Jiang M, Qiu Z, Zhang S, Fan X, Cai X, Xu B, Li X, Zhou J, Zhang X, Chu Y, Wang W, Liang J, Horvath T, Yang X, Wu K, Nie Y, Fan D (2016) Elevated O-GlcNAcylation promotes gastric cancer cells proliferation by modulating cell cycle related proteins and ERK 1/2 signaling. Oncotarget 7(38):61390–61402
59. Zhang P, Wang C, Ma T, You S (2015) *O*-GlcNAcylation enhances the invasion of thyroid anaplastic cancer cells partially by PI3K/Akt1 pathway. Onco Targets Ther 9(8):3305–3313
60. Li T, Weng J, Zhang Y, Liang K, Fu G, Li Y, Bai X, Gao Y (2019) mTOR direct crosstalk with STAT5 promotes de novo lipid synthesis and induces hepatocellular carcinoma. Cell Death Dis 10(8):619
61. Yoon S, Lee MY, Park SW, Moon JS, Koh YK, Ahn YH, Park BW, Kim KS (2007) Up-regulation of acetyl-CoA carboxylase a and fatty acid synthase by human epidermal growth factor 2 at the translational level in breast cancer cells. J Biol Chem 282:26122–26131
62. Furuta E, Pai SK, Zhan R, Bandyopadhyay S, Watabe M, Mo YY, Hirota S, Hosobe S, Tsukada T, Miura K, Kamada S, Saito K, Iiizumi M, Liu W, Ericsson J, Watabe K (2008) Fatty acid synthase gene is up-regulated by hypoxia via activation of AKT and sterol regulatory element binding protein-1. Cancer Res 68:1003–1011

63. Wagner R, Stübiger G, Veigel D, Wuczkowski M, Lanzerstorfer P, Weghuber J, Karteris E, Nowikovsky K, Wilfinger-Lutz N, Singer CF, Colomer R, Benhamú B, López-Rodríguez ML, Valent P, Grunt TW (2017) Multi-level suppression of receptor-PI3K-mTORC1 by fatty acid synthase inhibitors is crucial for their efficacy against ovarian cancer cells. Oncotarget 8(7):11600–11613
64. Bruning U, Morales-Rodriguez F, Kalucka J, Goveia J, Taverna F, Queiroz KCS, Dubois C, Cantelmo AR, Chen R, Loroch S, Timmerman E, Caixeta V, Bloch K, Conradi LC, Treps L, Staes A, Gevaert K, Tee A, Dewerchin M, Semenkovich CF, Impens F, Schilling B, Verdin E, Swinnen JV, Meier JL, Kulkarni RA, Sickmann A, Ghesquière B, Schoonjans L, Li X, Mazzone M, Carmeliet P (2018) Impairment of angiogenesis by fatty acid synthase inhibition involves mTOR malonylation. Cell Metab 28(6):866-880.e15
65. Brown EJ, Albers MW, Shin TB, Ichikawa K, Keith CT, Lane WS, Schreiber SL (1994) A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. Nature 369(6483):756–758
66. Di Vizio D, Adam RM, Kim J, Kim R, Sotgia F, Williams T, Demichelis F, Solomon KR, Loda M, Rubin MA, Lisanti MP, Freeman MR (2008) Caveolin-1 interacts with a lipid raft-associated population of fatty acid synthase. Cell Cycle 7(14):2257–2267
67. Xue T, Zhang Y, Zhang L, Yao L, Hu X, Xu LX (2013) Proteomic analysis of two metabolic proteins with potential to translocate to plasma membrane associated with tumor metastasis development and drug targets. J Proteome Res 12(4):1754–1763
68. Mollinedo F, Gajate C (2015) Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. Adv Biol Regul 57:130–146
69. Jin Q, Yuan LX, Boulbes D, Baek JM, Wang YN, Gomez-Cabello D, Hawke DH, Yeung SC, Lee MH, Hortobagyi GN, Hung MC, Esteva FJ (2010) Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. Breast Cancer Res 12(6):R96
70. Whelan SA, Lane MD, Hart GW (2008) Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. J Biol Chem 283(31):21411–21417

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4. Résultats supplémentaires (non publiés)

4.1. Palmitoylation de l'OGT

Après avoir montré que l'inhibition de la FAS affectait le niveau d'expression d'OGT, nous avons cherché à savoir si l'OGT ne subissait pas une réaction de palmitoylation. La palmitoylation est une MPT qui résulte de la formation d'une liaison thioester covalente entre un acide gras saturé à 16 atomes de carbone sous une forme activée, le palmitoyl-CoA, et le groupement thiol d'une cystéine des protéines cibles. La palmitoylation confère aux protéines modifiées tout un ensemble de propriétés notamment celle d'interagir et de résider à la membrane plasmique.

Pour ce faire, des cellules HepG2 et IHH ont été sevrées (privées de sérum) pendant 24 h, puis maintenues dans le milieu de sevrage (cellules en phase G0), ou stimulées pendant 3 h par 10% (v/v) de SVF pour leur permettre d'entrer en phase G1 du cycle cellulaire. Des cellules HepG2 asynchrones (AS) ont également été préparées pour cette étude. La recherche d'une potentielle palmitoylation de l'OGT a été réalisée grâce à un kit commercial (SiteCounter *S*-Palmitoylated Protein Mini Kit) **(Fig. 50)**.

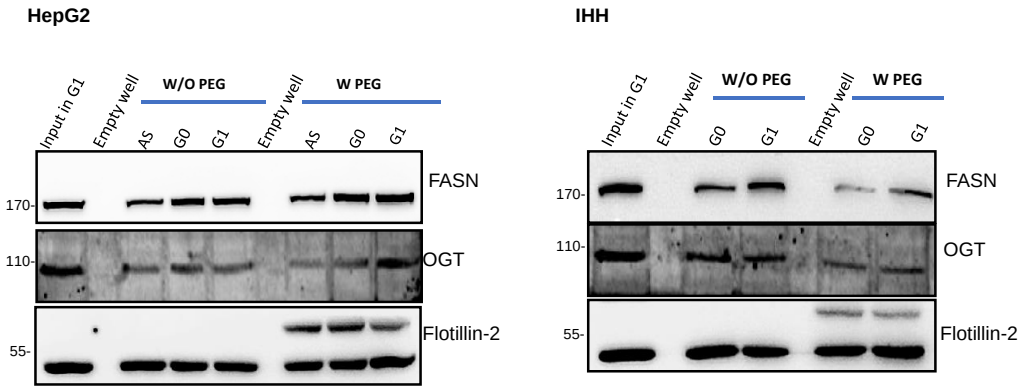


Figure 50 : **Analyse de la palmitoylation potentielle de l'OGT.** Des cellules HepG2 asynchrones et des cellules HepG2 et IHH en phase G0 et G1 du cycle cellulaire ont été utilisées pour mettre en évidence une hypothétique palmitoylation de l'OGT. La flotilline-2, protéine palmitoylée, a servi de contrôle positif.

Après une étape de blocage des groupements thiols libres et remplacement des groupements thioesters (engagés dans la liaison) par un groupement PEG (polyéthylène glycol), nous n'observons pas de palmitoylation ni de l'OGT, ni de la FAS par ailleurs.

4.2. Interaction FAS et mTOR

Après avoir montré un lien réciproque entre la FAS et la kinase mTOR, nous nous sommes demandés si les deux protéines étaient des partenaires d'interaction. Nous avons montré par PLA que FAS interagit avec mTOR et d'une manière moins évidente avec sa forme phosphorylée dans les cellules HepG2 asynchrones (**Fig. 51**).

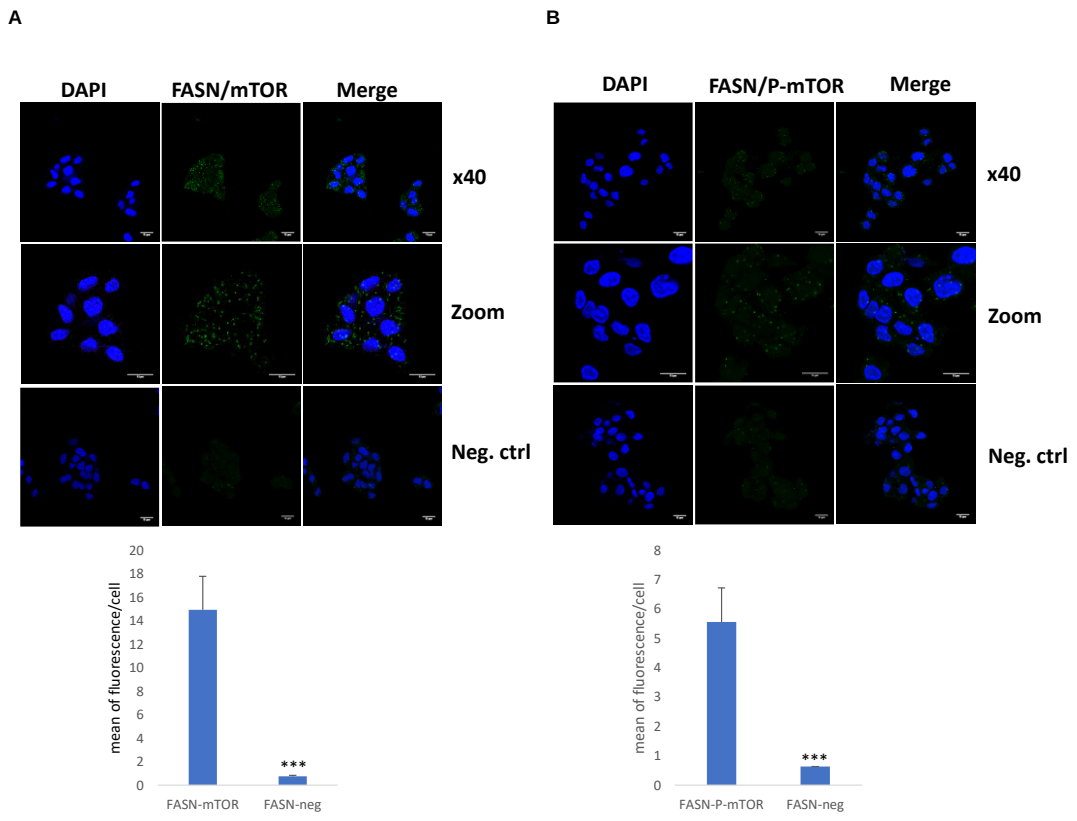


Figure 51 : **Visualisation de l'interaction FAS-mTOR dans des cellules HepG2 asynchrones**. Le contrôle négatif a été réalisé en omettant l'Ac anti-mTOR (**A**) ou l'Ac anti-P-mTOR (**B**). Le DAPI colore en bleu le noyau des cellules. Les anticorps secondaires dirigés contre la FAS, mTOR ou P-mTOR sont couplés à des oligonucléotides complémentaires. L'interaction de la FAS et de mTOR ou P-mTOR rapproche les oligonucléotides, permettant leur hybridation. L'amplification par PCR donne un signal vert (Duolink *In Situ* Detection Reagents Green). L'objectif 40X a été utilisé pour l'acquisition des images sur un microscope confocal. La quantification du signal PLA est présentée en dessous de l'image correspondante.

Partie 2 : Etude de l'expression de la FAS et de l'OGT dans les tissus cancéreux humains hépatiques

1. Contexte de l'étude

Le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Un lien étroit existe entre le développement tumoral et la dérégulation du métabolisme cellulaire. Une de ces voies métaboliques dérégulée au cours de la cancérogénèse est la synthèse *de novo* des acides gras dite lipogenèse. La FAS est l'enzyme clé de la lipogenèse. Comme décrit dans l'introduction, la FAS est surexprimée dans de nombreux types de cancers et est fortement corrélée au stade agressif du cancer et à un mauvais pronostic. Cette augmentation de lipogenèse confère aux cellules cancéreuses des avantages en termes de prolifération, de métastase, de survie et de résistance à la chimiothérapie. Dans notre première étude, nous avons montré que l'expression de la FAS dépend de l'activité catalytique de l'OGT et de la voie mTOR au cours de la prolifération des cellules cancéreuses hépatiques HepG2, et qu'à son tour, l'inhibition de la FAS réduit les niveaux d'OGT et d'activation de la voie mTOR. Dans

cette étude, nous avons analysé l'expression de la FAS, d'OGT et des niveaux de *O*-GlcNAc, et d'activation de la voie mTOR dans dix tissus humains de CHC ainsi que leurs tissus adjacents non cancéreux.

Ce travail a fait l'objet d'un article original en révision dans le journal *Oncology Letters*

Sadia Raab, Ninon Very, Ikram El Yazidi-Belkoura, and Tony Lefebvre (2021). Survey of the expression of fatty acid synthase and *O*-GlcNAc transferase in liver cancer. *Oncology letters. En révision*

Les principaux résultats de cette étude sont décrits ci-dessous.

2. Résultats

Dans cette partie de mon projet, nous avons tout d'abord analysé le profil d'expression des gènes codant la FAS et OGT dans différents tissus sains provenant d'environ 1.000 personnes en utilisant GTExPORTAL. En accord avec les données de la littérature, nous constatons que la FAS est plus fortement exprimée dans le tissu adipeux et les glandes mammaires (spécifiquement en période de lactation). Quant à l'OGT, son expression est plus homogène avec une surexpression dans le cerveau, le poumon, la rate, la thyroïde, le nerf tibial, le col de l'utérus, la trompe de Fallope, l'ovaire et le vagin (**Fig. 52A**). Etant donné que ces deux enzymes sont fortement impliquées dans la cancérogénèse, nous avons exploité la base de données GEPIA pour analyser leurs niveaux d'ARNm en RSEM (RNA-Seq by expression maximization) (log2) dans une grande variété de tumeurs par rapport aux tissus sains. Nous avons observé une plus forte expression des ARNm de la FAS et OGT dans la majorité des cancers, y compris le CHC (**Fig. 52B**).

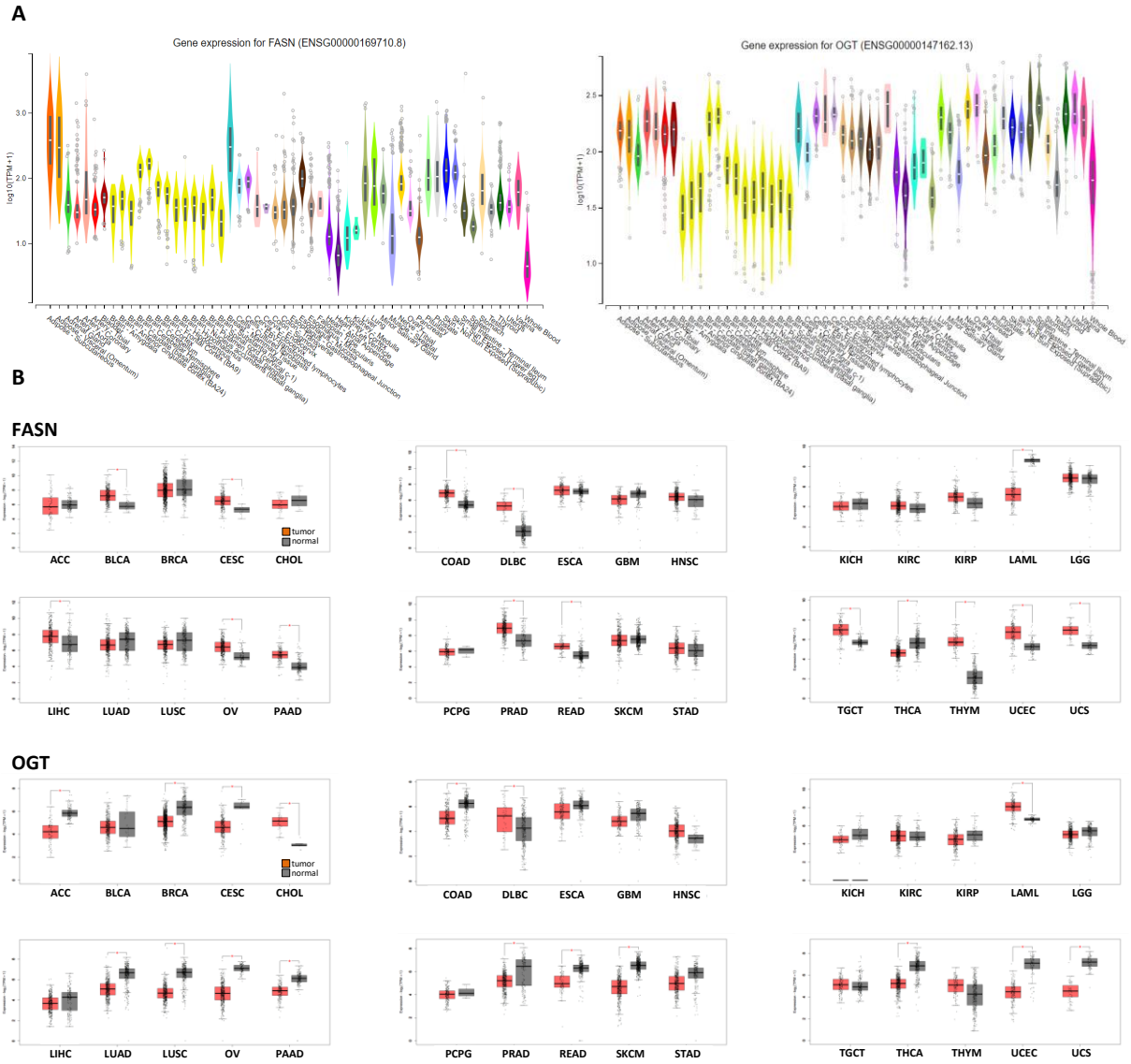


Figure 52 : **Analyse de données transcriptomiques de la FAS et de l'OGT**. Voir texte pour les détails.

Nous avons ensuite analysé les niveaux d'expression de la FAS et OGT ainsi que l'activité de cette dernière dans deux lignées cancéreuses hépatiques HepG2 et Hep3B *versus* la lignée hépatique non cancéreuse IHH. Nous avons montré par WB que la FAS est plus fortement exprimée dans les cellules cancéreuses hépatiques par rapport à la lignée non cancéreuse. En revanche et contrairement à ce que nous avons observé dans les cellules coliques, l'expression d'OGT ne varie pas dans les cellules hépatiques (**Fig. 53**).

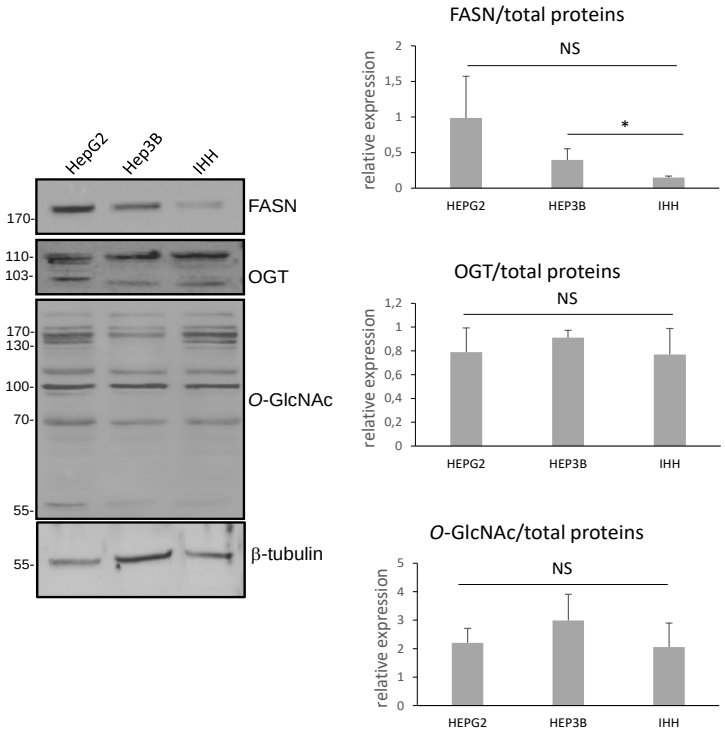


Figure 53 : **Analyse de l'expression de la FAS et de l'OGT dans les lignées cancéreuses hépatiques**. Voir texte pour les détails.

Enfin, nous avons analysé les niveaux d'expression de la FAS, OGT et de *O*-GlcNAcylation ainsi que l'activation de la voie mTOR dans des tissus hépatiques cancéreux *versus* tissus non cancéreux issus de dix patients atteints d'un CHC modéré ou bien différencié. Nous avons montré par WB à partir de lysats de foie une augmentation des niveaux d'expression de la FAS dans 6 tissus tumoraux sur 10 par rapport aux tissus adjacents non tumoraux (**Fig. 54A**). Malgré cette tendance à la hausse, il n'y a pas de différence significative entre les tissus tumoraux et les tissus adjacents en raison de la grande variabilité de l'expression de la FAS d'un patient à l'autre (**Fig. 54B**). Comme pour la FAS, en raison de la grande variabilité inter-patient, nous observons une augmentation non significative de l'activation de la voie mTOR dans les tumeurs hépatiques (**Fig 54A, B**). De manière intéressante et en accord avec nos résultats *in vitro* et *in vivo*, nous montrons une corrélation positive entre le niveau d'expression protéique de la FAS et d'activation de mTOR dans les tissus hépatiques cancéreux et tissus adjacents non cancéreux (**Fig. 54C**). De plus et de manière intéressante, nous avons observé une forte augmentation de l'expression de l'OGT et une augmentation légère mais significative des niveaux de *O*-GlcNAc dans les tissus humains de CHC par rapport aux tissus non cancéreux (**Fig. 54A, B**). En revanche et de manière surprenante, l'analyse immunohistochimique ne montre pas de difference des nivaux d'expression d'OGT et de *O*-GlcNAcylation dans les tissus tumoraux *versus* tissus adjacents sains (**Fig. 54D**). Concernant la FAS, en accord avec les résultats obtenus par WB, on observe une augmentation significative de son niveau d'expression dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus

sains (**Fig. 54D**). Enfin, l'analyse des transcrits de la FAS et de SREBP a montré une légère augmentation de leurs niveaux d'ARNm (**Fig. 54E**). Concernant l'OGT, nous constatons que son niveau d'ARNm a une tendance à la baisse dans les tissus cancéreux par rapport aux tissus non cancéreux (**Fig. 54E**).

Ces différentes observations montrent que l'OGT et la *O*-GlcNAcylation sont plus élevées dans les tissus cancéreux hépatiques humains par rapport aux tissus adjacents non cancéreux. Concernant FAS et mTOR, malgré leur tendance à la hausse dans les tissus tumoraux, cette augmentation n'est pas significative au vu de la grande variabilité de leur expression inter-patients. En revanche et de manière intéressante, nous retrouvons une corrélation positive entre la FAS et mTOR.

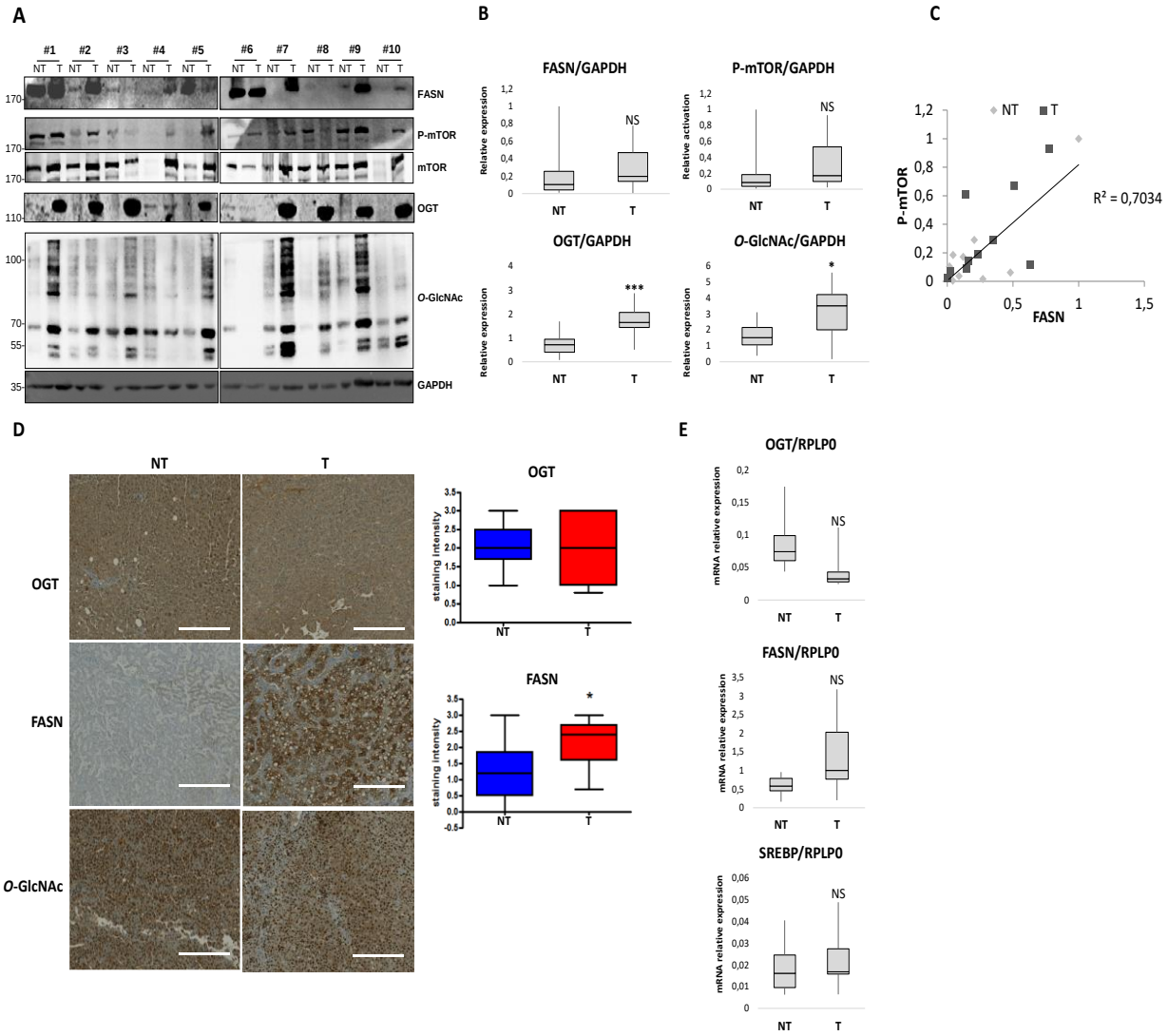


Figure 54 : **Analyse de l'expression de la FAS et de l'OGT dans des tissus cancéreux humains hépatiques**. Voir texte pour les détails.

3. Publication II

Evaluation of the expression of fatty acid synthase and *O*-GlcNAc transferase in patients with liver cancer by exploration of transcriptome databases and experimental approaches

SADIA RAAB[1], NINON VERY[1], BELINDA DUCHÊNE[2], PIERRE RYBARCZYK[3], NICOLAS JONCKHEERE[2], IKRAM EL YAZIDI-BELKOURA[1] and TONY LEFEBVRE[1]

[1]Université de Lille, CNRS, UMR 8576-UGSF-Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle; [2]Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR 9020-U1277, CANTHER-Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille; [3]Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, CHU Amiens-Picardie, F-80000 Amiens, France

DOI: 10.3892/ol_xxxxxxxx

Abstract. Tumor occurrence and development are closely related to metabolism abnormalities. One of the metabolic networks that is dysregulated during carcinogenesis is the fatty acid synthesis pathway, which is mainly controlled by fatty acid synthase (FASN). We previously demonstrated in proliferating HepG2 liver cancer cells that FASN expression depends on the catalytic activity of *O*-GlcNAc transferase (OGT) and the activation of the mechanistic/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. The aim of the present study was to go further in these investigations by analyzing datasets and tissues of patients with liver cancer. To that purpose, transcriptome databases were explored, and reverse transcription-quantitative PCR, western blotting and immunohistochemistry were used. Database analyses revealed that FASN and OGT gene expression was higher in certain cancer tissues, including liver hepatocellular carcinoma, compared with that in non-cancerous tissues. At the protein level, FASN expression was higher in the liver cancer-derived cell lines HepG2 and Hep3B compared with the immortalized human hepatocytes IHH cell line. However, neither the expression of OGT nor of its product *O*-GlcNAcylation showed any significant difference among the three hepatic cell lines. Subsequently, the expression of FASN and OGT at the protein and mRNA levels was evaluated in human liver cancer and non-tumoral tissues from the same patients with different liver lesions. The results from western blotting demonstrated a significant increase in OGT ands *O*-GlcNAcylation expression in liver cancer tissues independently of the type of lesion characterizing the non-tumoral counterpart. As previously reported for HepG2 proliferating cells, the protein level of FASN was positively correlated with the activation of mTOR and, although a rather upward trend, a high variability in its expression was monitored between patients. However, the results from immunohistochemistry showed no particular modification for OGT and *O*-GlcNAcylation expression and a significant increase in FASN expression in cancer tissues compared with that in adjacent non-tumoral tissues. Non-significant changes were observed for FASN and OGT mRNA levels between tumoral and non-tumoral samples, with a high variability between patients. Taken together, these results demonstrated that FASN expression was higher in hepatic cancer tissues in comparison with non-tumoral tissues. Furthermore, OGT expression and activity were shown to vary greatly between cell or cancer type, making any generalization difficult.

Correspondence to: Professor Tony Lefebvre, Université de Lille, CNRS, UMR 8576-UGSF-Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, F-59000 Lille, France
E-mail: tony.lefebvre@univ-lille.fr

Abbreviations: FASN, fatty acid synthase; GlcNAc, N-acetylglucosamine; HCC, hepatocellular carcinoma; IHH, immortalized human hepatocytes; mTOR, mechanistic/mammalian target of rapamycin; OGA, *O*-GlcNAcase; OGT, *O*-GlcNAc transferase; SREBP, sterol responsive element binding protein

Key words: fatty acid synthase, *O*-GlcNAc transferase, *O*-GlcNAcylation, liver cancer, mTOR pathway

Introduction

Fatty acid synthase (FASN) synthesizes fatty acids from malonyl-CoA and acetyl-CoA substrates, using nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ($NADPH,H^+/NADP^+$) as a cofactor, mainly leading to the synthesis of 16-carbon palmitate (1). FASN is also involved in other functions such as energy storage, protein adhesion to membrane, cell signaling, intracellular trafficking, cell migration and cell proliferation (2). In non-cancerous human tissues or cells, *FASN*, which is under the transcriptional control of sterol responsive element binding protein (SREBP), is downregulated due to a sufficient level of fatty acids in the diet. Accelerated fatty acid synthesis due to increased FASN level has been observed in many types of cancer, including breast, colon or prostate cancer, and is positively correlated with a poor prognosis (3).

O-GlcNAcylation is a dynamic post-translational modification consisting in the addition of a single

N-acetylglucosamine (GlcNAc) monosaccharide to serine/threonine residues of target proteins via *O*-GlcNAc transferase (OGT). Removal of the GlcNAc residue is catalyzed by the *O*-GlcNAcase (OGA) (4). As a nutrient sensor, *O*-GlcNAcylation can relay the effects of excessive nutritional intake, which is an important risk factor of cancer. It has been reported that *O*-GlcNAcylation and OGT levels are increased in various types of cancers such as colon and breast cancer (5). We previously demonstrated in two independent studies the following: i) FASN is *O*-GlcNAcylated in a nutrition-dependent manner (hepatic lipogenesis) and *O*-GlcNAcylation promotes its activity by preventing its proteasomal degradation (6); and ii) FASN expression is dependent of the catalytic activity of OGT and activation of mTOR in proliferating liver cancer cells (7).

mTOR pathway is another signaling pathway that senses nutrient availability and growth factors or hormones to enable cell growth (8). Our previous study and another study reported that *O*-GlcNAcylation and mTOR pathway are closely linked in breast and colon cancer cells, and a reciprocal control between the two has been demonstrated (9,10). Furthermore, it has been reported that the mTOR pathway is associated with tumorigenesis (11,12). However, such investigation in human liver tissues has not been performed.

In a previous study, we focused on the expression of FASN in the HepG2 cell line (7); however, further investigation is needed in patients with liver cancer. By combining the evaluation of transcriptome databases and experimental approach using western blotting, immunohistochemistry (IHC) and reverse transcription quantitative (RT-q)PCR, the present study investigated the expression of FASN and OGT and the activation of mTOR in liver-derived cell lines and tissues from patients with liver cancer. The objective of the present study was to extend the research of our previous study on cell lines (7) and to tentatively fill a gap in the literature concerning the concomitant expression level of FASN and OGT, and mTOR pathway activation, in hepatic cancer.

Materials and methods

Expression data retrieval and analysis. The *OGT* and *FASN* gene expression in tissues was graphed independently of sex and along a logarithmic y-axis [log10(TPM+1)] using Genotype-Tissue Expression (GTEx; https://gtexportal.org/home/) database. The web server GEPIA 2 (cancer-pku.cn; gepia2.cancer-pku.cn) was used to analyze the Cancer Genome Atlas (TCGA) database. GTEx and TCGA together allowed the examination of 60,498 genes and 198,619 isoforms (dataset sources). Expression analyses generated by GEPIA2 were represented as box plots with a cutoff P-value of 0.01. Log scale was chosen for data representation.

Human tumor tissues. A series of 10 liver tumor and tumor-adjacent tissues from 6 men and 4 women were obtained from the Tumor Bank of Lille-Regional Reference Center in Cancer (Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Lille, France; agreement no. #CSTMT276 obtained on December 2, 2020). Samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80˚C. Patient data are presented in Table I.

Tissue disruption. Liver tissues were lysed in 600 μl of lysis buffer [10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% (m/v) sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% (v/v) Triton-X100 and 0.5% (m/v) sodium deoxycholate (NaDOC); pH 7.5] containing protease inhibitors (protease cocktail inhibitors; Sigma-Aldrich; Merck KGaA), 50 mM sodium fluoride (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) and 1 mM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) at 4˚C for protein extraction or 500 μl of RA1 buffer (Machery-Nagel GmbH) containing chaotropic salt [30-60% (m/v) guanidinium thiocyanate] at room temperature for mRNA extraction using a MP Biomedicals Instrument FastPrep and Lysing Matrix tubes (MP Biomedicals). Three cycles of 40 sec at 4 $msec^{-1}$, 40 sec at 4 $msec^{-1}$ and 20 sec at 4 $msec^{-1}$ were needed. The soluble fractions were obtained following two centrifugations at 13,000 x g for 10 min at 4˚C for proteins and at room temperature for mRNA.

Cell culture. All cell lines were obtained from the American Type Culture Collection apart from the immortalized human hepatocytes IHH cell line that was provided by the European Genomic Institute for Diabetes (Lille). The human liver cancer HepG2 cell line was cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Lonza Group Ltd.) supplemented with 25 mM glucose. The human hepatocarcinoma Hep3B cell line was cultured in Minimal Essential Medium (MEM; Biowest SAS) supplemented with 5 mM glucose. The immortalized human hepatocyte IHH cell line was cultured in William's E Medium (Lonza Group Ltd.) supplemented with 10 mM glucose. All cells were maintained in medium supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Dominique Dutscher SAS) and 2 mM L-glutamine and incubated at 37˚C in a 5% (v/v) CO_2-enriched humidified atmosphere. To maintain optimal growth conditions, cells were divided before confluence was reached and fresh medium was added. The day before cell were used, the cells were divided to retain their ability to proliferate.

Western blotting. Cells were first washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) and then incubated for 20 min with lysis buffer (composition as aforementioned). The cell lysates were then centrifuged at 20,000 x g for 15 min at 4˚C. The supernatants were collected and protein concentration from cultured cells and human liver lysates was evaluated using the micro-BCA assay kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) according to the manufacturer's instructions. Proteins (30 μg per lane) were separated by 6 or 8% SDS-PAGE in electrophoresis buffer [25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0.1% (m/v) SDS, pH 8.8] and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond™-C EXTRA; GE Healthcare) in transfer buffer [25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% (v/v) methanol, pH 8,8]. Membranes were stained with Ponceau red [5% (v/v) acetic acid and 0,1% (w/v) Ponceau red] to confirm equal loading. Membranes were destained with Tris-Buffered Saline (TBS) containing Tween-20 [20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween-20; Sigma-Aldrich; Merck KGaA; pH 7,5; TBS-T]. Membranes were subsequently blocked in 5% (w/v) nonfat dry milk or 3% (w/v) bovine serum albumin (Sigma-Aldrich; Merck KGaA) in TBS-T for 45 min and incubated overnight at 4˚C with primary antibodies against *O*-GlcNAc [mouse monoclonal (RL2); cat. no. MA1-072; Thermo Fisher

Table I. Clinicopathological characteristics of the patients included in the present study.

Patient, ref. no.	Tumor tissue	Adjacent non-tumoral tissue	Sex	Age, years	Height, cm	Weight, kg	BMI, kg/m^2	Metabolic co-morbidities	Alcohol	Other
1 (C1718883)	Moderately differentiated hepatocellular carcinoma	Portal fibrosis	M	76	170	81	28	HBP, dyslipidemia	Yes	-
2 (C1711290)	Well differentiated hepatocellular carcinoma	Normal	F	66	155	60	25	HBP, insulin-requiring type II diabetes	No	-
3 (C1710611)	Moderately differentiated hepatocellular carcinoma	Cirrhosis	M	70	167	83	30	HBP, NIDD	Yes	Macronodular cirrhosis
4 (C1708887)	Moderately differentiated hepatocellular carcinoma	Cirrhosis	M	62	177	91	29	HBP, NIDD	Yes	-
5 (C1700573)	Moderately differentiated hepatocellular carcinoma	Portal fibrosis	M	73	168	80	28	HBP	Yes	-
6 (C1638582)	Well differentiated hepatocellular carcinoma	Cirrhosis	F	61	165	67	25	HBP	Yes	-
7 (C1633369)	Well differentiated hepatocellular carcinoma	Normal	F	46	167	67	25	-	No	-
8 (C1620576)	Well differentiated hepatocellular carcinoma	Normal	M	69	175	84	27	-	Yes	-
9 (C1616311)	Moderately differentiated hepatocellular carcinoma	Cirrhosis	M	61	177	96	31	NIDD	Yes	-
10 (C1629916)	Moderately differentiated hepatocellular carcinoma	Cirrhosis	F	81	160	59	23	IDD	Yes	-

M, man; F, female; HBP, high blood pressure; IDD, insulin-dependent diabetes; NIDD, non-insulin dependent diabetes.

Table II. Sequences of the primers used for reverse transcription quantitative PCR.

Genes	Forward sequence, 5'-3'	Reverse sequence, 5'-3'	Hybridization temperature, ˚C
OGT	TGGCTTCAGGAAGGCTATTG	CAAGTCTTTTGGATGTTCATATGG	56
FASN	TTCTTCGGAGTCCACCCCA	TCCTCGGAGTGAATCTGGGT	60
SREBP	GGAGCCATGGATTGCACTTT	TCAAATAGGCCAGGGAAGTCA	56
RPLP0	GATGACCAGCCCAAAGGAGA	GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT	60

FASN, fatty acid synthase; OGT, *O*-GlcNAc transferase; SREBP, sterol responsive element binding protein; RLP0, ribosomal protein lateral stalk subunit P0.

Scientific, Inc. 1:2,000], OGT [rabbit polyclonal (TI-14); cat. no. O6014; Sigma-Aldrich; Merck KGaA; 1:2,000], FASN (rabbit polyclonal; cat. no. ab99359, Abcam, 1:1,000), mTOR [rabbit polyclonal (7C10); cat. no. #2983; Cell Signaling Technology, Inc.; 1:1,000], phosphorylated (p)-mTOR [rabbit polyclonal (D9C2); cat. no. #5536; Cell Signaling Technology, Inc; 1:1,000] and GAPDH (mouse monoclonal; cat. no. 71548; Covalab; 1:4,000). After three washes with TBS-T, membranes were incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (polyclonal donkey anti-rabbit IgG/HRP conjugated and polyclonal sheep anti-mouse IgG/HRP conjugated; GE Healthcare; 1:10,000) for 1 h at room temperature. After three washes with TBS-T, bands were detected using enhanced chemiluminescence substrate (West Pico Plus; Thermo Fisher Scientific, Inc.). The images were acquired using a CCD camera (Fusion Solo; Vilbert Lourmat). For additional probing, membranes were stripped with the Antibody Stripping Buffer (Gene Bio-Application L.T.D.) for 15 min at room temperature, washed in TBS-T and re-probed with antibodies. Relative expression levels of proteins were normalized to endogenous control GAPDH using ImageJ software 1.52v (National Institutes of Health).

Immunohistochemistry (IHC). Tissue sections (5 μm) were stained with hematoxylin and eosin. Automatic IHC was performed with an automated immunostainer apparatus (BenchMark GX; Roche Diagnostics) using iVIEW DAB detection kit (Ventana) and primary antibodies specific for OGT (Sigma-Aldrich; Merck KGaA; cat. no. DM17; rabbit; 1:200), FASN (Abcam; cat. no. ab99359; rabbit; 1:100) and *O*-GlcNAc (Novus Biologicals RL2; mouse; 1:200). Antigen retrieval was performed using CC1 antigen retrieval buffer (Ventana Medical Systems) for 30 min at 95˚C. Specificity was checked by control staining performed in the absence of primary antibody. Images of whole tissue sections were obtained using an Axioscan Z1 microscope slide scanner (Zeiss AG). Immunostaining score was established by the expert pathologist Dr Rybarczyk. Staining intensity was analyzed using the percentages of stained hepatocytes (tumoral or not) multiplied by the intensity score as follows: 0 (no staining), 1+ (weak staining), 2+ (moderate staining) and 3+ (strong staining). We obtained a final score for each tissue ranging from 0 to 3.

mRNA extraction and RT-qPCR analysis. mRNA extraction was performed using the Nucleospin 'DNA, RNA and protein purification' kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's instructions. Quantification of RNA levels and reverse transcription were performed as previously described (7). The FASN, OGT and SREBP transcripts were analyzed by RT-qPCR using Mx4000 Multiplex Quantitative PCR system (Stratagene). Each PCR reaction contains 12.5 μl of SyberGreen, 300 nM of each primer and 2 μl of cDNA for a total volume of 25 μl. The following program was followed: Segment 1 (1 cycle), 10 min at 95˚C; segment 2 (40 cycles), 30 sec at 95˚C, 30 sec at 56˚C for OGT and SREBP, and at 60˚C for FASN, and 30 sec at 72˚C; segment 3 (1 cycle), 1 min at 95˚C, 30 sec at 56˚C for OGT and SREBP, and at 60˚C for FASN, and 30 sec at 95˚C. Data were normalized and expressed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (13). The sequences of the primers are presented in Table II.

Statistical analysis. Data were presented are the means ± standard error of the man of at least three independent experiments. Data were compared using one-way ANOVA and Student's t-test. Correlation analysis was done using Pearson correlation test (with the calculation of correlation coefficient r, coefficient of determination R^2 and P-value). Statistical analyses were performed using Excel 2019 (Microsoft Corporation) and Graph-Pad Prism 8.0 (GraphPad Software, Inc.) software.

Results

Exploration of transcriptome databases revealed that FASN and OGT gene expression are higher in cancers, including liver cancer. It is considered that *FASN* and *OGT* are expressed in all human tissues but at various levels. To highlight the importance of FASN and OGT in physiological processes, we first checked gene expression levels of both enzymes in 54 healthy tissues (from ~1,000 people) using GTExPORTAL (Fig. 1A). FASN and OGT were widely expressed over numerous tissues and organs. FASN content was higher in adipose tissue (due to visceral fat accumulation) and in mammary tissue, especially during lactation. Regarding OGT, the expression levels were more homogenous over tissues, although a stronger expression was observed in cerebellum, lung, spleen, thyroid, tibial nerve and female tissues and organs (cervix, fallopian tube, ovary, uterus and vagina; Fig. 1A). Since both enzymes are thought to be drivers of carcinogenesis, we next explored the GEPIA 2 web server to analyze their mRNA levels expressed as RNA-Seq by

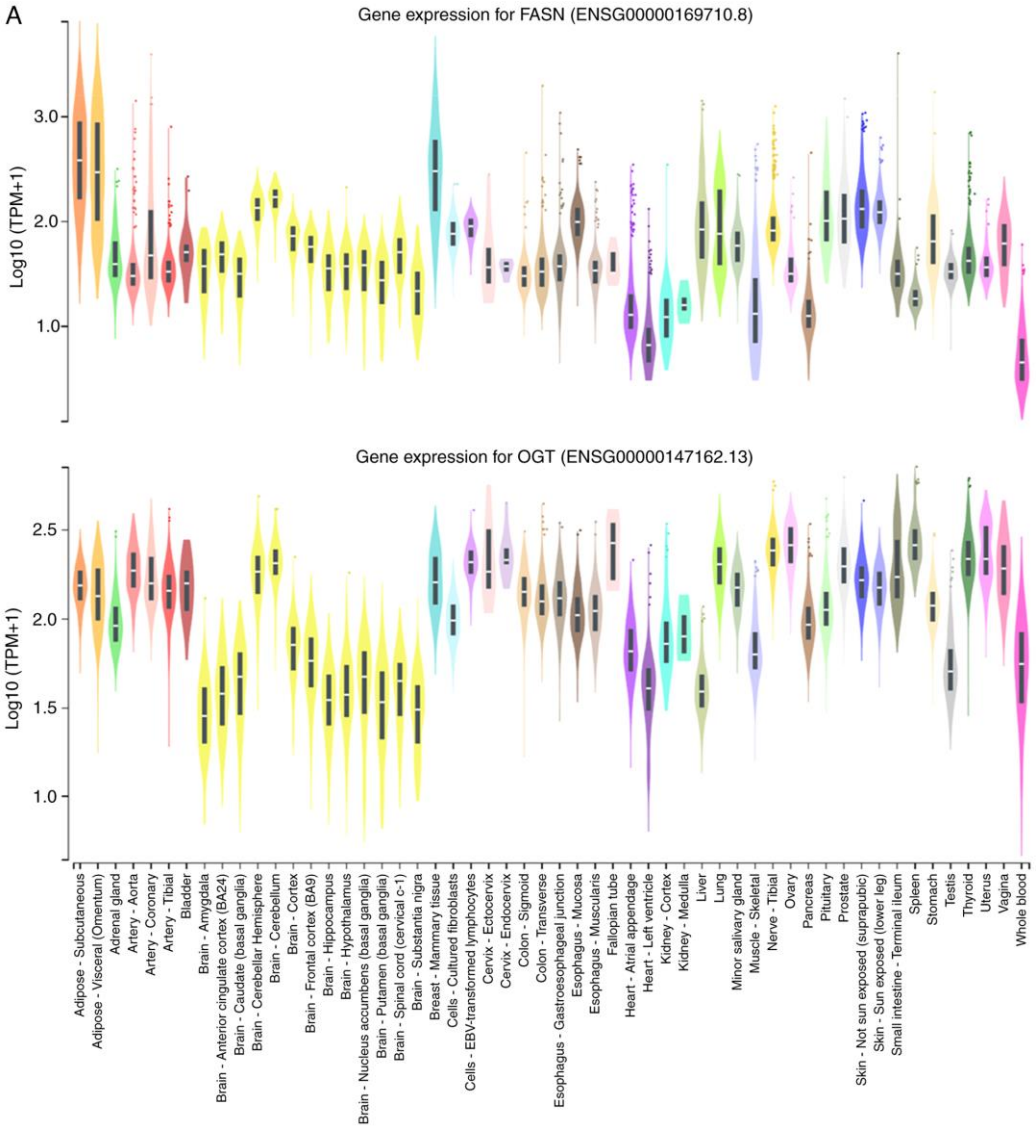


Figure 1. Continued.

Expectation-Maximization (log2) in a wide variety of tumors (TCGA normal) compared with healthy tissues (TCGA normal and GTEx datasets; Fig. 1B). The results demonstrated that mRNA encoding FASN was increased in the following tumor tissues: BLCA, CESC, COAD, DLBC, LIHC, OV, PAAD, PRAD, READ, TGCT, THYM, UCEC and UCS. Conversely, it was significantly decreased in LAML and THCA (Fig. 1B). Significant increase in OGT expression was observed in CHOL, DLBC and LAML, and decrease in ACC, BRCA, CESC, COAD, LUAD, LUSC, OV, PAAD, PRAD, READ, SKCM, THCA, THYM, UCEC and UCS. A non-significant decrease in OGT expression was also visible in LIHC, which was consistent with a previous study (7). Taken together, these findings demonstrated a significant decrease in OGT mRNA level in tumor tissues while FASN mRNA content tended to increase in tumor tissues.

FASN is highly expressed in cancer-derived cell lines compared with non-cancerous cell lines. We analyzed the expression of FASN and OGT in the three different cell lines

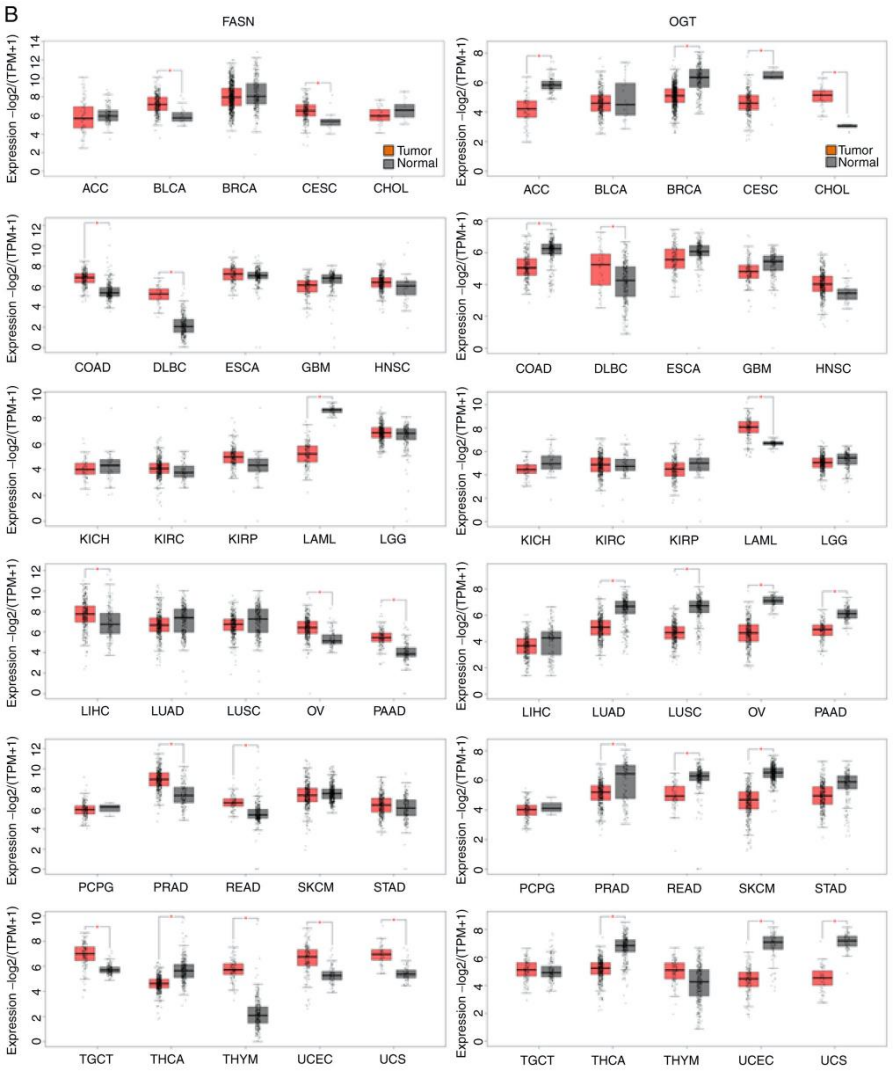


Figure 1. Evaluation of FASN and OGT gene expressions in (A) normal and (B) cancer human tissues using GTEx Portal and GEPIA2 respectively. Sample sizes (number of patients) were as follows in (A): AS, 663; AV, 541; AG, 258; AA, 432; AC, 240; AT, 663; B, 21; BA, 152; BACC, 176; BCBG, 246; BCH, 215; BCe, 241; BCo, 255; BFC, 209; BHi, 197; BHy, 202; BNABG, 246; BTBG, 205; BSCC, 159; BSN, 139; BMT, 459; CCF, 504; CEBVTL, 174; CEc, 9; CEn, 10; CS, 373; CT, 406; EGJ, 375; EMuc, 555; EMus, 515; FT, 9; HAA, 429; HLV, 432; KC, 85; KM, 4; Li, 226; Lu, 578; MSG, 162; MS, 803; NT, 619; O, 180; Pa, 328; Pi, 283; Pr, 245; SNSE, 604; SSE, 701; SITI, 187; Sp, 241; St, 359; Te, 361; Th, 653; U, 142; V, 156; WB, 755. ACC, adrenocortical carcinoma; BLCA, bladder urothelial carcinoma; BRCA, breast invasive carcinoma; CESC, cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma; CHOL, cholangiocarcinoma; COAD, colon carcinoma; DLBC, lymphoid neoplasm diffuse large-B cell lymphoma; ESCA, esophageal carcinoma; GBM, glioblastoma multiforme; HNSC, head and neck squamous cell carcinoma; KICH, kidney chromophobe; KIRC, kidney renal clear cell carcinoma; KIRP, kidney renal papillary cell carcinoma; LAML, acute myeloid leukemia; LGG, brain lower grade glioma; LIHC, liver hepatocellular carcinoma; LUAD, lung adenocarcinoma; LUSC, lung squamous cell carcinoma; OV, ovarian serous cystadenocarcinoma; PAAD, pancreatic adenocarcinoma; PCPG, pheochromocytoma and paraganglioma; PRAD, prostate adenocarcinoma; READ, rectum adenocarcioma; SKCM, skin cutaneous melanoma; STAD, stomach adenocarcinoma; TGCT, testicular germ cell tumors; THCA, thyroid carcinoma; THYM, thymoma; UCEC, uterine corpus endometrial carcinoma; UCS, uterine carcinosarcoma. *P<0.05.

derived from liver HepG2, Hep3B and IHH by western blotting (Fig. 2). The expression of FASN was more elevated in liver cancer cells compared with IHH hepatocytes. While not significant for the HepG2 cells, the P-value was equal to 0.06 when data were compared with the non-cancerous cell line.

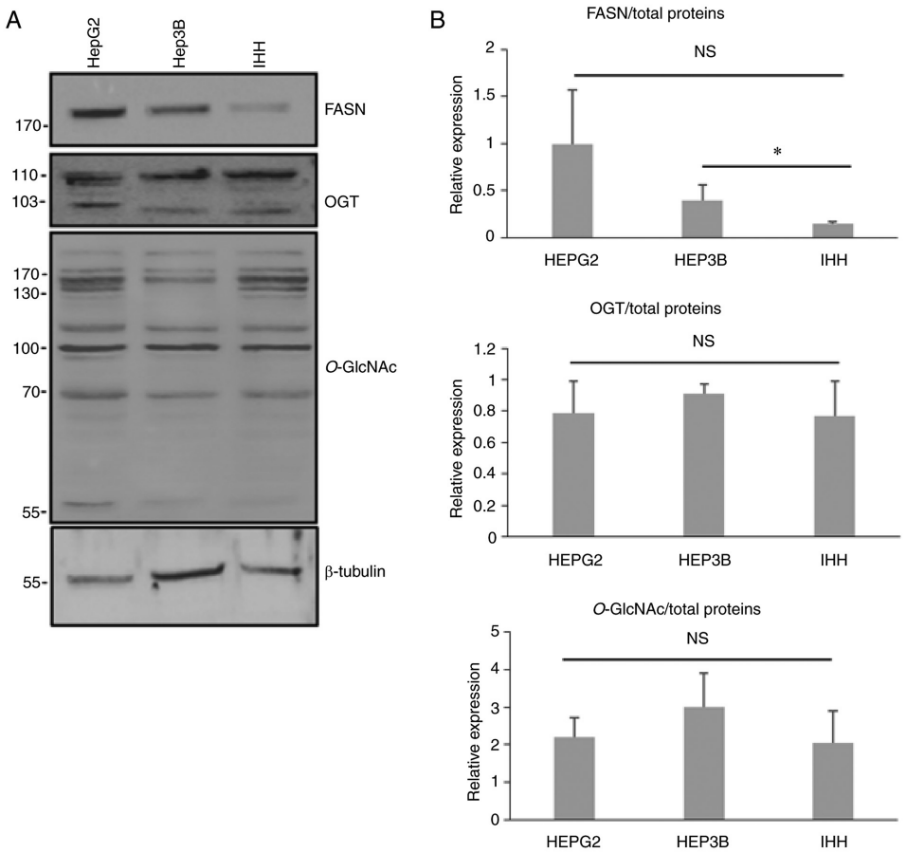


Figure 2. Analysis of FASN, OGT and *O*-GlcNAcylation contents in human hepatic cell lines. (A) Expression of FASN, OGT and *O*-GlcNAcylation was evaluated by western blot in three different hepatic cell lines, the liver cancer-derived cell lines HepG2 and Hep3B and the immortalized human hepatocytes IHH. (B) Quantification of three independent experiments from (A). *P<0.05. NS, non-significant; FASN, fatty acid synthase; OGT, *O*-GlcNAc transferase; IHH, immortalized human hepatocyte.

No differences were found for *O*-GlcNAcylation and OGT expression (Fig. 2).

FASN, OGT and O-GlcNAcylation expression is higher in human liver cancer tissues and FASN expression is correlated with activation of mTOR pathway. We analyzed the expression of FASN, OGT and *O*-GlcNAcylation in liver cancerous and non-cancerous tissues from 10 patients with moderately or well differentiated hepatocellular carcinoma (6 men and 4 women; Table I). We observed that FASN protein expression was more highly expressed in 6/10 tumor tissues when compared with non-tumor-adjacent tissues (Fig. 3A). Despite this increasing trend, there was no significant difference between tumor and non-tumoral tissues due to the high variability of FASN expression between patients (Fig. 3A and B). We previously reported that FASN expression is partly dependent upon the activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway in hepatic cell lines and in livers from two different mice models, obese mice (ob/ob) and Phosphatase and tensin homolog-null mice (7). Like for FASN expression, we observed a higher activation of mTOR in liver tumors, although it was not significant due to the great inter-patient variability (Fig. 3A and B). Furthermore, FASN protein expression was positively correlated with mTOR activation in non-tumoral samples and corresponding cancer liver tissues as presented by the correlation analysis (r=0.8387; R^2=0.7034; P-value=0.0024; Fig. 3C). However, the diversity of non-cancerous tissues damaged by different lesions (portal fibrosis, cirrhosis or normal phenotype) could explain at least partly the great inter-patient variability observed (Fig. 3A and B). An increase in OGT expression and a slight but significant increase in the *O*-GlcNAc expression were observed in human liver cancer tissues compared with non-cancerous tissues (Fig. 3A and B). The results from RT-qPCR demonstrated a slight increase in FASN and SREBP mRNA expression. Similar to the results from our previous study (7), OGT mRNA level tended to decrease in liver cancer tissues compared with non-cancerous tissues (Fig. 3D). The level of transcripts

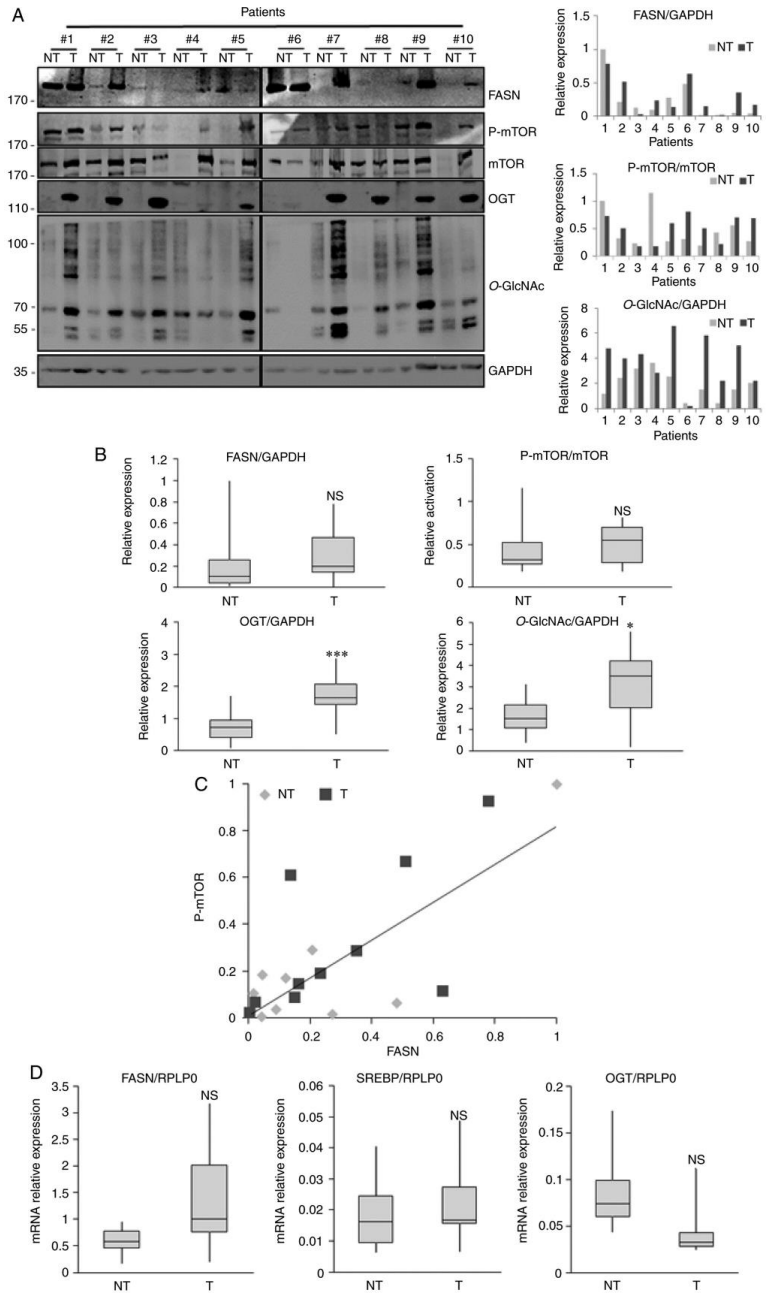


Figure 3. Analysis of FASN, OGT and *O*-GlcNAcylation expression and mTOR activation in human liver cancer tissues by western blot and RT-qPCR. (A) Liver explants from 10 patients with hepatocellular carcinoma vs. non-tumoral adjacent tissues harboring various liver lesions were analyzed for FASN, OGT, *O*-GlcNAc, p-mTOR and mTOR expression by western blotting (left panel). Quantification of three independent experiments from (A) left panel (right panel). (B) Relative expression of FASN, OGT, *O*-GlcNAcylation and activation of mTOR pathway from 10 human liver tumor tissues and tumor-adjacent normal tissues. (C) Pearson correlation analysis between FASN expression and mTOR activation. (D) mRNA expression of OGT, FASN and SREBP measured by RT-qPCR. Values were normalized to RPLP0. *P<0.05 and ***P<0.001. NT, non-tumoral; T, tumoral; NS, non-significant; RT-qPCR, reverse transcription quantitative PCR; FASN, fatty acid synthase; OGT, *O*-GlcNAc transferase; mTOR, mechanistic/mammalian target of rapamycin; p, phosphorylated; SREBP, sterol responsive element binding protein; RLP0, ribosomal protein lateral stalk subunit P0.

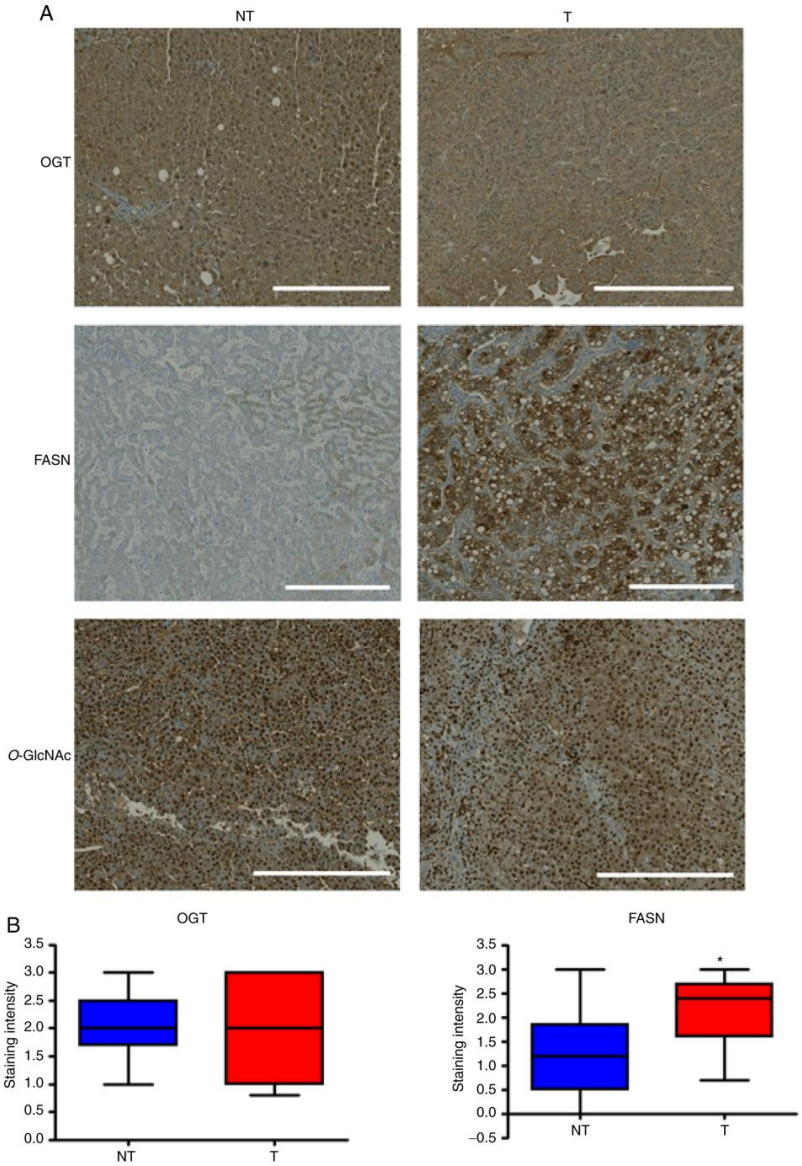


Figure 4. Analysis of FASN, OGT and *O*-GlcNAcylation expression in human liver cancer tissues by IHC. (A) Representative images of IHC staining in T and adjacent NT tissues. (B) IHC staining score was measured for OGT and FASN. Scale bar, 100 μm. *P<0.05. IHC, immunohistochemistry; NT, non-tumoral; T, tumoral; FASN, fatty acid synthase; OGT, *O*-GlcNAc transferase.

encoding FASN and OGT evolved in the same way as those found following exploration of GEPIA2 (Fig. 1B).

The expression of OGT, FASN and level of *O*-GlcNAcylation in human HCC tissues were evaluated using IHC. In the 10 patients with HCC, a strongest FASN staining was observed in tumoral tissues compared with non-tumoral tissues (2.2±0/21 in tumor tissues vs. 1.24±0.26 in normal tissues; P=0,02; Fig. 4). FASN staining was mainly localized in the cytoplasm of tumoral cells with a little centrolobular increment of the intensity. No significative difference was observed for OGT expression between tumoral and non-tumoral tissues (2.06±0.27 in tumor tissues vs. 2.03±0.17 in normal tissues; P=0,86). In both cases, the OGT strong staining was localized both in the nucleus and cytoplasm of the hepatocytes and was

homogenous. Anti-*O*-GlcNAc staining was mainly nuclear. Similar strong intensity was observed in the tumor and normal tissues of the 10 patients with HCC (Fig. 4).

Discussion

Cancer is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. A growing body of evidence suggests that abnormalities in cell metabolism are closely related to the emergence and development of tumors. One of the aberrant metabolic pathways of tumor cells is the synthesis of fatty acids. FASN is the key enzyme involved in this process that provides energy for sustained proliferation of tumor cells (14). Therefore, an increased level of FASN has been observed in numerous cancers (3). FASN is also positively correlated with the aggressive stage of cancer and the poor prognosis. This increased lipogenesis provides cancer cells with some advantages in terms of proliferation, metastasis, survival and resistance to chemotherapy (15,16).

In a previous study from our laboratory on hepatic lipogenesis, we reported that FASN is *O*-GlcNAcylated in a nutrition-dependent manner (6). The *O*-GlcNAcylation prevents the proteasomal degradation of FASN and increases therefore its expression and subsequent activity. In addition, we demonstrated in two independent studies that FASN expression is dependent on the catalytic activity of OGT and activation of mTOR in proliferating liver cancer cells, which is believed to promote hepatic carcinogenesis (7), and that mTOR and *O*-GlcNAcylation regulate each other (10) as previously described (9).

The present study demonstrated that FASN was more strongly expressed in the human HCC cell lines HepG2 and Hep3B compared with the immortalized human hepatocyte IHH cell line, which was not the case for OGT. This observation contrasts with what we previously observed in colon cell lines in which the glycosyltransferase is higher for cancer cell lines (17), and with Reginato's group for breast cancer cells (18). Thus, generalizing the elevation of OGT and *O*-GlcNAcylation in all cell types should not be done and a case-by-case study is essential. Furthermore, the use of a normal liver cell line such as THLE-3 would be helpful in a near future to push forward our investigations on this topic.

The present study also focused on the evaluation of FASN, OGT and *O*-GlcNAc expression and the activation of mTOR in 10 human HCC and non-tumoral adjacent tissues from 6 men and 4 women. By using western blotting, we demonstrated that, conversely to hepatic cell lines, the expression of OGT and *O*-GlcNAcylation was strongly elevated in liver cancer tissues compared with non-tumoral tissues, as previously demonstrated in colon tissues (19). It was previously reported by IHC that *O*-GlcNAcylation is significantly elevated in HCC tissues from patients treated with liver transplantation compared with health liver tissues (20), and that OGT and *O*-GlcNAcylation levels are higher in colon tumor tissues compared with tumor-adjacent normal tissues (19). In the liver cancer and adjacent non-tumoral tissues form the present study, no correlation between OGT mRNA and protein levels was reported; however, a decreasing trend was observed in OGT mRNA level. Regarding FASN protein expression, the results demonstrated that FASN was more highly expressed in 6 out of the 10 liver tumor tissues compared with non-tumor-adjacent tissues. Although the tendency to increase was the same, a high variability on FASN expression between patients was observed, which was probably due to the different types of liver lesion in the tissues (portal fibrosis or cirrhosis vs. normal phenotype). Thus, while non-significant, there was an increase in FASN expression between liver cancer tissues and non-tumoral tissues, these differences being highly heterogeneous from one patient to another. The mRNA encoding SREBP was also evaluated, which is the master transcription factor driving FASN expression. While transcripts level tended to increase, no significant changes was noticed, which was in accordance with our previous study (7). Overall, no sex differences regarding FASN, OGT and *O*-GlcNAc expression or activation of the mTOR pathway were observed in the present study. Furthermore, no difference was observed between the non-tumor tissues either, regardless of the lesion (portal fibrosis or cirrhosis vs. normal phenotype). However, a larger number of patients would help reinforcing these observations.

At the molecular level, we previously demonstrated that FASN depends on both catalytic activities of OGT and mTOR in liver proliferative cancer cells (7). Although the total level of mTOR can vary between patients, the present study demonstrated that FASN expression was correlated with the activation of mTOR pathway rather than with *O*-GlcNAcylation, conversely with what we formerly reported in cultured cells (7). These findings were in accordance with a previous study claiming that mTOR activation is highly variable in human liver tissues (21). In addition, we showed in a precedent paper that blocking FASN with the small-molecule inhibitor C75 can inhibit mTOR activation as well as OGT level and activity in HepG2 liver cancer cells, thus reducing cancer cell proliferation (7). These findings suggested that tumor-associated FASN, by conferring growth and survival advantages rather than functioning as an anabolic energy-storage pathway, may necessarily be associated with the history of human cancers.

By using IHC, increase in FASN expression in tumoral tissues compared with non-tumoral tissues was correlated with the non-significant increase of mRNA level in tumoral tissues. However, the lack of OGT significant difference in contrast with the western blotting results could have been attributed to a default of protein extraction during western blot or/and a resistance to antibodies penetrance in IHC. It would be of particular interest to confront these results to a staining of FASN and OGT in fibrotic or cirrhotic but non-cancerous liver samples, in order to focus only on the impact of these lesions on the expression of the two enzymes.

In summary, the present study demonstrated that increased FASN expression was associated with tumorigenesis, although the low number of tumor samples used was a limitation. The use of a larger cohort of patients will therefore be one of our priorities in future investigation. The expression of this key-metabolic enzyme was also correlated with mTOR pathway activation and more partially with OGT activity, both being known to be increased in human cancers. The results from the present study also highlighted that the analysis of identical samples by different experimental strategies could result in notable differences in interpretation, thus reinforcing the need to use different methods of analysis when studying tissues that are more complex than cell lines in culture.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Amélie Decourcelle (Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-U1277-CANTHER-Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France) for her help preparing liver lysates from patients. The authors would also like to thank Dr. Sylvie Janas, Dr. Laurence Wicquart and Professor Emmanuelle Leteurtre, scientific manager of the tumorotheque ALLIANCE-CANCER (Centre de Biologie-Pathologie, Lille) for providing the patient tissues.

Funding

This research was supported by the University of Lille, the 'Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)' and the Ligue Nationale Contre le Cancer (grant nos. 215348 and 215586 for comité du Nord). SR is a recipient of a fellowship from the 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' and from the 'Région Hauts-de-France'.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Authors' contributions

NJ, IEYB and TL conceptualized the study. SR, NV and BD designed the methodology. SR, NV and BD performed the experiments. SR, PR, NJ and TL analyzed the data. SR and TL wrote the manuscript. All authors reviewed, read and approved the final manuscript. TL supervised the study. NJ, IEYB and TL confirm the authenticity of all the raw data.

Ethics approval and consent to participate

This study (approval no. CSTMT276) was approved by the relevant ethics committee (ALLIANCE-CANCER Tumorotheque-DC 2008-620) on December 2, 2020. Patients provided writing informed consent for the use of their samples in scientific research.

Patient consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Smith S, Witkowski A and Joshi AK: Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. Prog Lipid Res 42: 289-317, 2003.
2. Swinnen JV, Van Veldhoven PP, Timmermans L, De Schrijver E, Brusselmans K, Vanderhoydonc F, Van de Sande T, Heemers H, Heyns W and Verhoeven G: Fatty acid synthase drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. Biochem Biophys Res Commun 302: 898-903, 2003.
3. Menendez JA and Lupu R: Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. Nat Rev Cancer 7: 763-777, 2007.
4. Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J and Love D: Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. Arch Biochem Biophys 409: 287-297, 2003.
5. Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T and Issad T: O-GlcNAcylation: A New cancer hallmark? Front Endocrinol (Lausanne) 4: 99, 2013.
6. Baldini SF, Wavelet C, Hainault I, Guinez C and Lefebvre T: The nutrient-dependent O-GlcNAc modification controls the expression of liver fatty acid synthase. J Mol Biol 428: 3295-3304, 2016.
7. Raab S, Gadault A, Very N, Decourcelle A, Baldini S, Schulz C, Mortuaire M, Lemaire Q, Hardivillé S, Dehennaut V, *et al*: Dual regulation of fatty acid synthase (FASN) expression by O-GlcNAc transferase (OGT) and mTOR pathway in proliferating liver cancer cells. Cell Mol Life Sci 78: 5397-5413, 2021.
8. Bar-Peled L and Sabatini DM: Regulation of mTORC1 by amino acids. Trends Cell Biol 24: 400-406, 2014.
9. Sodi VL, Khaku S, Krutilina R, Schwab LP, Vocadlo DJ, Seagroves TN and Reginato M: mTOR/MYC axis regulates O-GlcNAc transferase expression and O-GlcNAcylation in breast cancer. Mol Cancer Res 13: 923-933, 2015.
10. Very N, Steenackers A, Dubuquoy C, Vermuse J, Dubuquoy L, Lefebvre T and El Yazidi-Belkoura I: Cross regulation between mTOR signaling and O-GlcNAcylation. J Bioenerg Biomembr 50: 213-222, 2018.
11. Magaway C, Kim E and Jacinto E: Targeting mTOR and metabolism in cancer. Lessons and innovations. Cells 8: 1584, 2019.
12. Hua H, Kong Q, Zhang H, Wang J, Luo T and Jiang Y: Targeting mTOR for cancer therapy. J Hematol Oncol 12: 71, 2019.
13. Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods 25: 402-408, 2001.
14. Baldini SF and Lefebvre T: O-GlcNAcylation and the metabolic shift in high-proliferating cells: All the evidence suggests that sugars dictate the flux of lipid biogenesis in tumor processes. Front Oncol 6: 6, 2016.
15. Huang C and Freter C: Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. Int J Mol Sci 16: 924-949, 2015.
16. Menendez J and Lupu R: Fatty acid synthase (FASN) as a therapeutic target in breast cancer. Expert Opin Ther Targets 21: 1001-1016, 2017.
17. Steenackers A, Olivier-Van Stichelen S, Baldini SF, Dehennaut V, Toillon RA, Le Bourhis X, El Yazidi-Belkoura I and Lefebvre T: Silencing the nucleocytoplasmic O-GlcNAc transferase reduces proliferation, adhesion, and migration of cancer and fetal human colon cell lines. Front Endocrinol (Lausanne) 7: 46, 2016.
18. Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, Vosseller K and Reginato MJ: Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. Oncogene 29: 2831-2842, 2010.
19. Olivier-Van Stichelen S, Dehennaut V, Buzy A, Zachayus JL, Guinez C, Mir AM, El Yazidi-Belkoura I, Copin MC, Boureme D, Loyaux D, *et al*: O-GlcNAcylation stabilizes β-catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. FASEB 28: 3325-3338, 2014.
20. 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. Med Oncol 29: 985-993, 2012.
21. Meng Z, Li T, Ma X, Wang X, Van Ness C, Gan Y, Zhou H, Tang J, Lou G, Wang Y, *et al*: Berbamine inhibits the growth of liver cancer cells and cancer-initiating cells by targeting Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II. Mol Cancer Ther 12: 2067-2077, 2013.

Partie 3 : Localisation des sites de *O*-GlcNAcylation de la FAS (résultats préliminaires)

Pour aller plus loin sur l'impact de la *O*-GlcNAcylation sur l'activité de la FAS, nous avons réalisé une première expérience de « site-mapping » visant à localiser les sites de *O*-GlcNAcylation de l'enzyme. Pour se faire, la FAS a été purifiée à partir de cellules HepG2 et analysée par spectrométrie de masse de type LC-MS/MS (liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry) (Q-Exactive plus) en collaboration avec le Dr. Fabrice Bray de la plateforme « miniaturization for synthesis, analysis and proteomics » de l'Université de Lille. L'analyse en mode HCD (higher-energy collision dissociation) des peptides trypsiques de la FAS révèle trois peptides porteurs potentiellement d'un ou deux sites de *O*-GlcNAcylation chacun (**Fig. 55, résultats préliminaires**).

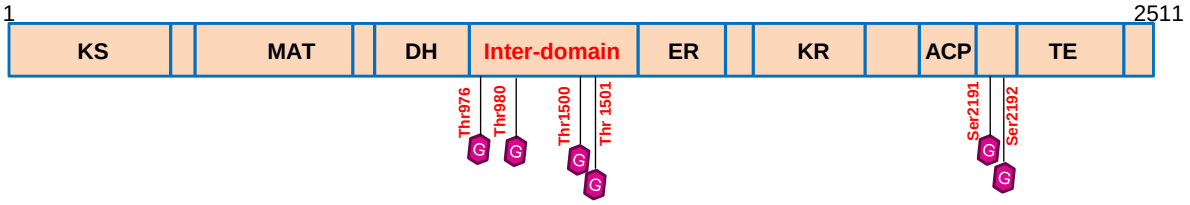


Figure 55 : **Représentation schématique des différentes activités de la FAS.** Les sites potentiellement *O*-GlcNAcylés obtenus par LC-MS/MS sont identifiés par un trait rouge.

Suite à cette analyse, nous générerons des constructions de mutants des différents sites *O*-GlcNAcylés de la FAS. À partir de ces mutants, nous réaliserons des transfections dans les cellules HepG2 puis nous analyserons l'effet de ces mutations sur l'expression, l'activité et la localisation de la FAS, ainsi que sur la prolifération cellulaire.

En fonction des premiers résultats, il serait intéressant de réaliser des expériences de xénogreffes chez la souris de cellules HepG2 transfectées stablement avec la FAS WT ou FAS mutée sur les sites de *O*-GlcNAcylation afin d'évaluer l'effet de la *O*-GlcNAcylation de la FAS sur la progression tumorale.

Enfin et pour compléter cette partie, nous chercherons à déterminer les domaines respectifs de la FAS et OGT nécessaires à leur interaction. Pour cela, une série de délétants de l'OGT couplés à la GST est d'ores et déjà disponible au laboratoire, la construction des délétants de la FAS reste à réaliser.

Discussion

Les pays industrialisés sont confrontés à un double problème de santé publique : une forte incidence des risques de pathologies métaboliques et un risque de cancer relativement élevé. Or, ces désordres métaboliques sont susceptibles d'augmenter la disponibilité des précurseurs du nucléotide-sucre UDP-GlcNAc (produit final de la voie des hexosamines) (**Fig. 9, introduction**), substrat de l'OGT, et de déréguler l'homéostasie de la *O*-GlcNAcylation. Cette MPT est également plus élevée dans les cancers, notamment le cancer du sein, de la prostate, du côlon-rectum et du foie. Récemment les travaux de mon équipe sur la lipogenèse hépatique ont montré que la FAS est *O*-GlcNAcylée de manière nutrition dépendante (Baldini et al., 2016). La *O*-GlcNAcylation de la FAS augmente son niveau d'expression en réduisant sa dégradation protéasomale (Baldini et al., 2016). La FAS est fondamentale pour tous les êtres vivants. Comme décrit dans l'introduction, son KO empêche l'implantation des embryons (Chirala et al., 2003). En utilisant l'acétyl-CoA, le malonyl-coA et le NADPH,H^+, la FAS synthétise l'acide gras ensuite activé en acyl-CoA qui est largement utilisé dans les cellules, plus particulièrement pour la formation des membranes, processus très actif dans les cellules cancéreuses. Durant ma thèse, nous avons montré que la stimulation mitogène des cellules préalablement privées de sérum induit l'expression de la FAS de manière dépendante de l'OGT et de la voie PI3K/AKT/mTOR.

L'induction de l'expression de l'OGT dépend également des voies mitogènes comme cela avait déjà été décrit (Olivier-Van Stichelen et al., 2012; Perez-Cervera et al., 2013) ; en retour, l'activité de l'OGT est nécessaire pour l'activation des voies MAPK et PI3K (Perez-Cervera et al., 2013; Zhang et al., 2015; Jiang et al., 2016). Mon équipe a préalablement montré le rôle de l'OGT sur l'activation de la voie mTOR dans les cellules cancéreuses coliques (Very et al., 2018). Ici nous avons montré que l'inhibition de l'OGT dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2 asynchrones altère l'expression de la FAS et réduit l'activation de la voie mTOR (**Fig. 44D**). Nous nous sommes ensuite demandés si l'activité de l'OGT était nécessaire à l'induction de la FAS lors de la stimulation sérique au cours du cycle cellulaire. Nous montrons que le siOGT retarde l'expression de la FAS et diminue l'activation de la voie mTOR dans les cellules HepG2 synchronisées (**Fig. 47D, E**). Nous avons également montré que, comme pour son expression, la FAS interagit avec l'OGT au cours du cycle cellulaire, et ce, de manière cyclique (**Fig. 47A, B et C**). Des auteurs ont montré que la voie PI3K/AKT/mTOR régule la FAS par induction de son facteur de transcription SREBP dans des conditions d'hypoxie (Furuta et al., 2008). Dans nos conditions, nous n'avons pas montré que l'expression de SREBP est sous la dépendance de mTOR (**Fig. 48**). Par contre, et en accord avec une étude ayant porté sur des lignées de cancer du sein (Yoon et al., 2007), nous ne montrons pas concrètement que mTOR régule le niveau transcriptionnel de la FAS dans les cellules HepG2. Dans la même étude (Yoon et al., 2007), les auteurs montrent que mTOR régule le niveau protéique de la FAS . Nos résultats corroborent donc cette observation puisque nous montrons

que l'induction de la FAS au cours de la phase G1 du cycle cellulaire est dépendante de la voie mTOR (**Fig. 48**).

Pour mieux comprendre la régulation croisée de la FAS et de la *O*-GlcNAcylation par la voie mTOR dans un contexte « plus physiologique », nous avons utilisé un modèle murin pour lequel la voie mTOR est plus active, à savoir les souris obèses *ob/ob*, modèle de désordre métabolique (Feng et al., 2015) (**Fig. 45**) et des souris KO pour PTEN hépatique, modèle d'émergence de tumeur hépatique pour lequel mTOR est activé de manière quasi constitutive (Horie et al., 2004) (**Fig. 46**). Les résultats obtenus *in vivo* corroborent ce que nous avons observé *in vitro*. La FAS hépatique est plus exprimée chez les souris obèses et chez les souris KO pour PTEN *versus* souris sauvages. De plus, et de manière intéressante, la voie mTOR et, dans une moindre mesure, les niveaux de *O*-GlcNAcylation présentent les mêmes variations que celles observées pour la FAS dans les deux modèles (**Fig. 45 et 46**). L'augmentation de *O*-GlcNAcylation n'était pas liée à une augmentation des niveaux protéiques de l'OGT, indiquant que la *O*-GlcNAcylation est également sous le contrôle de l'activité catalytique de l'OGT et probablement de son enzyme antagoniste, l'OGA.

Nous avons renforcé notre étude par des analyses de biopsies de tumeurs hépatiques humaines (publication II). Dans cette étude, nous avons montré une augmentation des niveaux protéiques de l'OGT et de *O*-GlcNAcylation dans les tissus cancéreux hépatiques par rapport aux tissus adjacents non tumoraux (**Fig. 46A et 46B**). Des observations similaires ont été rapportées dans la littérature : (i) il a été montré par des analyses immunohistochimiques que les niveaux de *O*-GlcNAc sont significativement plus élevés dans les tissus de CHC de patients traités par transplantation hépatique en comparaison aux tissus hépatiques sains (Zhu et al., 2012), et (ii) que les niveaux d'OGT et de *O*-GlcNAcylation sont plus élevés dans les tissus tumoraux coliques par rapport aux tissus non tumoraux (Olivier-Van Stichelen et al., 2014). En accord avec nos précédentes observations sur les foies de souris obèses, nous ne montrons pas de corrélation entre les niveaux protéiques et de transcrits de l'OGT dans les tissus hépatiques, les niveaux d'ARNm de l'OGT montrant même une tendance à la baisse dans les tissus tumoraux. Concernant la FAS, nous observons une augmentation de son niveau protéique dans 6 tissus tumoraux sur 10 par rapport aux tissus adjacents non tumoraux. Malgré cette hausse, il n y'a pas de différence significative entre les tissus tumoraux et les tissus adjacents en raison de la grande variabilité de l'expression de la FAS d'un patient à l'autre (**Fig 54A et B)**. Cette variabilité pourrait s'expliquer par le fait que certains tissus adjacents ne présentent aucune affection, ou au contraire une cirrhose ou une fibrose, deux pathologies du foie pour lesquelles la FAS est connue pour jouer un rôle important. De plus, il a été démontré que l'acétylation de la FAS est diminuée dans les CHC humains, et ce en corrélation avec l'augmentation de son niveau protéique (Lin et al., 2016). Dans notre cas, il serait intéressant d'étudier la relation potentielle entre l'acétylation et la *O*-GlcNAcylation

de la FAS, en particulier pour 4 des échantillons, sur 10 au total, pour lesquels on constate une diminution de l'expression de la FAS. Enfin, en accord avec nos résultats précédents (publication I), nous avons montré que mTOR est corrélée positivement à l'expression de la FAS (**Fig 54C)**, bien que nous ayons observé que son niveau total présente des variations inter-patients, parfois même la protéine était indétectable. Ces observations sont en accord avec les résultats rapportés dans la littérature selon lesquels l'activation de mTOR est très variable dans les tissus hépatiques humains (Meng et al., 2013).

Nous suggérons donc l'existence d'une régulation réciproque entre FAS, OGT et mTOR. A cela, nous avons montré que l'inhibition de la FAS par le C75 induit une diminution d'expression d'OGT et des niveaux de *O*-GlcNAcylation. De même, et en accord avec la littérature, nous avons montré une diminution d'activation de la voie mTOR en présence de C75 (**Fig. 49**). Dans les cellules cancéreuses de l'ovaire, l'inhibition de la FAS inhibe l'activation de la voie mTOR à plusieurs niveaux (Wagner et al., 2017). De plus, Bruning et collaborateurs ont montré que l'inhibition de la FAS se traduit par l'accumulation de son substrat, le malonyl-CoA, qui modifie et inactivant mTOR, altérant ainsi l'angiogenèse (Bruning et al., 2018).

Cette régulation croisée entre la FAS, OGT et mTOR présente un intérêt particulier puisque chacune de ces protéines est dépendante du statut nutritionnel. D'une part, la kinase mTOR est impliquée dans de nombreux processus cellulaires clés qui intègrent divers signaux tels que les facteurs de croissance, les niveaux d'énergie, d'oxygène et de nutriments pour activer la synthèse protéique, lipidique, nucléotidique, la glycolyse et la prolifération cellulaire (***cf 2 et 3 pages 108-110***). D'autre part, l'homéostasie des niveaux de *O*-GlcNAc est directement liée à la disponibilité en nutriments *via* HBP (***cf 2 page 53***). Par conséquent, nos données suggèrent que l'activation de la voie mTOR et de l'OGT induisent l'expression de la FAS de manière dépendante des nutriments et des facteurs de croissance pour permettre la progression du cycle cellulaire, plus particulièrement la phase G1 caractérisée par une synthèse protéique accrue. Nos résultats suggèrent que cette régulation se fait directement *via* l'interaction FAS-OGT (**Fig. 44B, 44C et 47C**) et FAS-mTOR/FASN-P-mTOR (**Fig. 51, résultats supplémentaires**). De plus, nous avons montré qu'une petite fraction de la FAS et d'OGT est localisée au niveau de la membrane plasmique (**Supp. Fig. 44C**) comme préalablement rapporté dans diverses lignées cellulaires (Yang et al., 2008; Di Vizio et al., 2008; Perez-Cervera et al., 2013). En effet, au niveau membranaire, FAS et OGT sont plus spécifiquement retrouvées dans les microdomaines lipidiques (lipides rafts) qui potentialisent l'activation des voies de signalisation associées et, par conséquent, l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire dans des conditions physiologiques et le cancer (Mollinedo and Gajate, 2015). De plus, la palmitoylation confère aux protéines modifiées tout un ensemble de propriétés notamment celle d'interagir avec la membrane plasmique. L'étude de la

palmitoylation potentielle de l'OGT ne nous a pas permis de démontrer qu'elle le soit (**Fig. 50, résultats supplémentaires**). Enfin, il a été rapporté que la FAS est *O*-GlcNAcylée sur les résidus Thr315, Thr980 et Ser1534 (Wulff-Fuentes et al., 2021). Dans notre étude, nous avons identifié six sites potentiels de *O*-GlcNAcylation de la FAS dont le résidu Thr980 par spectrométrie de masse en mode HCD (**Fig. 55, résultats préliminaires**).

Conclusion et perspectives

Mes travaux de thèse ont mis au jour un cross-talk entre nutrition et prolifération cellulaire d'un point de vue glucido-lipidique par l'étude de la régulation de l'expression de l'enzyme lipogénique FAS par OGT et mTOR. Le rôle de la FAS et OGT dans la prolifération cellulaire est reconnu, néanmoins nos travaux apportent un nouvel éclairage sur la double régulation et l'action de ces enzymes dans l'entrée et la progression du cycle cellulaire de différentes lignées cellulaires, modèles murins et tissus hépatiques humains.

Nous avons montré par fluorescence directe et immunofluorescence que la FAS et OGT co-localisent au niveau cytoplasmique, suggérant que les deux enzymes sont des partenaires d'interaction : c'est ce que nous avons démontré par co-immunoprécipitation et par la technique de PLA. Comme pour leur expression, nous avons montré que cette interaction est dépendante des concentrations en glucose. Nous avons également montré par PLA que FAS et OGT interagissent de manière différentielle au cours du cycle cellulaire en calquant l'expression cyclique de la FAS. Nous avons montré que l'induction de la FAS et son expression correcte au cours du cycle cellulaire est dépendante à la fois de l'activité catalytique de l'OGT et de mTOR dans les cellules cancéreuses hépatiques HepG2.

L'étude de la palmitoylation potentielle de l'OGT ne nous a pas permis de démontrer qu'elle le soit. En revanche et de manière intéressante, nous avons montré que l'inhibition de l'activité la FAS induit une diminution de l'expression de l'OGT, de son activité et de l'activation de la voie mTOR. En plus d'interagir avec l'OGT, nous avons montré par la technique de PLA que la FAS interagit également avec mTOR/P-mTOR. Il serait intéressant d'aller plus loin dans cette analyse pour décrypter le lien fonctionnel entre FAS et mTOR. Une phosphorylation potentielle de la FAS par mTOR pourrait potentialiser son activité au niveau de la membrane plasmique où elle favorise l'activation des voies de signalisation et la prolifération cellulaire.

Nous avons renforcé nos expériences sur les lignées cellulaires par des analyses *in vivo* sur deux modèles murins : un modèle avec désordre métabolique (souris obèses *ob/ob*, et un modèle d'émergence de tumeur hépatique, souris KO pour PTEN). Dans les deux modèles, nos résultats corroborent ce que nous avons obtenu *in vitro*, à savoir la FAS hépatique est plus exprimée chez les

souris obèses, et chez des souris PTEN KO *versus* sauvages. De plus, et de manière intéressante, la voie mTOR et les niveaux de *O*-GlcNAcylation suivent l'expression de la FAS dans les deux modèles.

Nous avons complété notre étude par l'analyse de l'expression de la FAS, OGT, des niveaux de *O*-GlcNAc et d'activation de la voie mTOR dans les tissus humains hépatiques. Nous avons montré une augmentation significative des niveaux d'OGT et de *O*-GlcNAc dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus adjacents non cancéreux. Nous retrouvons la corrélation positive entre FAS et mTOR qui ont tendance à augmenter dans les tissus de CHC par rapport aux tissus non cancéreux. Cette augmentation de la FAS et mTOR n'est pas significative du fait de la grande variabilité de leur expression d'un patient à l'autre.

Nous avons identifié des sites potentiels de *O*-GlcNAcylation de la FAS par spectrométrie de masse en mode HCD. Au regard de cette analyse, il sera intéressant de générer des constructions de mutants de ces sites potentiels et des sites déjà rapportés dans la littérature (Wulff-Fuentes et al., 2021). Nous réaliserons des transfections de ces mutants dans les cellules HepG2 pour valider ou invalider les sites de *O*-GlcNAcylation. En s'appuyant sur les sites validés, nous analyserons l'effet de la *O*-GlcNAcylation sur l'expression, l'activité et la localisation de la FAS, ainsi que sur la prolifération cellulaire. Nous ferons également une étude protéomique à partir de ces mutants pour identifier l'interactome différentiel de formes de FAS *O*-GlcNAcylées ou hypo-*O*-GlcNAcylées. L'objectif *in fine* de ce projet serait de faire des xénogreffes de cellules HepG2 transfectées stablement avec FAS WT ou FAS mutée afin de mesurer l'effet de la *O*-GlcNAcylation de l'enzyme sur la progression tumorale.

Identifier les domaines d'interaction respectifs de chaque enzyme est également une approche intéressante à réaliser dans ce projet. Pour cela, une série de délétants de l'OGT couplés à la GST est disponible au laboratoire, nous génèrerons une série de délétants de la FAS. A terme, la caractérisation des domaines d'interaction FAS/OGT permettrait de développer une stratégie thérapeutique par identification d'inhibiteurs spécifiques d'interaction de ces partenaires à visée anti-cancéreuse.

Annexes

Revue : **Sadia Raab** et Tony Lefebvre (2021). L'acide gras synthase, une enzyme multi-FAS-ettes. *Soumis à Médecine/Sciences.*

L'acide gras synthase, une enzyme multi-FASette

Fatty acid synthase, a multi-FASet enzyme

Sadia RAAB et Tony LEFEBVRE

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

Courriels : sadia.raab@univ-lille.fr; tony.lefebvre@univ-lille.fr

Résumé

L'acide gras synthase (FASN pour *fatty acid synthase*) est l'enzyme de synthèse *de novo* des acides gras. Puisque les acides gras sont principalement fournis par l'alimentation, FASN est normalement exprimée à des niveaux relativement bas. En revanche, elle est plus fortement exprimée dans les cancers. Au-delà de son rôle dans le stockage de l'énergie, FASN est impliquée dans de nombreux processus biologiques notamment la synthèse des composants membranaires nécessaires à la division cellulaire, la modification des protéines, la signalisation et la prolifération cellulaire. Dans cette revue, nous discutons du rôle physiologique et pathologique de FASN ainsi que son implication dans le cancer.

Abstract

FASN (*fatty acid synthase*) is the enzyme responsible for *de novo* synthesis of fatty acids. Since fatty acids are mainly supplied from diet, FASN is normally expressed at low levels. In the other hand, FASN is strongly expressed in cancer. Beyond its role in energy storage, FASN is involved in numerous biological processes including the synthesis of membrane components necessary for cell division, proteins modification, cell signaling and cell proliferation. In this review, we discuss the physiological and pathological roles of FASN as well as its implication in cancer.

Les lipides : une famille de composés organiques très hétérogène

Les lipides représentent 15% en moyenne de la masse corporelle d'un individu et, bien que souffrant auprès du grand public d'une mauvaise presse, ils représentent une famille très hétérogène de composés biologiques essentiels à bien des égards. Au-delà de leur haute capacité nutritionnelle puisque les stocks adipeux et musculaire de graisse ont une valeur calorique d'environ 70.000 kCal en comparaison aux quelques 2.000 kCal du glycogène, les lipides sont des composants membranaires majeurs conférant à la cellule sa singularité. Ils constituent également une variété de précurseurs métaboliques générant les vitamines A, D, E et K, les hormones stéroïdiennes (minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes et hormones sexuelles), les acides et sels biliaires, les éicosanoïdes (leucotriènes, prostaglandines…), certains messagers secondaires (diacyl-glycérol ou DAG, phosphatidyl-inositol-3,4,5-triphosphate ou PIP3), forment un groupe de MPTs (modifications post-traductionnelles) (acylation, prénylation, cholestéroylation), et sont le support de bien des odeurs (terpènes) telles celles rencontrées dans nos jardins et forêts (thymol, pimène, linalol…).

Les acides gras sont probablement les éléments les plus simples sur le plan structural appartenant aux lipides. Ces molécules sont composées d'une chaine hydrogénocarbonée plus ou moins longue qui permet de classer les acides gras et d'une fonction acide carboxylique. Les acides gras sont fabriqués par l'acide gras synthase également connue sous l'abréviation FAS ou FASN pour *Fatty Acid SyNthase* en anglais (EC. 2.3.1.85) à partir des substrats acétyl CoA et malonyl-CoA et le cosubstrat NADPH,H^+ (***Figure 1***) selon l'équation générale :

Acétyl-CoA + n Malonyl-CoA + 2n NADPH,H^+ $\rightarrow$ H_3C-$(CH_2$-$CH_2)_n$-COOH + n+1 HSCoA + n CO_2 + n-1 H_2O

Les acides gras ainsi formés comportent le plus souvent, mais pas exclusivement, un nombre pair de carbones, l'acide palmitique (C16, soit n=7) étant le produit de longueur maximale fabriqué par FASN. Les acides gras plus longs sont générés par les élongases (ELOVL, *eLongation of very long* chain fatty acids) résidentes du *réticulum* endoplasmique (***Figure 1***).

L'acide gras synthase, une enzyme de poids dans le monde du vivant

FASN est une protéine cytoplasmique soluble ou associée en partie à la membrane plasmique, plus précisément au niveau des lipides rafts (microdomaines lipidiques) *via* son interaction avec la cavéoline [1]. Bien qu'il soit généralement admis que FASN soit plus exprimée dans le foie, le tissu adipeux et la glande mammaire en période de lactation [2], c'est une enzyme ubiquitaire exprimée dans quasiment tous les tissus à des niveaux très variables (***Figure 2***).

Chez les mammifères et les levures, FASN est un très long polypeptide de 2.511 acides aminés chez l'Homme, portant à lui seul l'ensemble des activités catalytiques nécessaires à la fabrication des acides gras (***Figure 3A***) : il s'agit de FASN de type I, un seul gène codant une protéine dotée de 7 activités catalytiques. Chez les plantes, champignons, procaryotes et mitochondries, ces activités catalytiques sont portées par des protéines individuelles agissant en complexe, on parle FASN de type II. Chez les animaux, FASN est uniquement active sous forme d'homodimères associés en tête-bêche ou en tête-tête (***Figure 3B***). Chaque sous-unité de 273 kDa porte sept activités catalytiques travaillant de manière séquentielle et coordonnée. On retrouve trois domaines catalytiques dans la partie N-terminale - β-cétoacyl synthase (KS pour *keto-acylsynthase* en anglais), malonyl/acétyltransférase (MAT) et déshydratase (DH) - et quatre domaines fonctionnels dans la partie C-terminale - énoyl

réductase (ER), β-cétoacylréductase (KR pour *Keto-acylreductase* en anglais), acyl carrier protein (ACP) et thioestérase (TE) - (***Figure 3A et B***). La région centrale d'environ 650 résidus est appelée inter-domaine ou *core region* et ne porte pas d'activité catalytique. Néanmoins, il a été montré que ce domaine est crucial pour la dimérisation de FASN [3] .

Le mécanisme catalytique de FASN est complexe et fait intervenir successivement les domaines catalytiques MAT → KS → KR → DH → ER sur un nombre variable de cycles dont dépend la longueur de l'acide gras généré. Une dernière activité, TE, libère l'acide gras par hydrolyse (***Figure 4***).

Régulation de FASN

La plupart des enzymes impliquées dans la lipogenèse, et en particulier FASN, sont régulées au cours du cycle jeûne/période postprandiale. Leur activité est faible durant le jeûne et augmentée en réponse à la prise alimentaire. La régulation de FASN se fait à différents niveaux.

Au niveau transcriptionnel

Le contrôle de l'expression de FASN au niveau transcriptionnel est assuré majoritairement par l'insuline et le glucose (***Figure 1***). Ainsi, après un repas, plusieurs facteurs de transcription gouvernent l'expression de FASN. L'augmentation de la glycémie stimule la sécrétion d'insuline par les cellules β du pancréas qui active les facteurs de transcription USF1 (*upstream-stimulatory factor-1*) [4] et SREBP-1c (*sterol responsive element binding protein-1c*). L'effet même du glucose est quant à lui relayé par le facteur de transcription ChREBP (*carbohydrate responsive element binding protein*) qui induit l'expression des gènes de la lipogenèse dont FASN [5]. LXR-α (*liver X receptor-alpha*), qui appartient à une famille de

facteurs de transcription lipogéniques activés par les oxystérols, participe également à l'expression de FASN en se fixant spécifiquement sur un LXRE (*LXR responsive element*) au niveau du promoteur du gène codant l'enzyme [6]. Au-delà de ce mécanisme direct, LXR promeut indirectement l'expression de FASN en activant SREBP qui en retour active FASN [6]. De même, il est à noter que FoxO1 (*forkhead box protein O1*) réduit la lipogenèse en réprimant SREBP qui par conséquent n'active plus FASN [7].

SREBP-1c apparait comme le point central dans la régulation de l'expression de FASN. Or ce facteur de transcription est lui-même sous la dépendance des voies PI3K/AKT et MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), impliquant que FASN soit indirectement contrôlée par l'activité des récepteurs aux facteurs de croissance tels que ERBB-2 (ou HER2) et ERBB-1 (plus connu sous le nom d'*epidermal growth factor receptor*, EGFR).

Au niveau post-traductionnel

Comme nombre d'enzymes métaboliques, la régulation de FASN par transcription ne permet pas de répondre rapidement aux besoins immédiats contrairement aux MPTs. Plusieurs d'entre elles ont été identifiées sur FASN, il s'agit de la phosphorylation, la *S*-nitrosylation, l'ubiquitination, l'acétylation, la SUMOylation et la *O*-GlcNAcylation (***Figure 3A***). Certaines MPTs favorisent l'activité de FASN, c'est le cas de la *O*-GlcNAcylation et de la SUMOylation qui réduisent sa susceptibilité à la dégradation protéasomale [8,9] et la *S*-nitrosylation qui favorise sa dimérisation [10]. En revanche, l'acétylation de FASN promeut sa polyubiquitination et par conséquent sa dégradation protéasomale [11] (***Figure 3A***).

Les multiples rôles de FASN

Le rôle de FASN dans le stockage de l'énergie *via* la lipogenèse, processus métabolique au cours duquel la synthèse *de novo* des acides gras a lieu à partir des glucides (***Figure 1***), est

probablement le mieux connu. Les acides gras sont condensés avec le glycérol pour former les triglycérides secrétés sous forme de VLDL (v*ery low density lipoproteins*) par le foie vers les tissus périphériques comme le muscle squelettique pour leur oxydation et les tissus adipeux où ils constituent une forme de réserve énergétique.

La lipogenèse a également lieu dans les glandes mammaires en période de lactation. A cet effet, il a été montré que la délétion de FASN freine la maturation des glandes mammaires en lactation et diminue considérablement la teneur en acides gras du lait [2]. De manière plus générale, FASN est essentielle à la survie de l'organisme et est indispensable au développement embryonnaire puisque le KO (*knock-out*) du gène la codant induit la mort des cellules embryonnaires avant même l'implantation dans l'utérus [12]. Dans le cerveau, FASN joue un rôle dans l'homéostasie énergétique et est essentielle au maintien du bon développement et au contrôle du métabolisme lipidique dans les cellules souches neuronales. L'expression d'une FASN non fonctionnelle dans les cellules souches neuronales entraine des déficits d'apprentissage et de mémoire [13]. FASN joue également un rôle dans la prévention du stress du myocarde. En effet, l'induction de FASN dans le cœur stressé protège les cardiomyocytes du flux de calcium pathologique [14]. Dans le poumon fœtal humain, FASN est nécessaire à la production de surfactants impliqués dans le bon fonctionnement des alvéoles pulmonaires [15]. FASN participe activement à la biosynthèse de composants membranaires nécessaires à la division cellulaire et à la dynamique des microdomaines lipidiques (lipides rafts). Ces lipides rafts assurent la localisation correcte des récepteurs, potentialisent l'activation des voies de signalisation et, par conséquent, la prolifération cellulaire [1] (***Figure 1***). *Via* la synthèse du palmitoyl-CoA, l'enzyme lipogénique est incontournable dans les réactions de modification covalente par acylation de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. C'est le cas du facteur Wnt1 qui, une fois

palmitoylée par la Porcupine (une *O*-acyltransférase réticulaire), est sécrété avant de se fixer sur les cellules cibles grâce au récepteur *Frizzled* pour activer la voie Wnt/β-caténine [16]. La palmitoylation joue aussi un rôle dans le maintien de la muqueuse intestinale en modifiant MUC2 (mucine 2), mucine dominante dans le côlon [17]. Enfin, les acides gras contribuent à la production de seconds messagers tels que le PIP3 et le LPA (acide lysophosphatidique) activateurs de la voie PI3K/AKT/mTOR [18] et des GPCR (*G-protein coupled receptor*) [19] respectivement. Enfin, FASN est un acteur clé du cycle cellulaire puisque l'inhibition de l'enzyme provoque son arrêt, de fait la prolifération cellulaire est intimement relié à son activité catalytique [20]. En retour, le facteur de transcription E2F1, dont le rôle dans le bon déroulement du cycle cellulaire est de premier ordre, contrôle le métabolisme glucido-lipidique en activant l'expression de certains de ses gènes cibles incluant FASN, ChREBP, ACC (acétyl-CoA carboxylase) et SCD1 (stéaoryl-CoA désaturase-1) [21].

De la physiologie à la pathologie

FASN et dérégulations métaboliques

Le gène codant FASN est localisé au chromosome 17q25.3, une région liée à l'adiposité. Une dérégulation de son expression est associée à l'obésité et ses complications métaboliques telle la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Une étude chez le rongeur a rapporté que l'inhibition de FASN induit une perte de poids profonde et une réduction de l'apport alimentaire, suggérant qu'elle soit impliquée dans le processus d'obésité par la régulation du comportement alimentaire et de l'homéostasie énergétique [22]. Chez la dinde, il a été montré que les polymorphismes du gène *FASN* sont associés à une augmentation de la masse graisseuse [23]. En outre, des études génétiques ont révélé une mutation faux-sens du gène *hFASN* (substitution Val>Ile sur le codon 1483) entrainant une diminution du pourcentage de

graisse corporelle chez les Indiens Pima non diabétiques [24] et chez des enfants caucasiens [25]. Enfin, un travail portant sur un panel de 196 participants a montré une augmentation significative des niveaux d'ARNm de FASN dans le tissu viscéral en comparaison au tissu adipeux sous-cutané et ce de manière dépendante de l'obésité et du diabète de type 2 des patients [26]. Ainsi, l'inhibition de FASN spécifiquement dans le tissu adipeux pourrait représenter une approche thérapeutique dans la prévention et le traitement de l'obésité et de ses complications.

FASN actrice de premier plan dans le cancer

FASN est en général plus fortement exprimée dans les cellules cancéreuses. Cette surexpression corrèle avec une augmentation de la charge tumorale, l'agressivité du cancer et un mauvais pronostic. Une augmentation de la lipogenèse confère à la cellule cancéreuse des avantages en termes de prolifération, survie, métastase et résistance à la chimiothérapie. Dans la plupart des tissus sains, la synthèse des acides gras est ralentie, ces tissus se contentant de ceux provenant de l'alimentation pour satisfaire leurs besoins. Par contre, une synthèse lipidique accrue est indispensable au processus de carcinogenèse. Par exemple, des cellules de cancer du sein synthétisent 95% d'acides gras *de novo* bien qu'ayant accès comme tout autre type cellulaire à une source de lipides alimentaires. Mais, FASN n'est pas un oncogène à part entière, sa seule surexpression ne transformant pas la cellule. Malgré tout, une délétion génétique de celle-ci supprime l'effet carcinogène des proto-oncogènes AKT et c-Met, sans avoir par contre d'effet chez des souris exprimant conjointement la β-caténine et c-Met [27]. Dans un modèle de souris transgénique sur-exprimant FASN au niveau de la prostate, l'enzyme lipogénique montre des propriétés oncogéniques en favorisant une néoplasie intra-épithéliale prostatique mais sans tumeurs invasives [27]. L'injection de cellules

épithéliales prostatiques immortalisées iPrEC coexprimant FASN et le récepteur aux androgènes induit un adénocarcinome invasif [27]. Dans ce modèle de cancer, FASN jouerait son rôle oncogénique en prévenant la voie intrinsèque de l'apoptose, une approche par *gene silencing* sur diverses lignées cellulaires de cancer de la prostate indiquant que la déplétion en FASN induisait l'apoptose [27]. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle plutôt que de revêtir à elle seule les propriétés d'un oncogène, FASN jouerait un rôle déterminant dans la carcinogénèse par blocage des processus apoptotiques au-delà d'une production accrue d'acides gras nécessaires à la prolifération cellulaire.

Le shift métabolique observé dans les cellules cancéreuses (effet Warburg) convient particulièrement à l'activité de FASN. En effet, il est désormais admis que les cellules cancéreuses ont une addiction pour le glucose plus forte que leurs congénères « normales ». L'utilisation accrue de sucre et sa métabolisation en mode glycolytique permet de produire en quantité de l'acétyl-CoA *via* le pyruvate issu de la glycolyse et du $NADPH,H^+$ (voie des pentoses-phosphates et navette citrate-pyruvate) (***Figure 1***) cofacteur indispensable aux réactions de réductions réalisées par les activités β-céto-acyl réductase et énoyl-réductase de FASN (***Figure 1***). Les cellules tumorales tirent-elles avantage de ce shift métabolique pour accélérer la synthèse d'acides gras nécessaires à la production des constituants membranaires, précieux à toute cellule en division, et aux lipidations indispensables à la signalisation cellulaire (***Figure 1***).

Dérégulation de FASN dans le cancer

Comme discuté précédemment, SREBP-1c est la pièce maîtresse dans la régulation d'expression de FASN au niveau transcriptionnel. SREBP-1c dépend de l'activation des voies PI3K/AKT et MAPK. Ainsi, l'inhibition de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) *in vitro*

favorise l'expression de FASN du fait de l'activation incontrôlée d'AKT ainsi que la croissance des cellules cancéreuses de la prostate [28]. De même, le traitement de cellules tumorales osseuses avec un inhibiteur de MAPK diminue le niveau d'expression de FASN et réduit la prolifération cellulaire [29]. Les MPTs concourent également à la dérégulation de FASN dans le cancer. USP2a (*ubiquitin-specific protease-2a*) est une déubiquitinase pré-protéasomale surexprimée dans le cancer de la prostate. Elle jouerait un rôle essentiel dans la survie des cellules cancéreuses prostatiques en stabilisant FASN [30]. USP2a interagit avec FASN lui évitant la dégradation protéasomale en la libérant des résidus d'ubiquitine. L'inactivation d'USP2a diminue les niveaux de FASN et accroit l'apoptose. Autre exemple, la phosphorylation de FASN par ERBB2 dans des cellules de cancer du sein augmente son activité ce qui favorise la progression tumorale [31].

La régulation de FASN au niveau post-traductionnel peut être indirecte. La phosphorylation de SREBP par AKT induit l'expression de FASN et promeut la prolifération de cellules cancéreuses mammaires en conditions d'hypoxie [32]. De plus, mTOR induit l'expression de FASN en phosphorylant STAT5 qui, en retour, interagit avec SREBP pour l'activer [33].

La surexpression de FASN dans le cancer est également liée à son polymorphisme. Grâce à des analyses immunohistochimiques, Shah et collaborateurs ont observé un gain du nombre de copies du gène FASN dans 24% d'échantillons d'adénocarcinome de prostate avec une augmentation simultanée de son niveau protéique [34]. Des SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) ont été identifiés dans le gène FASN chez des patients atteints de cancer de la prostate: il en résulte une surexpression de l'enzyme associée à une augmentation de l'IMC (Indice de Masse Corporelle) et à un mauvais pronostic [35]. FASN serait de fait un médiateur reliant obésité et progression tumorale. Une autre étude a montré que la surexpression de

FASN dans le cancer colorectal est associée à des MSI (*microsatellite instability*), l'obésité étant un facteur de risque dans cette pathologie [36].

FASN, cible thérapeutique prometteuse

FASN est surexprimée dans de nombreux cancers et est liée à un mauvais pronostic, réduire son activité constitue une piste thérapeutique attractive. A ce jour, plusieurs composés inhibiteurs de FASN ont été identifiés : TVB-3166, TVB-2640, GSK2194069, C93, FAS31, C247, C75, cérulénine, orlistat, triclosan et certains polyphénols naturels. En raison de leurs effets secondaires, seul TVB-2640 – premier inhibiteur oral, sélectif et réversible de FASN - est en essai de phase clinique chez des patients cancéreux. En revanche, les résultats préliminaires du premier essai chez l'Homme ont montré des toxicités cutanées réversibles (desquamation et érythrodysesthésie palmo-plantaire) et ophtalmologique (œdème cornéen, kératite et iritis) [37]. Cependant, l'administration du TVB-2640 en association avec le paclitaxel donne une bonne réponse chez des patients atteints de carcinome séreux péritonéal ainsi qu'une meilleure stabilité de la maladie chez des patientes atteintes du cancer du sein [38].

Conclusion et perspectives

FASN est une protéine complexe tant sur le plan structural que fonctionnel de par ses multiples domaines catalytiques. C'est également une enzyme pivot du métabolisme, sa dérégulation contribuant à de multiples désordres pathologiques incluant le cancer. A cet effet, nombre d'études ont montré que la surexpression de FASN confère à la cellule cancéreuse des avantages de croissance, de survie et de résistance à l'apoptose. Ces éléments font de FASN une cible thérapeutique prometteuse.

Bien que la surexpression de FASN favorise la tumorigenèse, les mécanismes sous-jacents à la progression tumorale ne sont pas très clairs. Des études futures pourraient aider à éclaircir ce

point et à plus long terme prévenir certains cancers. De plus, FASN pourrait constituer un marqueur diagnostic précoce des cancers puisque des taux élevés de la protéine ont été détectés dans le sang de patients atteints de cancer du sein, de la prostate, du colon et de l'ovaire par rapport aux sujets sains en utilisant le test ELISA [39].

Légendes des figures

Figure 1 - La lipogenèse et fonctions des acides gras. FASN est exprimée au niveau transcriptionnel en réponse au glucose et à l'insuline qui activent respectivement les facteurs de transcription ChREBP, SREBP et USF1. LXR-α, également activé par l'insuline et dont les agonistes sont des dérivés du cholestérol appelés oxystérols, contrôle directement et indirectement (*via* SREBP) la transcription de FASN, alors que FoxO1 la réprime. L'entrée du glucose dans la cellule est facilitée par un transporteur de la famille GLUT. Après phosphorylation en G6P, plusieurs voies s'offrent au glucose parmi lesquelles la glycolyse et la voie des pentoses-phosphates. La glycolyse produit le pyruvate qui, au niveau de la mitochondrie, donne l'acétyl-CoA puis le citrate. Le citrate est alors exporté vers le cytosol grâce à la navette citrate-pyruvate pour produire de nouveau l'acétyl-CoA, substrat de l'ACC qui à son tour forme le malonyl-CoA. L'acétyl-CoA et le malonyl-CoA sont les deux substrats de FASN qui pour fabriquer les acides gras nécessite également le NADPH,H^+ (*N.B.* c'est la forme activée de l'acide palmitique en palmitoyl-CoA qui permet son utilisation ultérieure, ceci vaut d'ailleurs pour tous les acides gras). Après désaturation et/ou élongation grâce à SCD et ELOVL respectivement, on obtient d'autres types d'acides gras, entre autres estérifiés par GPAT en triglycérides en vue de leur stockage. Une partie des acides gras synthétisés sert à la fabrication des composants membranaires essentiels à la cellule notamment au cours de la division cellulaire qui *in fine* nécessite le doublement de la surface membranaire. A ce propos, en fonction de la nature des acides gras produits, en l'occurrence ici acides gras à chaînes longues et saturées (en association avec le cholestérol), certaines zones de la membrane possèdent une fluidité restreinte: il s'agit des radeaux lipidiques (lipides « rafts ») ou DRMs. L'acide palmitique et d'autres acides gras modifient certaines protéines telles que Ras, Cav-1 et Wnt indispensables à leur adressage final : il s'agit des réactions d'acylation faisant partie des lipidations (MPTs basées sur le greffage de structures lipidiques). Les acides gras peuvent également participer à la fabrication de messagers secondaires tels que le PIP3. Ces dernières fonctions participent à la transduction du signal et à la signalisation cellulaire.

Abréviations: ACC, acétyl-CoA carboxylase ; ACLY, ATP-citrate lyase ; AGI, acides gras insaturés ; AGCL, acides gras à chaînes longues ; ChREBP, *carbohydrate responsive element binding protein* ; CK, cycle de Krebs ; ELOVL, *elongation of very long chain fatty acids* ; FoxO1, *forkhead box O1* ; G6P, glucose-6-phosphate ; GLUT, *glucose transporter* ; GPAT, glycérol-3-phosphate acyltransférase ; LXR, *liver X receptor* ; MDH, malate déshydrogénase ;

PPP, *pentose phosphate pathway* ; SCD, stéaroyl-CoA désaturase ; *SREBP, sterol responsive element binding protein* ; USF1, *upstream stimulatory factor-1*

Figure 2 – Distribution tissulaire de FASN. Bien qu'il soit admis que FASN soit plus abondante dans le tissu adipeux, la glande mammaire ou le foie, l'enzyme est exprimée dans pratiquement tous les tissus de l'organisme. Figure produite sur GTEx (GTEx Portal).

Figure 3 - (A) Représentation schématique de FASN. FASN présente sept domaines fonctionnels : KS, MAT et DH dans la partie Nt et ER, KR, ACP et TE dans la partie Ct. L'ACP présente l'acide gras en cours d'élongation aux différentes activités catalytiques. Les sites de MPTs sont représentés. (**B**) **Modèles d'organisation en dimères de FASN** : présentation tête-tête (à gauche) et tête-bêche (à droite).

Figure 4- Le cycle catalytique de FASN. L'activité MAT catalyse la fixation de l'acétyl-CoA et du malonyl-CoA sur les groupements SH de FASN. L'acyl en cours de synthèse est alors allongé par l'activité KS, réduit par l'activité KR en utilisant l'équivalent réducteur NADPH,H^+, déshydraté par l'activité DH, réduit une seconde fois par l'activité ER. L'acide palmitique est enfin libéré par l'activité TE. Chacune des activités catalytiques de FASN est accompagnée de sa numérotation EC (enzyme commission).

Références bibliographies

1. Di Vizio D, Adam RM, Kim J, *et al*. Caveolin-1 interacts with a lipid raft-associated population of fatty acid synthase. *Cell Cycle Georget Tex* 2008; 7: 2257-67.

2. Suburu J, Shi L, Wu J, *et al*. Fatty acid synthase is required for mammary gland development and milk production during lactation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; 306 : 1132-1143.

3. Chirala SS, Wakil SJ. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids* 2004; 39 :1045-53.

4. Wang D, Sul HS. Upstream stimulatory factor binding to the E-box at -65 is required for insulin regulation of the fatty acid synthase promoter. *J Biol Chem* 1997; 272 : 26367-74.

5. Guillou H, Martin PGP, Pineau T. Transcriptional regulation of hepatic fatty acid metabolism. *Subcell Biochem* 2008; 49: 3-47.

6. Li J, Luo J, Zhu J, *et al*. Regulation of the fatty acid synthase promoter by liver X receptor α through direct and indirect mechanisms in goat mammary epithelial cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2015; 184: 44-51.

7. He Q, Luo J, Wu J, *et al*. FoxO1 Knockdown Promotes Fatty Acid Synthesis via Modulating SREBP1 Activities in the Dairy Goat Mammary Epithelial Cells. *J Agric Food Chem* 2020; 68 : 12067-78.

8. Baldini SF, Wavelet C, Hainault I, *et al*. The Nutrient-Dependent O-GlcNAc Modification Controls the Expression of Liver Fatty Acid Synthase. *J Mol Biol* 2016; 428 : 3295-304.

9. Floris A, Mazarei M, Yang X, *et al*. SUMOylation Protects FASN Against Proteasomal Degradation in Breast Cancer Cells Treated with Grape Leaf Extract. *Biomolecules* 2020; 10: 529

10. Choi MS, Jung J-Y, Kim H-J, *et al*. S-nitrosylation of fatty acid synthase regulates its activity through dimerization. *J Lipid Res* 2016; 57 : 607-15.

11. Lin H-P, Cheng Z-L, He R-Y, *et al*. Destabilization of Fatty Acid Synthase by Acetylation Inhibits De Novo Lipogenesis and Tumor Cell Growth. *Cancer Res* 2016; 76 : 6924-36.

12. Chirala SS, Chang H, Matzuk M, *et al*. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: Fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100 : 6358-63.

13. Bowers M, Liang T, Gonzalez-Bohorquez D, *et al*. FASN-Dependent Lipid Metabolism Links Neurogenic Stem/Progenitor Cell Activity to Learning and Memory Deficits. *Cell Stem Cell* 2020; 27 : 98-109.e11.

14. Razani B, Zhang H, Schulze PC, *et al*. Fatty acid synthase modulates homeostatic responses to myocardial stress. *J Biol Chem* 2011; 286 : 30949-61.

15. Wagle S, Bui A, Ballard PL, *et al*. Hormonal regulation and cellular localization of fatty acid synthase in human fetal lung. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol* 1999; 277 : L381-90.

16. Fiorentino M, Zadra G, Palescandolo E, *et al*. Overexpression of fatty acid synthase is associated with palmitoylation of Wnt1 and cytoplasmic stabilization of beta-catenin in prostate cancer. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 2008; 88 : 1340-8.

17. Wei X, Yang Z, Rey FE, *et al*. Fatty Acid Synthase Modulates Intestinal Barrier Function through Palmitoylation of Mucin 2. *Cell Host Microbe* 2012; 11 : 140-52.

18. Faes S, Dormond O. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *Int J Mol Sci* 2015; 16 : 21138-52.

19. Liu Y, An S, Ward R, *et al*. G protein-coupled receptors as promising cancer targets. *Cancer Lett* 2016 ; 376 : 226-39.

20. Veigel D, Wagner R, Stübiger G, *et al*. Fatty acid synthase is a metabolic marker of cell proliferation rather than malignancy in ovarian cancer and its precursor cells. *Int J Cancer* 2015; 136 : 2078-90.

21. Denechaud P-D, Lopez-Mejia IC, Fajas L. Cell cycle regulators CDK4 and E2F1 control glucose and lipid homeostasis. *Med Sci MS* 2016; 32 : 815-8.

22. Kumar MV, Shimokawa T, Nagy TR, *et al*. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99 : 1921-5.

23. Sourdioux M, Brevelet C, Delabrosse Y, *et al*. Association of fatty acid synthase gene and malic enzyme gene polymorphisms with fatness in turkeys. *Poult Sci* 1999 ; 78 : 1651-7.

24. Kovacs P, Harper I, Hanson RL, *et al*. A Novel Missense Substitution (Val1483Ile) in the Fatty Acid Synthase Gene (FAS) Is Associated With Percentage of Body Fat and Substrate Oxidation Rates in Nondiabetic Pima Indians. *Diabetes* 2004; 53 : 1915-9.

25. Körner A, Ma L, Franks PW, *et al*. Sex-specific effect of the Val1483Ile polymorphism in the fatty acid synthase gene (FAS) on body mass index and lipid profile in Caucasian children. *Int J Obes* 2007; 31 : 353-8.

26. Berndt J, Kovacs P, Ruschke K, *et al*. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 2007 ; 50 : 1472-80.

27. Migita T, Ruiz S, Fornari A, *et al*. Fatty Acid Synthase: A Metabolic Enzyme and Candidate Oncogene in Prostate Cancer. *JNCI J Natl Cancer Ins*t 2009; 101 : 519-32.

28. Bandyopadhyay S, Pai SK, Watabe M, *et al*. FAS expression inversely correlates with PTEN level in prostate cancer and a PI 3-kinase inhibitor synergizes with FAS siRNA to induce apoptosis. *Oncogene* 2005; 24 : 5389-95.

29. Jiang Y, Yin X, Wu L, *et al*. MAPK/P53-mediated FASN expression in bone tumors. *Oncol Lett* 2017 ; 13 : 4035-8.

30. Graner E, Tang D, Rossi S, *et al*. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell* 2004 ; 5 : 253-61.

31. Jin Q, Yuan LX, Boulbes D, *et al*. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Res BCR* 2010; 12 : R96.

32. Furuta E, Pai SK, Zhan R, *et al*. Fatty Acid Synthase Gene Is Up-regulated by Hypoxia via Activation of Akt and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1. *Cancer Res* 2008; 68 : 1003-11.

33. Li T, Weng J, Zhang Y, *et al*. mTOR direct crosstalk with STAT5 promotes de novo lipid synthesis and induces hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* 2019; 10 : 619.

34. Shah US, Dhir R, Gollin SM, *et al.* Fatty acid synthase gene overexpression and copy number gain in prostate adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2006 ; 37 : 401-9.

35. Nguyen PL, Ma J, Chavarro JE, *et al*. Fatty Acid Synthase Polymorphisms, Tumor Expression, Body Mass Index, Prostate Cancer Risk, and Survival. *J Clin Oncol* 2010; 28 : 3958-64.

36. Ogino S, Kawasaki T, Ogawa A, *et al*. Fatty acid synthase overexpression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, independent of CpG island methylator phenotype. *Hum Pathol* 2007 ; 38 : 842-9.

37. Dean EJ, Falchook GS, Patel MR, *et al*. Preliminary activity in the first in human study of the first-in-class fatty acid synthase (FASN) inhibitor, TVB-2640. *J Clin Oncol* 2016 ; 34 : 2512-2512.

38. Arkenau H-T, Voskoboynik M, Infante J, *et al*. Evidence of activity of a new mechanism of action (MoA): A first-in-human study of the first-in-class fatty acid synthase (FASN) inhibitor, TVB-2640, as monotherapy or in combination. *EJC* 2015; Abstract 27LBA.

39. Wang YY, Kuhajda FP, Li J, *et al*. Fatty acid synthase as a tumor marker: its extracellular expression in human breast cancer. *J Exp Ther Oncol* 2004 ; 4 : 101-10.

Figures :

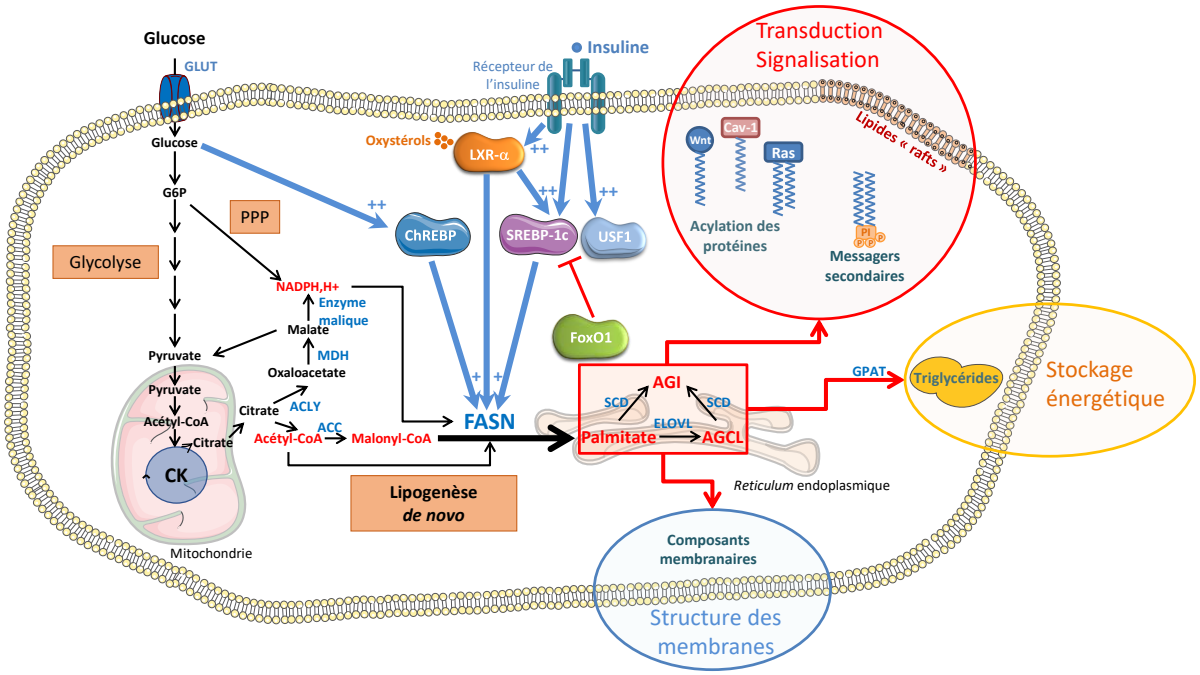


Figure 1

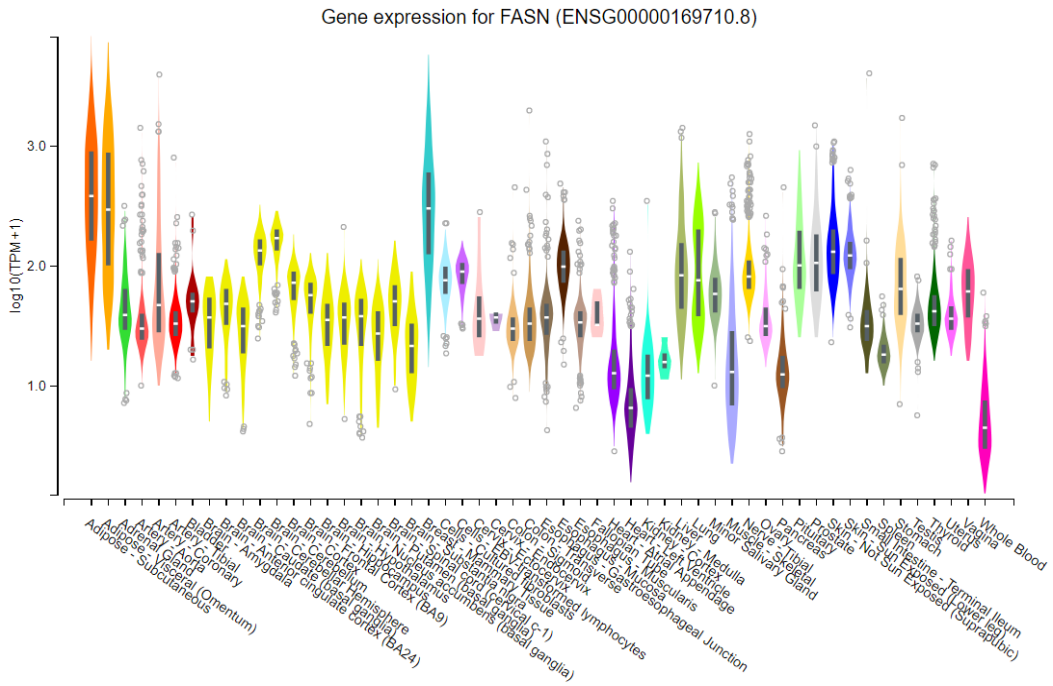


Figure 2

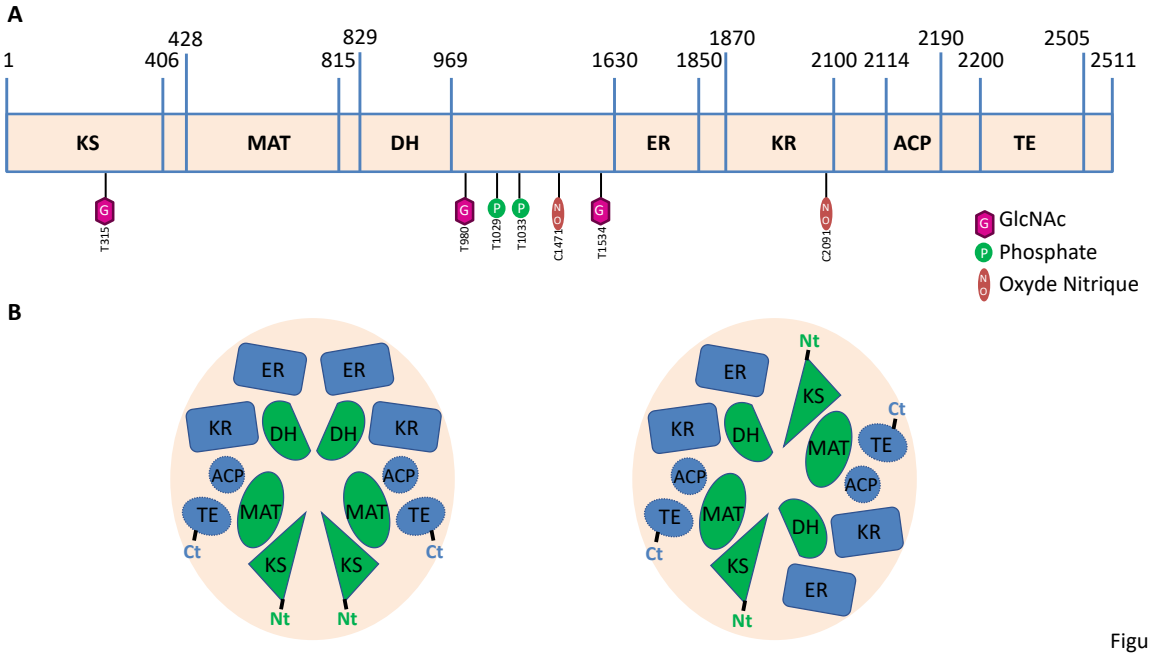


Figure 3

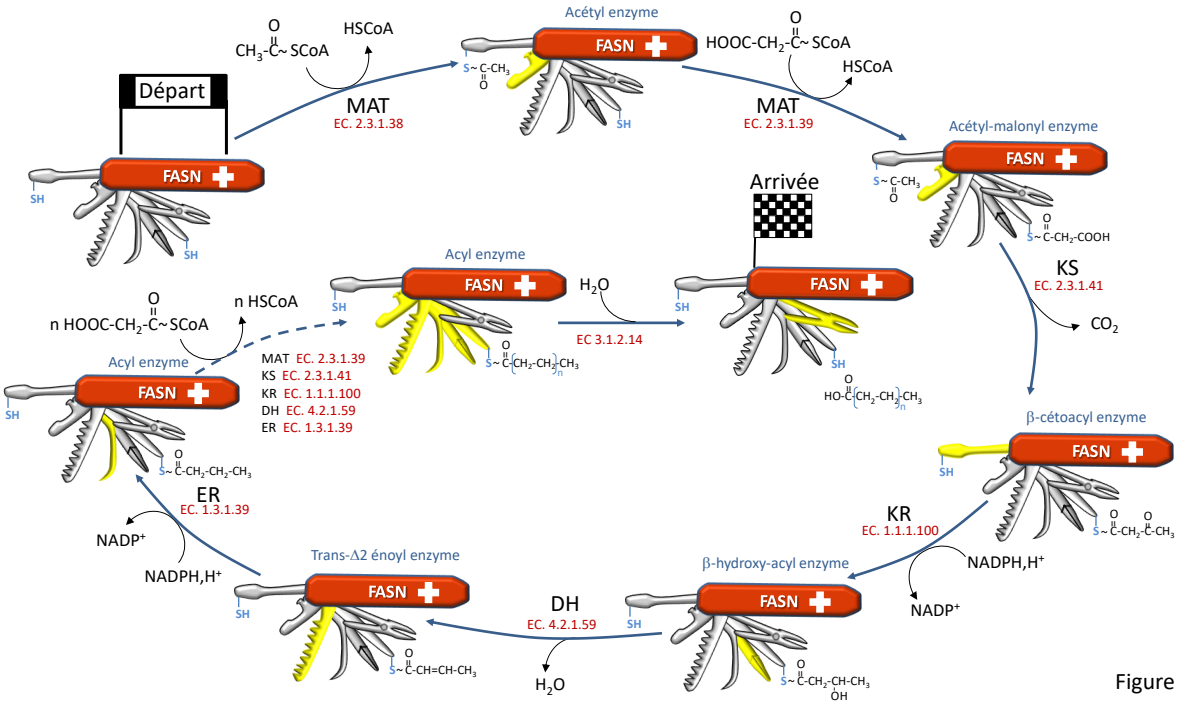


Figure 4

Références bibliographiques

Abdel Rahman, A.M., Ryczko, M., Pawling, J. and Dennis, J.W. 2013. Probing the hexosamine biosynthetic pathway in human tumor cells by multitargeted tandem mass spectrometry. *ACS chemical biology*. **8**(9), pp.2053–2062.

Abdel-Rahman, O. and Elsayed, Z. 2017. External beam radiotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. **3**, p.CD011314.

Abella, A., Dubus, P., Malumbres, M., Rane, S.G., Kiyokawa, H., Sicard, A., Vignon, F., Langin, D., Barbacid, M. and Fajas, L. 2005. Cdk4 promotes adipogenesis through PPARγ activation. *Cell Metabolism*. **2**(4), pp.239–249.

Abou-Alfa, G.K., Meyer, T., Cheng, A.-L., El-Khoueiry, A.B., Rimassa, L., Ryoo, B.-Y., Cicin, I., Merle, P., Chen, Y., Park, J.-W., Blanc, J.-F., Bolondi, L., Klümpen, H.-J., Chan, S.L., Zagonel, V., Pressiani, T., Ryu, M.-H., Venook, A.P., Hessel, C., Borgman-Hagey, A.E., Schwab, G. and Kelley, R.K. 2018. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. **379**(1), pp.54–63.

Alexander, G.E., Chen, K., Pietrini, P., Rapoport, S.I. and Reiman, E.M. 2002. Longitudinal PET Evaluation of Cerebral Metabolic Decline in Dementia: A Potential Outcome Measure in Alzheimer's Disease Treatment Studies. *The American Journal of Psychiatry*. **159**(5), pp.738–745.

Alves-Bezerra, M. and Cohen, D.E. 2017. Triglyceride metabolism in the liver. *Comprehensive Physiology*. **8**(1), pp.1–8.

An, Z., Wang, H., Song, P., Zhang, M., Geng, X. and Zou, M.-H. 2020. Withdrawal: Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3L1 adipocytes: A role for oxidant stress. *The Journal of Biological Chemistry*. **295**(2), p.667.

Andrali, S.S., Qian, Q. and Ozcan, S. 2007. Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry*. **282**(21), pp.15589–15596.

Angelucci, C., D'Alessio, A., Iacopino, F., Proietti, G., Di Leone, A., Masetti, R. and Sica, G. 2018. Pivotal role of human stearoyl-CoA desaturases (SCD1 and 5) in breast cancer progression: oleic acid-based effect of SCD1 on cell migration and a novel pro-cell survival role for SCD5. *Oncotarget*. **9**(36), pp.24364–24380.

Anon 2017. Checkpoint kinase 1–induced phosphorylation of O-linked β-N-acetylglucosamine transferase regulates the intermediate filament network during cytokinesis. *The Journal of Biological Chemistry*. **292**(48), pp.19548–19555.

Aquino-Gil, M.O., Kupferschmid, M., Shams-Eldin, H., Schmidt, J., Yamakawa, N., Mortuaire, M., Krzewinski, F., Hardivillé, S., Zenteno, E., Rolando, C., Bray, F., Pérez Campos, E., Dubremetz, J.-F., Perez-Cervera, Y., Schwarz, R.T. and Lefebvre, T. 2018. Apart From Rhoptries, Identification of Toxoplasma gondii's O-GlcNAcylated Proteins Reinforces the Universality of the O-GlcNAcome. *Frontiers in Endocrinology*. **9**.

Arkenau, H.-T., Voskoboynik, M., Infante, J., Brenner, A., Patel, M., Borazanci, E., Falchook, G., Molife, L.R., Pant, S., Dean, E., Pelosof, L., Jones, S., Rubino, C., McCulloch, W., Zhukova-Harrill, V., Kemble, G., O'Farrell, M. and Burris, H. 2015. *Evidence of activity of a new mechanism of action*

(MoA): A first-in-human study of the first-in-class fatty acid synthase (FASN) inhibitor, TVB-2640, as monotherapy or in combination.

Arroyo, M. and Raychaudhuri, P. 1992. Retinoblastoma-repression of E2F-dependent transcription depends on the ability of the retinoblastoma protein to interact with E2F and is abrogated by the adenovirus E1A oncoprotein. *Nucleic Acids Research*. **20**(22), pp.5947–5954.

Asturias, F.J., Chadick, J.Z., Cheung, I.K., Stark, H., Witkowski, A., Joshi, A.K. and Smith, S. 2005. Structure and molecular organization of mammalian fatty acid synthase. *Nature Structural & Molecular Biology*. **12**(3), pp.225–232.

Atilla-Gokcumen, G.E., Muro, E., Relat-Goberna, J., Sasse, S., Bedigian, A., Coughlin, M.L., Garcia-Manyes, S. and Eggert, U.S. 2014. Dividing cells regulate their lipid composition and localization. *Cell*. **156**(3), pp.428–439.

Baldini, S.F., Wavelet, C., Hainault, I., Guinez, C. and Lefebvre, T. 2016. The Nutrient-Dependent O-GlcNAc Modification Controls the Expression of Liver Fatty Acid Synthase. *Journal of Molecular Biology*. **428**(16), pp.3295–3304.

Bandyopadhyay, S., Pai, S.K., Watabe, M., Gross, S.C., Hirota, S., Hosobe, S., Tsukada, T., Miura, K., Saito, K., Markwell, S.J., Wang, Y., Huggenvik, J., Pauza, M.E., Iiizumi, M. and Watabe, K. 2005. FAS expression inversely correlates with PTEN level in prostate cancer and a PI 3-kinase inhibitor synergizes with FAS siRNA to induce apoptosis. *Oncogene*. **24**(34), pp.5389–5395.

Baserga, R. 1962. A study of nucleic acid synthesis in ascites tumor cells by two-emulsion autoradiography. *The Journal of Cell Biology*. **12**, pp.633–637.

Bataller, R. 2006. Time to ban smoking in patients with chronic liver diseases. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. **44**(6), pp.1394–1396.

Beaven, S.W., Matveyenko, A., Wroblewski, K., Chao, L., Wilpitz, D., Hsu, T.W., Lentz, J., Drew, B., Hevener, A.L. and Tontonoz, P. 2013. Reciprocal Regulation of Hepatic and Adipose Lipogenesis by Liver X Receptors in Obesity and Insulin Resistance. *Cell metabolism*. **18**(1), pp.106–117.

Bell, R.J.A., Rube, H.T., Xavier-Magalhães, A., Costa, B.M., Mancini, A., Song, J.S. and Costello, J.F. 2016. Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality. *Molecular cancer research: MCR*. **14**(4), pp.315–323.

Bengoechea-Alonso, M.T. and Ericsson, J. 2009. A phosphorylation cascade controls the degradation of active SREBP1. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(9), pp.5885–5895.

Ben-Sahra, I., Howell, J.J., Asara, J.M. and Manning, B.D. 2013. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science (New York, N.Y.)*. **339**(6125), pp.1323–1328.

Ben-Sahra, I., Hoxhaj, G., Ricoult, S.J.H., Asara, J.M. and Manning, B.D. 2016. mTORC1 induces purine synthesis through control of the mitochondrial tetrahydrofolate cycle. *Science (New York, N.Y.)*. **351**(6274), pp.728–733.

Ben-Sahra, I. and Manning, B.D. 2017. mTORC1 signaling and the metabolic control of cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*. **45**, pp.72–82.

Bergeron-Brlek, M., Goodwin-Tindall, J., Cekic, N., Roth, C., Zandberg, W.F., Shan, X., Varghese, V., Chan, S., Davies, G.J., Vocadlo, D.J. and Britton, R. 2015. A Convenient Approach to Stereoisomeric Iminocyclitols: Generation of Potent Brain-Permeable OGA Inhibitors. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. **54**(51), pp.15429–15433.

Berhane, S., Toyoda, H., Tada, T., Kumada, T., Kagebayashi, C., Satomura, S., Schweitzer, N., Vogel, A., Manns, M.P., Benckert, J., Berg, T., Ebker, M., Best, J., Dechêne, A., Gerken, G., Schlaak, J.F., Weinmann, A., Wörns, M.A., Galle, P., Yeo, W., Mo, F., Chan, S.L., Reeves, H., Cox, T. and Johnson, P. 2016. Role of the GALAD and BALAD-2 Serologic Models in Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma and Prediction of Survival in Patients. *Clinical Gastroenterology and Hepatology: The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*. **14**(6), pp.875-886.e6.

Berndt, J., Kovacs, P., Ruschke, K., Klöting, N., Fasshauer, M., Schön, M.R., Körner, A., Stumvoll, M. and Blüher, M. 2007. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*. **50**(7), pp.1472–1480.

Bertram, L., Blacker, D., Mullin, K., Keeney, D., Jones, J., Basu, S., Yhu, S., McInnis, M.G., Go, R.C., Vekrellis, K., Selkoe, D.J., Saunders, A.J. and Tanzi, R.E. 2000. Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q. *Science (New York, N.Y.)*. **290**(5500), pp.2302–2303.

Bienvenu, F., Jirawatnotai, S., Elias, J.E., Meyer, C.A., Mizeracka, K., Marson, A., Frampton, G.M., Cole, M.F., Odom, D.T., Odajima, J., Geng, Y., Zagozdzon, A., Jecrois, M., Young, R.A., Liu, X.S., Cepko, C.L., Gygi, S.P. and Sicinski, P. 2010. Transcriptional role of cyclin D1 in development revealed by a genetic-proteomic screen. *Nature*. **463**(7279), pp.374–379.

Blanchet, E., Annicotte, J.-S., Lagarrigue, S., Aguilar, V., Clapé, C., Chavey, C., Fritz, V., Casas, F., Apparailly, F., Auwerx, J. and Fajas, L. 2011. E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nature Cell Biology*. **13**(9), pp.1146–1152.

Bond, M.R. and Hanover, J.A. 2015. A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc. *The Journal of Cell Biology*. **208**(7), pp.869–880.

Bowers, M., Liang, T., Gonzalez-Bohorquez, D., Zocher, S., Jaeger, B.N., Kovacs, W.J., Röhrl, C., Cramb, K.M.L., Winterer, J., Kruse, M., Dimitrieva, S., Overall, R.W., Wegleiter, T., Najmabadi, H., Semenkovich, C.F., Kempermann, G., Földy, C. and Jessberger, S. 2020. FASN-Dependent Lipid Metabolism Links Neurogenic Stem/Progenitor Cell Activity to Learning and Memory Deficits. *Cell Stem Cell*. **27**(1), pp.98-109.e11.

Bp, T., Re, M., Jc, L., Km, D., Et, Y., Re, S. and Sl, M. 2007. Cyclic changes in metabolic state during the life of a yeast cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**(43), pp.16886–16891.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. **68**(6), pp.394–424.

Bressac, B., Kew, M., Wands, J. and Ozturk, M. 1991. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. **350**(6317), pp.429–431.

Bricambert, J., Miranda, J., Benhamed, F., Girard, J., Postic, C. and Dentin, R. 2010. Salt-inducible kinase 2 links transcriptional coactivator p300 phosphorylation to the prevention of ChREBP-

dependent hepatic steatosis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. **120**(12), pp.4316–4331.

Bridges, D. and Saltiel, A.R. 2015. Phosphoinositides: Key modulators of energy metabolism. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1851**(6), pp.857–866.

Bruix, J., Qin, S., Merle, P., Granito, A., Huang, Y.-H., Bodoky, G., Pracht, M., Yokosuka, O., Rosmorduc, O., Breder, V., Gerolami, R., Masi, G., Ross, P.J., Song, T., Bronowicki, J.-P., Ollivier-Hourmand, I., Kudo, M., Cheng, A.-L., Llovet, J.M., Finn, R.S., LeBerre, M.-A., Baumhauer, A., Meinhardt, G., Han, G., and RESORCE Investigators 2017. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. **389**(10064), pp.56–66.

Bruning, U., Morales-Rodriguez, F., Kalucka, J., Goveia, J., Taverna, F., Queiroz, K.C.S., Dubois, C., Cantelmo, A.R., Chen, R., Loroch, S., Timmerman, E., Caixeta, V., Bloch, K., Conradi, L.-C., Treps, L., Staes, A., Gevaert, K., Tee, A., Dewerchin, M., Semenkovich, C.F., Impens, F., Schilling, B., Verdin, E., Swinnen, J.V., Meier, J.L., Kulkarni, R.A., Sickmann, A., Ghesquière, B., Schoonjans, L., Li, X., Mazzone, M. and Carmeliet, P. 2018. Impairment of Angiogenesis by Fatty Acid Synthase Inhibition Involves mTOR Malonylation. *Cell Metabolism*. **28**(6), pp.866-880.e15.

Buchakjian, M.R. and Kornbluth, S. 2010. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **11**(10), pp.715–727.

Buendia, M.-A. and Neuveut, C. 2015. Hepatocellular carcinoma. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. **5**(2), p.a021444.

Bullen, J.W., Balsbaugh, J.L., Chanda, D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Neumann, D. and Hart, G.W. 2014. Cross-talk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *The Journal of Biological Chemistry*. **289**(15), pp.10592–10606.

Buti, S., Leonetti, A., Dallatomasina, A. and Bersanelli, M. 2016. Everolimus in the management of metastatic renal cell carcinoma: an evidence-based review of its place in therapy. *Core Evidence*. **11**, pp.23–36.

Butkinaree, C., Cheung, W.D., Park, S., Park, K., Barber, M. and Hart, G.W. 2008. Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*. **283**(35), pp.23557–23566.

Cai, C., Yu, H., Huang, G., Du, X., Yu, X., Zhou, Y. and Shen, W. 2018. Histone modifications in fatty acid synthase modulated by carbohydrate responsive element binding protein are associated with non-alcoholic fatty liver disease. *International Journal of Molecular Medicine*. **42**(3), pp.1215–1228.

Cai, Y., Wang, J., Zhang, Lin, Wu, D., Yu, D., Tian, X., Liu, J., Jiang, X., Shen, Y., Zhang, Lihua, Ren, M. and Huang, P. 2015. Expressions of fatty acid synthase and HER2 are correlated with poor prognosis of ovarian cancer. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*. **32**(1), p.391.

Caldwell, S.A., Jackson, S.R., Shahriari, K.S., Lynch, T.P., Sethi, G., Walker, S., Vosseller, K. and Reginato, M.J. 2010. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene*. **29**(19), pp.2831–2842.

Calvisi, D.F., Wang, C., Ho, C., Ladu, S., Lee, S.A., Mattu, S., Destefanis, G., Delogu, S., Zimmermann, A., Ericsson, J., Brozzetti, S., Staniscia, T., Chen, X., Dombrowski, F. and Evert, M. 2011. Increased lipogenesis, induced by AKT-mTORC1-RPS6 signaling, promotes development of human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. **140**(3), pp.1071–1083.

Capotosti, F., Guernier, S., Lammers, F., Waridel, P., Cai, Y., Jin, J., Conaway, J.W., Conaway, R.C. and Herr, W. 2011. O-GlcNAc transferase catalyzes site-specific proteolysis of HCF-1. *Cell*. **144**(3), pp.376–388.

Carpenter, R., DiChiacchio, T. and Barker, K. 2019. Interventions for self-management of type 2 diabetes: An integrative review. *International Journal of Nursing Sciences*. **6**(1), pp.70–91.

Castilla, L.H. 2020. NRAS palmitoylation and oncogenic fitness. *Blood*. **135**(20), pp.1725–1726.

Cekic, N., Heinonen, J.E., Stubbs, K.A., Roth, C., He, Y., Bennet, A.J., McEachern, E.J., Davies, G.J. and Vocadlo, D.J. 2016. Analysis of transition state mimicry by tight binding aminothiazoline inhibitors provides insight into catalysis by human O-GlcNAcase. *Chemical Science*. **7**(6), pp.3742–3750.

Chakravarthy, M.V., Zhu, Y., López, M., Yin, L., Wozniak, D.F., Coleman, T., Hu, Z., Wolfgang, M., Vidal-Puig, A., Lane, M.D. and Semenkovich, C.F. 2007. Brain fatty acid synthase activates PPARα to maintain energy homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*. **117**(9), pp.2539–2552.

Champattanachai, V., Marchase, R.B. and Chatham, J.C. 2008. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. **294**(6), pp.C1509-1520.

Champattanachai, V., Marchase, R.B. and Chatham, J.C. 2007. Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. **292**(1), pp.C178-187.

Che, L., Pilo, M.G., Cigliano, A., Latte, G., Simile, M.M., Ribback, S., Dombrowski, F., Evert, M., Chen, X. and Calvisi, D.F. 2017. Oncogene dependent requirement of fatty acid synthase in hepatocellular carcinoma. *Cell Cycle*. **16**(6), pp.499–507.

Chen, P.-H., Chi, J.-T. and Boyce, M. 2018. Functional crosstalk among oxidative stress and O-GlcNAc signaling pathways. *Glycobiology*. **28**(8), pp.556–564.

Chen, P.L., Riley, D.J., Chen, Y. and Lee, W.H. 1996. Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes & Development*. **10**(21), pp.2794–2804.

Chetan, M.R., Charlton, M.H., Thompson, C., Dias, R.P., Andrews, R.C. and Narendran, P. 2019. The Type 1 diabetes 'honeymoon' period is five times longer in men who exercise: a case–control study. *Diabetic Medicine*. **36**(1), pp.127–128.

Cheung, W.D. and Hart, G.W. 2008. AMP-activated Protein Kinase and p38 MAPK Activate O-GlcNAcylation of Neuronal Proteins during Glucose Deprivation. *Journal of Biological Chemistry*. **283**(19), pp.13009–13020.

Chew, V., Lai, L., Pan, L., Lim, C.J., Li, J., Ong, R., Chua, C., Leong, J.Y., Lim, K.H., Toh, H.C., Lee, S.Y., Chan, C.Y., Goh, B.K.P., Chung, A., Chow, P.K.H. and Albani, S. 2017. Delineation of an

immunosuppressive gradient in hepatocellular carcinoma using high-dimensional proteomic and transcriptomic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **114**(29), pp.E5900–E5909.

Chirala, S.S., Chang, H., Matzuk, M., Abu-Elheiga, L., Mao, J., Mahon, K., Finegold, M. and Wakil, S.J. 2003. Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: Fatty acid synthase null mutants and most of the heterozygotes die in utero. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**(11), pp.6358–6363.

Chirala, S.S. and Wakil, S.J. 2004. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*. **39**(11), pp.1045–1053.

Choi, M.S., Jung, J.-Y., Kim, H.-J., Ham, M.R., Lee, T.R. and Shin, D.W. 2016. S-nitrosylation of fatty acid synthase regulates its activity through dimerization. *Journal of Lipid Research*. **57**(4), pp.607–615.

Choi, W.-I., Jeon, B.-N., Park, H., Yoo, J.-Y., Kim, Y.-S., Koh, D.-I., Kim, M.-H., Kim, Y.-R., Lee, C.-E., Kim, K.-S., Osborne, T.F. and Hur, M.-W. 2008. Proto-oncogene FBI-1 (Pokemon) and SREBP-1 Synergistically Activate Transcription of Fatty-acid Synthase Gene (FASN). *The Journal of Biological Chemistry*. **283**(43), pp.29341–29354.

Chou, C.F., Smith, A.J. and Omary, M.B. 1992. Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**(6), pp.3901–3906.

Chu, C.-S., Lo, P.-W., Yeh, Y.-H., Hsu, P.-H., Peng, S.-H., Teng, Y.-C., Kang, M.-L., Wong, C.-H. and Juan, L.-J. 2014. O-GlcNAcylation regulates EZH2 protein stability and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **111**(4), pp.1355–1360.

Clarke, A.R., Gledhill, S., Hooper, M.L., Bird, C.C. and Wyllie, A.H. 1994. p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene*. **9**(6), pp.1767–1773.

Cohen, D.E. and Fisher, E.A. 2013. Lipoprotein metabolism, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease. *Seminars in Liver Disease*. **33**(4), pp.380–388.

Comtesse, N., Maldener, E. and Meese, E. 2001. Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **283**(3), pp.634–640.

Cornell, R., Grove, G.L., Rothblat, G.H. and Horwitz, A.F. 1977. Lipid requirement for cell cycling. The effect of selective inhibition of lipid synthesis. *Experimental Cell Research*. **109**(2), pp.299–307.

Cui, C., Zhou, X., Zhang, W., Qu, Y. and Ke, X. 2018. Is β-Catenin a Druggable Target for Cancer Therapy? *Trends in Biochemical Sciences*. **43**(8), pp.623–634.

Dargel, C., Bassani-Sternberg, M., Hasreiter, J., Zani, F., Bockmann, J.-H., Thiele, F., Bohne, F., Wisskirchen, K., Wilde, S., Sprinzl, M.F., Schendel, D.J., Krackhardt, A.M., Uckert, W., Wohlleber, D., Schiemann, M., Stemmer, K., Heikenwälder, M., Busch, D.H., Richter, G., Mann, M. and Protzer, U. 2015. T Cells Engineered to Express a T-Cell Receptor Specific for Glypican-3 to Recognize and Kill Hepatoma Cells In Vitro and in Mice. *Gastroenterology*. **149**(4), pp.1042–1052.

Darimont, C., Avanti, O., Zbinden, I., Leone-Vautravers, P., Mansourian, R., Giusti, V. and Macé, K. 2006. Liver X receptor preferentially activates de novo lipogenesis in human preadipocytes. *Biochimie*. **88**(3–4), pp.309–318.

Darville, M.I., Antoine, I.V., Mertens-Strijthagen, J.R., Dupriez, V.J. and Rousseau, G.G. 1995. An E2F-dependent late-serum-response promoter in a gene that controls glycolysis. *Oncogene*. **11**(8), pp.1509–1517.

Datta, R., Choudhury, P., Ghosh, A. and Datta, B. 2003. A glycosylation site, 60SGTS63, of p67 is required for its ability to regulate the phosphorylation and activity of eukaryotic initiation factor 2alpha. *Biochemistry*. **42**(18), pp.5453–5460.

Dauphinee, S.M., Ma, M. and Too, C.K.L. 2005. Role of O-linked beta-N-acetylglucosamine modification in the subcellular distribution of alpha4 phosphoprotein and Sp1 in rat lymphoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. **96**(3), pp.579–588.

Davis, L.I. and Blobel, G. 1987. Nuclear pore complex contains a family of glycoproteins that includes p62: glycosylation through a previously unidentified cellular pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **84**(21), pp.7552–7556.

Dean, E.J., Falchook, G.S., Patel, M.R., Brenner, A.J., Infante, J.R., Arkenau, H.-T., Borazanci, E.H., Lopez, J.S., Pant, S., Schmid, P., Frankel, A.E., Jones, S.F., McCulloch, W., Kemble, G., O'Farrell, M. and Burris, H. 2016. Preliminary activity in the first in human study of the first-in-class fatty acid synthase (FASN) inhibitor, TVB-2640. *Journal of Clinical Oncology*. **34**(15_suppl), pp.2512–2512.

Decourcelle, A., Loison, I., Baldini, S., Leprince, D. and Dehennaut, V. 2020. Evidence of a compensatory regulation of colonic O-GlcNAc transferase and O-GlcNAcase expression in response to disruption of O-GlcNAc homeostasis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **521**(1), pp.125–130.

Dehennaut, V., Hanoulle, X., Bodart, J.-F., Vilain, J.-P., Michalski, J.-C., Landrieu, I., Lippens, G. and Lefebvre, T. 2008. Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates Xenopus oocytes M-phase entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **369**(2), pp.539–546.

Dehennaut, V., Lefebvre, T., Leroy, Y., Vilain, J.-P., Michalski, J.-C. and Bodart, J.-F. 2009. Survey of O-GlcNAc level variations in Xenopus laevis from oogenesis to early development. *Glycoconjugate Journal*. **26**(3), pp.301–311.

Dehennaut, V., Leprince, D. and Lefebvre, T. 2014. O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, and Polycomb Group Proteins. *Frontiers in Endocrinology*. **5**.

Demetri, G.D., Chawla, S.P., Ray-Coquard, I., Le Cesne, A., Staddon, A.P., Milhem, M.M., Penel, N., Riedel, R.F., Bui-Nguyen, B., Cranmer, L.D., Reichardt, P., Bompas, E., Alcindor, T., Rushing, D., Song, Y., Lee, R.-M., Ebbinghaus, S., Eid, J.E., Loewy, J.W., Haluska, F.G., Dodion, P.F. and Blay, J.-Y. 2013. Results of an international randomized phase III trial of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus versus placebo to control metastatic sarcomas in patients after benefit from prior chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **31**(19), pp.2485–2492.

Denechaud, P.-D., Lopez-Mejia, I.C. and Fajas, L. 2016. [Cell cycle regulators CDK4 and E2F1 control glucose and lipid homeostasis]. *Medecine Sciences: M/S*. **32**(10), pp.815–818.

Dentin, R., Hedrick, S., Xie, J., Yates, J. and Montminy, M. 2008. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science (New York, N.Y.)*. **319**(5868), pp.1402–1405.

Dentin, R., Tomas-Cobos, L., Foufelle, F., Leopold, J., Girard, J., Postic, C. and Ferré, P. 2012. Glucose 6-phosphate, rather than xylulose 5-phosphate, is required for the activation of ChREBP in response to glucose in the liver. *Journal of Hepatology*. **56**(1), pp.199–209.

Deplus, R., Delatte, B., Schwinn, M.K., Defrance, M., Méndez, J., Murphy, N., Dawson, M.A., Volkmar, M., Putmans, P., Calonne, E., Shih, A.H., Levine, R.L., Bernard, O., Mercher, T., Solary, E., Urh, M., Daniels, D.L. and Fuks, F. 2013. TET2 and TET3 regulate GlcNAcylation and H3K4 methylation through OGT and SET1/COMPASS. *The EMBO journal*. **32**(5), pp.645–655.

Di Tommaso, L., Destro, A., Seok, J.Y., Balladore, E., Terracciano, L., Sangiovanni, A., Iavarone, M., Colombo, M., Jang, J.J., Yu, E., Jin, S.Y., Morenghi, E., Park, Y.N. and Roncalli, M. 2009. The application of markers (HSP70 GPC3 and GS) in liver biopsies is useful for detection of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. **50**(4), pp.746–754.

Di Vizio, D., Adam, R.M., Kim, J., Kim, R., Sotgia, F., Williams, T., Demichelis, F., Solomon, K.R., Loda, M., Rubin, M.A., Lisanti, M.P. and Freeman, M.R. 2008. Caveolin-1 interacts with a lipid raft-associated population of fatty acid synthase. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. **7**(14), pp.2257–2267.

Dibble, C.C. and Manning, B.D. 2013. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nature Cell Biology*. **15**(6), pp.555–564.

Dieckmann-Schuppert, A., Bause, E. and Schwarz, R.T. 1993. Studies on O-glycans of Plasmodium-falciparum-infected human erythrocytes. Evidence for O-GlcNAc and O-GlcNAc-transferase in malaria parasites. *European Journal of Biochemistry*. **216**(3), pp.779–788.

Dobashi, Y., Shoji, M., Jiang, S.X., Kobayashi, M., Kawakubo, Y. and Kameya, T. 1998. Active cyclin A-CDK2 complex, a possible critical factor for cell proliferation in human primary lung carcinomas. *The American Journal of Pathology*. **153**(3), pp.963–972.

Dong, D.L. and Hart, G.W. 1994. Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *The Journal of Biological Chemistry*. **269**(30), pp.19321–19330.

Donnelly, K.L., Smith, C.I., Schwarzenberg, S.J., Jessurun, J., Boldt, M.D. and Parks, E.J. 2005. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of Clinical Investigation*. **115**(5), pp.1343–1351.

Donzelli, M. and Draetta, G.F. 2003. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO reports*. **4**(7), pp.671–677.

Dorfmueller, H.C., Borodkin, V.S., Schimpl, M. and van Aalten, D.M.F. 2009. GlcNAcstatins are nanomolar inhibitors of human O-GlcNAcase inducing cellular hyper-O-GlcNAcylation. *The Biochemical Journal*. **420**(2), pp.221–227.

Drougat, L., Olivier-Van Stichelen, S., Mortuaire, M., Foulquier, F., Lacoste, A.-S., Michalski, J.-C., Lefebvre, T. and Vercoutter-Edouart, A.-S. 2012. Characterization of O-GlcNAc cycling and

proteomic identification of differentially O-GlcNAcylated proteins during G1/S transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1820**(12), pp.1839–1848.

Du, X.L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I.G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J. and Brownlee, M. 2000. 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 of the United States of America*. **97**(22), pp.12222–12226.

Dupas, T., Denis, M., Dontaine, J., Persello, A., Bultot, L., Erraud, A., Vertommen, D., Bouchard, B., Tessier, A., Rivière, M., Lebreton, J., Bigot-Corbel, E., Montnach, J., De Waard, M., Gauthier, C., Burelle, Y., Olson, A.K., Rozec, B., Des Rosiers, C., Bertrand, L., Issad, T. and Lauzier, B. 2021. Protein O-GlcNAcylation levels are regulated independently of dietary intake in a tissue and time-specific manner during rat postnatal development. *Acta Physiologica (Oxford, England)*. **231**(3), p.e13566.

Durning, S.P., Flanagan-Steet, H., Prasad, N. and Wells, L. 2016. O-Linked β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Acts as a Glucose Sensor to Epigenetically Regulate the Insulin Gene in Pancreatic Beta Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **291**(5), pp.2107–2118.

Düvel, K., Yecies, J.L., Menon, S., Raman, P., Lipovsky, A.I., Souza, A.L., Triantafellow, E., Ma, Q., Gorski, R., Cleaver, S., Vander Heiden, M.G., MacKeigan, J.P., Finan, P.M., Clish, C.B., Murphy, L.O. and Manning, B.D. 2010. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Molecular Cell*. **39**(2), pp.171–183.

Eberlé, D., Hegarty, B., Bossard, P., Ferré, P. and Foufelle, F. 2004. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. **86**(11), pp.839–848.

Elbatrawy, A.A., Kim, E.J. and Nam, G. 2020. O-GlcNAcase: Emerging Mechanism, Substrate Recognition and Small-Molecule Inhibitors. *ChemMedChem*. **15**(14), pp.1244–1257.

El-Khoueiry, A.B., Sangro, B., Yau, T., Crocenzi, T.S., Kudo, M., Hsu, C., Kim, T.-Y., Choo, S.-P., Trojan, J., Welling, T.H., Meyer, T., Kang, Y.-K., Yeo, W., Chopra, A., Anderson, J., Dela Cruz, C., Lang, L., Neely, J., Tang, H., Dastani, H.B. and Melero, I. 2017. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet (London, England)*. **389**(10088), pp.2492–2502.

El-Serag, H.B. 2011. Hepatocellular carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. **365**(12), pp.1118–1127.

Espenshade, P.J. 2006. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *Journal of Cell Science*. **119**(Pt 6), pp.973–976.

Estes, C., Razavi, H., Loomba, R., Younossi, Z. and Sanyal, A.J. 2018. Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. **67**(1), pp.123–133.

European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu and European Association for the Study of the Liver 2018. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. **69**(1), pp.182–236.

Faergeman, N.J. and Knudsen, J. 1997. Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *The Biochemical Journal*. **323 (Pt 1)**, pp.1–12.

Faes, S. and Dormond, O. 2015. PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. **16**(9), pp.21138–21152.

Fajas, L., Annicotte, J.-S., Miard, S., Sarruf, D., Watanabe, M. and Auwerx, J. 2004. Impaired pancreatic growth, β cell mass, and β cell function in E2F1 –/– mice. *Journal of Clinical Investigation*. **113**(9), pp.1288–1295.

Fajas, L., Egler, V., Reiter, R., Hansen, J., Kristiansen, K., Debril, M.-B., Miard, S. and Auwerx, J. 2002. The Retinoblastoma-Histone Deacetylase 3 Complex Inhibits PPARγ and Adipocyte Differentiation. *Developmental Cell*. **3**(6), pp.903–910.

Fajas, L., Landsberg, R.L., Huss-Garcia, Y., Sardet, C., Lees, J.A. and Auwerx, J. 2002. E2Fs regulate adipocyte differentiation. *Developmental Cell*. **3**(1), pp.39–49.

Fan, Q., Aksoy, O., Wong, R.A., Ilkhanizadeh, S., Novotny, C.J., Gustafson, W.C., Truong, A.Y.-Q., Cayanan, G., Simonds, E.F., Haas-Kogan, D., Phillips, J.J., Nicolaides, T., Okaniwa, M., Shokat, K.M. and Weiss, W.A. 2017. A Kinase Inhibitor Targeted to mTORC1 Drives Regression in Glioblastoma. *Cancer Cell*. **31**(3), pp.424–435.

Feng, D., Youn, D.Y., Zhao, X., Gao, Y., Quinn, W.J., Xiaoli, A.M., Sun, Y., Birnbaum, M.J., Pessin, J.E. and Yang, F. 2015. mTORC1 Down-Regulates Cyclin-Dependent Kinase 8 (CDK8) and Cyclin C (CycC). *PloS One*. **10**(6), p.e0126240.

Ferrer, C.M., Lynch, T.P., Sodi, V.L., Falcone, J.N., Schwab, L.P., Peacock, D.L., Vocadlo, D.J., Seagroves, T.N. and Reginato, M.J. 2014. O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Molecular Cell*. **54**(5), pp.820–831.

Fingar, D.C., Richardson, C.J., Tee, A.R., Cheatham, L., Tsou, C. and Blenis, J. 2004. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and Cellular Biology*. **24**(1), pp.200–216.

Finlay, C.A. 1993. The mdm-2 oncogene can overcome wild-type p53 suppression of transformed cell growth. *Molecular and Cellular Biology*. **13**(1), pp.301–306.

Finn, R.S., Qin, S., Ikeda, M., Galle, P.R., Ducreux, M., Kim, T.-Y., Kudo, M., Breder, V., Merle, P., Kaseb, A.O., Li, D., Verret, W., Xu, D.-Z., Hernandez, S., Liu, J., Huang, C., Mulla, S., Wang, Y., Lim, H.Y., Zhu, A.X., Cheng, A.-L., and IMbrave150 Investigators 2020. Atezolizumab plus Bevacizumab in Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. **382**(20), pp.1894–1905.

Fiorentino, M., Zadra, G., Palescandolo, E., Fedele, G., Bailey, D., Fiore, C., Nguyen, P.L., Migita, T., Zamponi, R., Di Vizio, D., Priolo, C., Sharma, C., Xie, W., Hemler, M.E., Mucci, L., Giovannucci, E., Finn, S. and Loda, M. 2008. Overexpression of fatty acid synthase is associated with palmitoylation of Wnt1 and cytoplasmic stabilization of beta-catenin in prostate cancer. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. **88**(12), pp.1340–1348.

Floris, A., Mazarei, M., Yang, X., Robinson, A.E., Zhou, J., Barberis, A., D'hallewin, G., Azara, E., Spissu, Y., Iglesias-Ara, A., Orrù, S. and Tomasi, M.L. 2020. SUMOylation Protects FASN Against Proteasomal Degradation in Breast Cancer Cells Treated with Grape Leaf Extract. *Biomolecules*. **10**(4).

Forner, A., Reig, M. and Bruix, J. 2018. Hepatocellular carcinoma. *Lancet (London, England)*. **391**(10127), pp.1301–1314.

Francisco, H., Kollins, K., Varghis, N., Vocadlo, D., Vosseller, K. and Gallo, G. 2009. O-GLcNAc post-translational modifications regulate the entry of neurons into an axon branching program. *Developmental Neurobiology*. **69**(2–3), pp.162–173.

Furuta, E., Pai, S.K., Zhan, R., Bandyopadhyay, S., Watabe, M., Mo, Y.-Y., Hirota, S., Hosobe, S., Tsukada, T., Miura, K., Kamada, S., Saito, K., Iiizumi, M., Liu, W., Ericsson, J. and Watabe, K. 2008. Fatty Acid Synthase Gene Is Up-regulated by Hypoxia via Activation of Akt and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1. *Cancer Research*. **68**(4), pp.1003–1011.

Galaktionov, K., Chen, X. and Beach, D. 1996. Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*. **382**(6591), pp.511–517.

Gallaway, M.S., Henley, S.J., Steele, C.B., Momin, B., Thomas, C.C., Jamal, A., Trivers, K.F., Singh, S.D. and Stewart, S.L. 2018. Surveillance for Cancers Associated with Tobacco Use - United States, 2010-2014. *Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance Summaries (Washington, D.C.: 2002)*. **67**(12), pp.1–42.

Gandhi, L., Bahleda, R., Tolaney, S.M., Kwak, E.L., Cleary, J.M., Pandya, S.S., Hollebecque, A., Abbas, R., Ananthakrishnan, R., Berkenblit, A., Krygowski, M., Liang, Y., Turnbull, K.W., Shapiro, G.I. and Soria, J.-C. 2014. Phase I study of neratinib in combination with temsirolimus in patients with human epidermal growth factor receptor 2-dependent and other solid tumors. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **32**(2), pp.68–75.

Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S. and Jiang, X. 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(18), pp.12297–12305.

Gao, X.-L., Li, J.-Q., Dong, Y.-T., Cheng, E.-J., Gong, J.-N., Qin, Y.-L., Huang, Y.-Q., Yang, J.-J., Wang, S.-J. and An, D.-D. 2018. Upregulation of microRNA-335-5p reduces inflammatory responses by inhibiting FASN through the activation of AMPK/ULK1 signaling pathway in a septic mouse model. *Cytokine*. **110**, pp.466–478.

Gao, Y., Lin, L.-P., Zhu, C.-H., Chen, Y., Hou, Y.-T. and Ding, J. 2006. Growth arrest induced by C75, A fatty acid synthase inhibitor, was partially modulated by p38 MAPK but not by p53 in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*. **5**(8), pp.978–985.

Gao, Y., Miyazaki, J. and Hart, G.W. 2003. The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **415**(2), pp.155–163.

Gao, Y., Miyazaki, J.-I. and Hart, G.W. 2003. The transcription factor PDX-1 is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 β-cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **415**(2), pp.155–163.

Gao, Y., Wells, L., Comer, F.I., Parker, G.J. and Hart, G.W. 2001. Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: CLONING AND CHARACTERIZATION OF A NEUTRAL, CYTOSOLIC -N-

ACETYLGLUCOSAMINIDASE FROM HUMAN BRAIN. *Journal of Biological Chemistry*. **276**(13), pp.9838–9845.

Gewinner, C., Hart, G., Zachara, N., Cole, R., Beisenherz-Huss, C. and Groner, B. 2004. The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**(5), pp.3563–3572.

Gloster, T.M., Zandberg, W.F., Heinonen, J.E., Shen, D.L., Deng, L. and Vocadlo, D.J. 2011. Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nature Chemical Biology*. **7**(3), pp.174–181.

Goldberg, H., Whiteside, C. and Fantus, I.G. 2011. O-linked β-N-acetylglucosamine supports p38 MAPK activation by high glucose in glomerular mesangial cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. **301**(4), pp.E713-726.

Goldberg, H.J., Scholey, J. and Fantus, I.G. 2000. Glucosamine activates the plasminogen activator inhibitor 1 gene promoter through Sp1 DNA binding sites in glomerular mesangial cells. *Diabetes*. **49**(5), pp.863–871.

Golks, A., Tran, T.-T.T., Goetschy, J.F. and Guerini, D. 2007. Requirement for O-linked N-acetylglucosaminyltransferase in lymphocytes activation. *The EMBO journal*. **26**(20), pp.4368–4379.

Gonzalez-Salinas, F., Rojo, R., Martinez-Amador, C., Herrera-Gamboa, J. and Trevino, V. 2020. Transcriptomic and cellular analyses of CRISPR/Cas9-mediated edition of FASN show inhibition of aggressive characteristics in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **529**(2), pp.321–327.

Gorelik, A., Bartual, S.G., Borodkin, V.S., Varghese, J., Ferenbach, A.T. and van Aalten, D.M.F. 2019. Genetic recoding to dissect the roles of site-specific protein O-GlcNAcylation. *Nature Structural & Molecular Biology*. **26**(11), pp.1071–1077.

Goto, Y., Hayashi, R., Kang, D. and Yoshida, K. 2006. Acute loss of transcription factor E2F1 induces mitochondrial biogenesis in HeLa cells. *Journal of Cellular Physiology*. **209**(3), pp.923–934.

Grabiner, B.C., Nardi, V., Birsoy, K., Possemato, R., Shen, K., Sinha, S., Jordan, A., Beck, A.H. and Sabatini, D.M. 2014. A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discovery*. **4**(5), pp.554–563.

Graeber, M.B., Kupke, K.G. and Müller, U. 1992. Delineation of the dystonia-parkinsonism syndrome locus in Xq13. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **89**(17), pp.8245–8248.

Graner, E., Tang, D., Rossi, S., Baron, A., Migita, T., Weinstein, L.J., Lechpammer, M., Huesken, D., Zimmermann, J., Signoretti, S. and Loda, M. 2004. The isopeptidase USP2a regulates the stability of fatty acid synthase in prostate cancer. *Cancer Cell*. **5**(3), pp.253–261.

Greenblatt, M.S., Bennett, W.P., Hollstein, M. and Harris, C.C. 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*. **54**(18), pp.4855–4878.

Greis, K.D., Gibson, W. and Hart, G.W. 1994. Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (UL32) at serine 921 and serine 952. *Journal of Virology*. **68**(12), pp.8339–8349.

Gross, B.J., Kraybill, B.C. and Walker, S. 2005. Discovery of O-GlcNAc transferase inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*. **127**(42), pp.14588–14589.

Groussaud, D., Khair, M., Tollenaere, A.I., Waast, L., Kuo, M.-S., Mangeney, M., Martella, C., Fardini, Y., Coste, S., Souidi, M., Benit, L., Pique, C. and Issad, T. 2017. Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription. *PLoS pathogens*. **13**(7), p.e1006518.

Groves, J.A., Lee, A., Yildirir, G. and Zachara, N.E. 2013. Dynamic O-GlcNAcylation and its roles in the cellular stress response and homeostasis. *Cell Stress & Chaperones*. **18**(5), pp.535–558.

Gu, Y., Gao, J., Han, C., Zhang, X., Liu, H., Ma, L., Sun, X. and Yu, W. 2014. O-GlcNAcylation is increased in prostate cancer tissues and enhances malignancy of prostate cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. **10**(2), pp.897–904.

Gu, Y., Mi, W., Ge, Y., Liu, H., Fan, Q., Han, C., Yang, J., Han, F., Lu, X. and Yu, W. 2010. GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Research*. **70**(15), pp.6344–6351.

Gudala, K., Bansal, D., Schifano, F. and Bhansali, A. 2013. Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *Journal of Diabetes Investigation*. **4**(6), pp.640–650.

Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J. and Sabatini, D.M. 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Developmental Cell*. **11**(6), pp.859–871.

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. 2012. Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*. **44**(6), pp.694–698.

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. 2011a. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes*. **60**(5), pp.1399–1413.

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. 2011b. O-GlcNAcylation increases ChREBP protein content and transcriptional activity in the liver. *Diabetes*. **60**(5), pp.1399–1413.

Guinez, C., Lemoine, J., Michalski, J.-C. and Lefebvre, T. 2004. 70-kDa-heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **319**(1), pp.21–26.

Guinez, C., Mir, A.-M., Leroy, Y., Cacan, R., Michalski, J.-C. and Lefebvre, T. 2007. Hsp70-GlcNAc-binding activity is released by stress, proteasome inhibition, and protein misfolding. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **361**(2), pp.414–420.

Ha, J.R., Hao, L., Venkateswaran, G., Huang, Y.H., Garcia, E. and Persad, S. 2014. β-catenin is O-GlcNAc glycosylated at Serine 23: implications for β-catenin's subcellular localization and transactivator function. *Experimental Cell Research*. **321**(2), pp.153–166.

Halim, A., Larsen, I.S.B., Neubert, P., Joshi, H.J., Petersen, B.L., Vakhrushev, S.Y., Strahl, S. and Clausen, H. 2015. Discovery of a nucleocytoplasmic O-mannose glycoproteome in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **112**(51), pp.15648–15653.

Hall, M. and Peters, G. 1996. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Advances in Cancer Research*. **68**, pp.67–108.

Haltiwanger, R.S., Blomberg, M.A. and Hart, G.W. 1992. Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. **267**(13), pp.9005–9013.

Haltiwanger, R.S., Grove, K. and Philipsberg, G.A. 1998. Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *The Journal of Biological Chemistry*. **273**(6), pp.3611–3617.

Haltiwanger, R.S., Holt, G.D. and Hart, G.W. 1990. Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. **265**(5), pp.2563–2568.

Han, I. and Kudlow, J.E. 1997. Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Molecular and Cellular Biology*. **17**(5), pp.2550–2558.

Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B. and Hannan, R.D. 2003. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Molecular and Cellular Biology*. **23**(23), pp.8862–8877.

Hanover, J.A., Forsythe, M.E., Hennessey, P.T., Brodigan, T.M., Love, D.C., Ashwell, G. and Krause, M. 2005. A Caenorhabditis elegans model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**(32), pp.11266–11271.

Hanse, E.A., Mashek, D.G., Becker, J.R., Solmonson, A.D., Mullany, L.K., Mashek, M.T., Towle, H.C., Chau, A.T. and Albrecht, J.H. 2012. Cyclin D1 inhibits hepatic lipogenesis via repression of carbohydrate response element binding protein and hepatocyte nuclear factor 4α. *Cell Cycle*. **11**(14), pp.2681–2690.

Hao, Q., Li, T., Zhang, X., Gao, P., Qiao, P., Li, S. and Geng, Z. 2014. Expression and roles of fatty acid synthase in hepatocellular carcinoma. *Oncology Reports*. **32**(6), pp.2471–2476.

Hara, K., Yonezawa, K., Kozlowski, M.T., Sugimoto, T., Andrabi, K., Weng, Q.P., Kasuga, M., Nishimoto, I. and Avruch, J. 1997. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**(42), pp.26457–26463.

Hardie, D.G., Ross, F.A. and Hawley, S.A. 2012. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **13**(4), pp.251–262.

Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M. and Ron, D. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Molecular Cell*. **6**(5), pp.1099–1108.

Harding, H.P., Zhang, Y. and Ron, D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. **397**(6716), pp.271–274.

Hardivillé, S., Banerjee, P.S., Selen Alpergin, E.S., Smith, D.M., Han, G., Ma, J., Talbot, C.C., Hu, P., Wolfgang, M.J. and Hart, G.W. 2020. TATA-Box Binding Protein O-GlcNAcylation at T114 Regulates Formation of the B-TFIID Complex and Is Critical for Metabolic Gene Regulation. *Molecular Cell*. **77**(5), pp.1143-1152.e7.

Hardivillé, S. and Hart, G.W. 2014. Nutrient Regulation of Signaling, Transcription, and Cell Physiology by O-GlcNAcylation. *Cell Metabolism*. **20**(2), pp.208–213.

Harosh-Davidovich, S.B. and Khalaila, I. 2018. O-GlcNAcylation affects β-catenin and E-cadherin expression, cell motility and tumorigenicity of colorectal cancer. *Experimental Cell Research*. **364**(1), pp.42–49.

Hart, G.W., Housley, M.P. and Slawson, C. 2007. Cycling of O-linked β-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*. **446**(7139), pp.1017–1022.

Hastings, N.B., Wang, X., Song, L., Butts, B.D., Grotz, D., Hargreaves, R., Fred Hess, J., Hong, K.-L.K., Huang, C.R.-R., Hyde, L., Laverty, M., Lee, J., Levitan, D., Lu, S.X., Maguire, M., Mahadomrongkul, V., McEachern, E.J., Ouyang, X., Rosahl, T.W., Selnick, H., Stanton, M., Terracina, G., Vocadlo, D.J., Wang, G., Duffy, J.L., Parker, E.M. and Zhang, L. 2017. Inhibition of O-GlcNAcase leads to elevation of O-GlcNAc tau and reduction of tauopathy and cerebrospinal fluid tau in rTg4510 mice. *Molecular Neurodegeneration*. **12**(1), p.39.

Hawkins, M., Barzilai, N., Liu, R., Hu, M., Chen, W. and Rossetti, L. 1997. Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*. **99**(9), pp.2173–2182.

Hayden, M.S. and Ghosh, S. 2004. Signaling to NF-κB. *Genes & Development*. **18**(18), pp.2195–2224.

He, L., Gomes, A.P., Wang, X., Yoon, S.O., Lee, G., Nagiec, M.J., Cho, S., Chavez, A., Islam, T., Yu, Y., Asara, J.M., Kim, B.Y. and Blenis, J. 2018. mTORC1 Promotes Metabolic Reprogramming by the Suppression of GSK3-Dependent Foxk1 Phosphorylation. *Molecular Cell*. **70**(5), pp.949-960.e4.

He, Q., Luo, J., Wu, J., Yao, W., Li, Z., Wang, H. and Xu, H. 2020. FoxO1 Knockdown Promotes Fatty Acid Synthesis via Modulating SREBP1 Activities in the Dairy Goat Mammary Epithelial Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **68**(43), pp.12067–12078.

Hensley, C.T., Wasti, A.T. and DeBerardinis, R.J. 2013. Glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. *The Journal of Clinical Investigation*. **123**(9), pp.3678–3684.

Hess, G., Herbrecht, R., Romaguera, J., Verhoef, G., Crump, M., Gisselbrecht, C., Laurell, A., Offner, F., Strahs, A., Berkenblit, A., Hanushevsky, O., Clancy, J., Hewes, B., Moore, L. and Coiffier, B. 2009. Phase III study to evaluate temsirolimus compared with investigator's choice therapy for the treatment of relapsed or refractory mantle cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **27**(23), pp.3822–3829.

Holt, G.D., Haltiwanger, R.S., Torres, C.R. and Hart, G.W. 1987. Erythrocytes contain cytoplasmic glycoproteins. O-linked GlcNAc on Band 4.1. *The Journal of Biological Chemistry*. **262**(31), pp.14847–14850.

Horie, Y., Suzuki, A., Kataoka, E., Sasaki, T., Hamada, K., Sasaki, J., Mizuno, K., Hasegawa, G., Kishimoto, H., Iizuka, M., Naito, M., Enomoto, K., Watanabe, S., Mak, T.W. and Nakano, T. 2004. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *The Journal of Clinical Investigation*. **113**(12), pp.1774–1783.

Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., Miura, Y., Iemura, S., Natsume, T., Takehana, K., Yamada, N., Guan, J.-L., Oshiro, N. and Mizushima, N. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell*. **20**(7), pp.1981–1991.

Housley, M.P., Rodgers, J.T., Udeshi, N.D., Kelly, T.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Puigserver, P. and Hart, G.W. 2008. O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *The Journal of Biological Chemistry*. **283**(24), pp.16283–16292.

Howerton, C.L., Morgan, C.P., Fischer, D.B. and Bale, T.L. 2013. O-GlcNAc transferase (OGT) as a placental biomarker of maternal stress and reprogramming of CNS gene transcription in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **110**(13), pp.5169–5174.

Hu, J., Wang, Y., Zhao, S., Chen, J., Jin, S., Jia, P. and Ding, X. 2018. Remote Ischemic Preconditioning Ameliorates Acute Kidney Injury due to Contrast Exposure in Rats through Augmented O-GlcNAcylation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2018**, p.4895913.

Huang, X., Pan, Q., Sun, D., Chen, W., Shen, A., Huang, M., Ding, J. and Geng, M. 2013. O-GlcNAcylation of cofilin promotes breast cancer cell invasion. *The Journal of Biological Chemistry*. **288**(51), pp.36418–36425.

Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., Kovacevic, Z., Lesovoy, V., Schmidt-Wolf, I.G.H., Barbarash, O., Gokmen, E., O'Toole, T., Lustgarten, S., Moore, L., Motzer, R.J., and Global ARCC Trial 2007. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine*. **356**(22), pp.2271–2281.

Hudgins, L.C., Hellerstein, M., Seidman, C., Neese, R., Diakun, J. and Hirsch, J. 1996. Human fatty acid synthesis is stimulated by a eucaloric low fat, high carbohydrate diet. *The Journal of Clinical Investigation*. **97**(9), pp.2081–2091.

Humphrey, S.J., Yang, G., Yang, P., Fazakerley, D.J., Stöckli, J., Yang, J.Y. and James, D.E. 2013. Dynamic adipocyte phosphoproteome reveals that Akt directly regulates mTORC2. *Cell Metabolism*. **17**(6), pp.1009–1020.

Hwang, Y., Kim, L.C., Song, W., Edwards, D.N., Cook, R.S. and Chen, J. 2019. Disruption of the Scaffolding Function of mLST8 Selectively Inhibits mTORC2 Assembly and Function and Suppresses mTORC2-Dependent Tumor Growth In Vivo. *Cancer Research*. **79**(13), pp.3178–3184.

Iizuka, K., Bruick, R.K., Liang, G., Horton, J.D. and Uyeda, K. 2004. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**(19), pp.7281–7286.

Innocenzi, D., Alò, P.L., Balzani, A., Sebastiani, V., Silipo, V., La Torre, G., Ricciardi, G., Bosman, C. and Calvieri, S. 2003. Fatty acid synthase expression in melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology*. **30**(1), pp.23–28.

Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J. and Guan, K.-L. 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*. **4**(9), pp.648–657.

Irniger, S. 2002. Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20. *FEBS letters*. **532**(1–2), pp.7–11.

Ishibashi, M., Filomenko, R., Rébé, C., Chevriaux, A., Varin, A., Derangère, V., Bessède, G., Gambert, P., Lagrost, L. and Masson, D. 2013. Knock-down of the oxysterol receptor LXRα impairs cholesterol efflux in human primary macrophages: lack of compensation by LXRβ activation. *Biochemical Pharmacology*. **86**(1), pp.122–129.

Israelsen, W.J., Dayton, T.L., Davidson, S.M., Fiske, B.P., Hosios, A.M., Bellinger, G., Li, J., Yu, Y., Sasaki, M., Horner, J.W., Burga, L.N., Xie, J., Jurczak, M.J., DePinho, R.A., Clish, C.B., Jacks, T., Kibbey, R.G., Wulf, G.M., Di Vizio, D., Mills, G.B., Cantley, L.C. and Vander Heiden, M.G. 2013. PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. *Cell*. **155**(2), pp.397–409.

Issad, T. and Kuo, M. 2008. O-GlcNAc modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. **19**(10), pp.380–389.

Itkonen, H.M., Gorad, S.S., Duveau, D.Y., Martin, S.E.S., Barkovskaya, A., Bathen, T.F., Moestue, S.A. and Mills, I.G. 2016. Inhibition of O-GlcNAc transferase activity reprograms prostate cancer cell metabolism. *Oncotarget*. **7**(11), pp.12464–12476.

Itkonen, H.M., Minner, S., Guldvik, I.J., Sandmann, M.J., Tsourlakis, M.C., Berge, V., Svindland, A., Schlomm, T. and Mills, I.G. 2013. O-GlcNAc Transferase Integrates Metabolic Pathways to Regulate the Stability of c-MYC in Human Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*. **73**(16), pp.5277–5287.

Itkonen, H.M., Poulose, N., Steele, R.E., Martin, S.E.S., Levine, Z.G., Duveau, D.Y., Carelli, R., Singh, R., Urbanucci, A., Loda, M., Thomas, C.J., Mills, I.G. and Walker, S. 2020. Inhibition of O-GlcNAc Transferase Renders Prostate Cancer Cells Dependent on CDK9. *Molecular cancer research: MCR*. **18**(10), pp.1512–1521.

Itkonen, H.M., Urbanucci, A., Martin, S.E., Khan, A., Mathelier, A., Thiede, B., Walker, S. and Mills, I.G. 2019. High OGT activity is essential for MYC-driven proliferation of prostate cancer cells. *Theranostics*. **9**(8), pp.2183–2197.

Jackson, S.P. and Tjian, R. 1988. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell*. **55**(1), pp.125–133.

Jacobsen, S.E., Binkowski, K.A. and Olszewski, N.E. 1996. SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**(17), pp.9292–9296.

Jakobsson, A., Westerberg, R. and Jacobsson, A. 2006. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research*. **45**(3), pp.237–249.

Janetzko, J. and Walker, S. 2014. The Making of a Sweet Modification: Structure and Function of O-GlcNAc Transferase. *The Journal of Biological Chemistry*. **289**(50), pp.34424–34432.

Jang, I., Kim, H.B., Seo, H., Kim, J.Y., Choi, H., Yoo, J.S., Kim, J. and Cho, J.W. 2015. O-GlcNAcylation of eIF2α regulates the phospho-eIF2α-mediated ER stress response. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1853**(8), pp.1860–1869.

Jayakumar, A., Tai, M.H., Huang, W.Y., al-Feel, W., Hsu, M., Abu-Elheiga, L., Chirala, S.S. and Wakil, S.J. 1995. Human fatty acid synthase: properties and molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **92**(19), pp.8695–8699.

Jefferies, H.B., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B. and Thomas, G. 1997. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *The EMBO journal*. **16**(12), pp.3693–3704.

Jensen-Urstad, A.P.L., Song, H., Lodhi, I.J., Funai, K., Yin, L., Coleman, T. and Semenkovich, C.F. 2013. Nutrient-dependent phosphorylation channels lipid synthesis to regulate PPARα. *Journal of Lipid Research*. **54**(7), pp.1848–1859.

Jiang, J., Lazarus, M.B., Pasquina, L., Sliz, P. and Walker, S. 2011. A Neutral Diphosphate Mimic Crosslinks the Active Site of Human O-GlcNAc Transferase. *Nature chemical biology*. **8**(1), pp.72–77.

Jiang, M., Qiu, Z., Zhang, S., Fan, X., Cai, X., Xu, B., Li, X., Zhou, J., Zhang, X., Chu, Y., Wang, W., Liang, J., Horvath, T., Yang, X., Wu, K., Nie, Y. and Fan, D. 2016. Elevated O-GlcNAcylation promotes gastric cancer cells proliferation by modulating cell cycle related proteins and ERK 1/2 signaling. *Oncotarget*. **7**(38), pp.61390–61402.

Jiang, M., Xu, B., Li, X., Shang, Y., Chu, Y., Wang, W., Chen, D., Wu, N., Hu, S., Zhang, S., Li, M., Wu, K., Yang, X., Liang, J., Nie, Y. and Fan, D. 2019. O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer metastasis via the miR-101-O-GlcNAc/EZH2 regulatory feedback circuit. *Oncogene*. **38**(3), pp.301–316.

Jiang, Y., Li, X., Yang, W., Hawke, D.H., Zheng, Y., Xia, Y., Aldape, K., Wei, C., Guo, F., Chen, Y. and Lu, Z. 2014. PKM2 regulates chromosome segregation and mitosis progression of tumor cells. *Molecular Cell*. **53**(1), pp.75–87.

Jiang, Y., Yin, X., Wu, L., Qin, Q. and Xu, J. 2017. MAPK/P53-mediated FASN expression in bone tumors. *Oncology Letters*. **13**(6), pp.4035–4038.

Jin, L., Gao, F., Jiang, T., Liu, B., Li, C., Qin, X. and Zheng, Q. 2021. Hyper-O-GlcNAcylation impairs insulin response against reperfusion-induced myocardial injury and arrhythmias in obesity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **558**, pp.126–133.

Jin, L., Yuan, F., Dai, G., Yao, Q., Xiang, H., Wang, L., Xue, B., Shan, Y. and Liu, X. 2020. Blockage of O-linked GlcNAcylation induces AMPK-dependent autophagy in bladder cancer cells. *Cellular & Molecular Biology Letters*. **25**, p.17.

Jin, Q., Yuan, L.X., Boulbes, D., Baek, J.M., Wang, Y.N., Gomez-Cabello, D., Hawke, D.H., Yeung, S.C., Lee, M.H., Hortobagyi, G.N., Hung, M.C. and Esteva, F.J. 2010. Fatty acid synthase phosphorylation: a novel therapeutic target in HER2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer Research : BCR*. **12**(6), p.R96.

Joiner, C.M., Li, H., Jiang, J. and Walker, S. 2019. Structural characterization of the O-GlcNAc cycling enzymes: insights into substrate recognition and catalytic mechanisms. *Current opinion in structural biology*. **56**, pp.97–106.

Jones, D.R., Keune, W.-J., Anderson, K.E., Stephens, L.R., Hawkins, P.T. and Divecha, N. 2014. The hexosamine biosynthesis pathway and O-GlcNAcylation maintain insulin-stimulated PI3K-PKB phosphorylation and tumour cell growth after short-term glucose deprivation. *The FEBS journal*. **281**(16), pp.3591–3608.

Jones, R.G., Plas, D.R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., Xu, Y., Birnbaum, M.J. and Thompson, C.B. 2005. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular Cell*. **18**(3), pp.283–293.

Jones, S.M. and Kazlauskas, A. 2001. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. *Chemical Reviews*. **101**(8), pp.2413–2423.

Jones, S.P., Zachara, N.E., Ngoh, G.A., Hill, B.G., Teshima, Y., Bhatnagar, A., Hart, G.W. and Marbán, E. 2008. Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. *Circulation*. **117**(9), pp.1172–1182.

Ju Kim, E. 2020. O-GlcNAc Transferase: Structural Characteristics, Catalytic Mechanism and Small-Molecule Inhibitors. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*. **21**(21), pp.3026–3035.

Julien, E. and Herr, W. 2003. Proteolytic processing is necessary to separate and ensure proper cell growth and cytokinesis functions of HCF-1. *The EMBO journal*. **22**(10), pp.2360–2369.

Junod, A., Lambert, A.E., Orci, L., Pictet, R., Gonet, A.E. and Renold, A.E. 1967. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*. **126**(1), pp.201–205.

Kaasik, K., Kivimäe, S., Allen, J.J., Chalkley, R.J., Huang, Y., Baer, K., Kissel, H., Burlingame, Alma.L., Shokat, K.M., Ptáček, L.J. and Fu, Y.-H. 2013. Glucose Sensor O-GlcNAcylation Coordinates with Phosphorylation to Regulate Circadian Clock. *Cell metabolism*. **17**(2), pp.291–302.

Kabashima, T., Kawaguchi, T., Wadzinski, B.E. and Uyeda, K. 2003. Xylulose 5-phosphate mediates glucose-induced lipogenesis by xylulose 5-phosphate-activated protein phosphatase in rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**(9), pp.5107–5112.

Kaelin, W.G. and Ratcliffe, P.J. 2008. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Molecular Cell*. **30**(4), pp.393–402.

Kamigaito, T., Okaneya, T., Kawakubo, M., Shimojo, H., Nishizawa, O. and Nakayama, J. 2014. Overexpression of O-GlcNAc by prostate cancer cells is significantly associated with poor prognosis of patients. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. **17**(1), pp.18–22.

Kang, E.-S., Han, D., Park, J., Kwak, T.K., Oh, M.-A., Lee, S.-A., Choi, S., Park, Z.Y., Kim, Y. and Lee, J.W. 2008. O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic beta cells. *Experimental Cell Research*. **314**(11–12), pp.2238–2248.

Kanwal, S., Fardini, Y., Pagesy, P., N'tumba-Byn, T., Pierre-Eugène, C., Masson, E., Hampe, C. and Issad, T. 2013. O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor α expression and confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PloS One*. **8**(7), p.e69150.

Kaplon, J., van Dam, L. and Peeper, D. 2015. Two-way communication between the metabolic and cell cycle machineries: the molecular basis. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. **14**(13), pp.2022–2032.

Katyal, S., Oliver, J.H., Peterson, M.S., Ferris, J.V., Carr, B.S. and Baron, R.L. 2000. Extrahepatic metastases of hepatocellular carcinoma. *Radiology*. **216**(3), pp.698–703.

Kazemi, Z., Chang, H., Haserodt, S., McKen, C. and Zachara, N.E. 2010. O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) regulates stress-induced heat shock protein expression in a GSK-3beta-dependent manner. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**(50), pp.39096–39107.

Kearse, K.P. and Hart, G.W. 1991a. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **88**(5), pp.1701–1705.

Kearse, K.P. and Hart, G.W. 1991b. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **88**(5), pp.1701–1705.

Keembiyehetty, C.N., Krzeslak, A., Love, D.C. and Hanover, J.A. 2011. A lipid-droplet-targeted O-GlcNAcase isoform is a key regulator of the proteasome. *Journal of Cell Science*. **124**(16), pp.2851–2860.

Kelly, W.G. and Hart, G.W. 1989. Glycosylation of chromosomal proteins: localization of O-linked N-acetylglucosamine in Drosophila chromatin. *Cell*. **57**(2), pp.243–251.

Kettenbach, A.N., Schweppe, D.K., Faherty, B.K., Pechenick, D., Pletnev, A.A. and Gerber, S.A. 2011. Quantitative phosphoproteomics identifies substrates and functional modules of Aurora and Polo-like kinase activities in mitotic cells. *Science Signaling*. **4**(179), p.rs5.

Khalaf, A.M., Fuentes, D., Morshid, A.I., Burke, M.R., Kaseb, A.O., Hassan, M., Hazle, J.D. and Elsayes, K.M. 2018. Role of Wnt/β-catenin signaling in hepatocellular carcinoma, pathogenesis, and clinical significance. *Journal of Hepatocellular Carcinoma*. **5**, pp.61–73.

Kim, C., Nam, D.W., Park, S.Y., Song, H., Hong, H.S., Boo, J.H., Jung, E.S., Kim, Y., Baek, J.Y., Kim, K.S., Cho, J.W. and Mook-Jung, I. 2013. O-linked β-N-acetylglucosaminidase inhibitor attenuates β-amyloid plaque and rescues memory impairment. *Neurobiology of Aging*. **34**(1), pp.275–285.

Kim, E.Y., Jeong, E.H., Park, S., Jeong, H.-J., Edery, I. and Cho, J.W. 2012. A role for O-GlcNAcylation in setting circadian clock speed. *Genes & Development*. **26**(5), pp.490–502.

Kim, J.E. and Chen, J. 2004. regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis. *Diabetes*. **53**(11), pp.2748–2756.

Klammer, M., Kaminski, M., Zedler, A., Oppermann, F., Blencke, S., Marx, S., Müller, S., Tebbe, A., Godl, K. and Schaab, C. 2012. Phosphosignature predicts dasatinib response in non-small cell lung cancer. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **11**(9), pp.651–668.

Konrad, R.J., Zhang, F., Hale, J.E., Knierman, M.D., Becker, G.W. and Kudlow, J.E. 2002. Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **293**(1), pp.207–212.

Körner, A., Ma, L., Franks, P.W., Kiess, W., Baier, L.J., Stumvoll, M. and Kovacs, P. 2007. Sex-specific effect of the Val1483Ile polymorphism in the fatty acid synthase gene (FAS) on body mass index and lipid profile in Caucasian children. *International Journal of Obesity (2005)*. **31**(2), pp.353–358.

Kovacs, P., Harper, I., Hanson, R.L., Infante, A.M., Bogardus, C., Tataranni, P.A. and Baier, L.J. 2004. A Novel Missense Substitution (Val1483Ile) in the Fatty Acid Synthase Gene (FAS) Is Associated With Percentage of Body Fat and Substrate Oxidation Rates in Nondiabetic Pima Indians. *Diabetes*. **53**(7), pp.1915–1919.

Kreppel, L.K., Blomberg, M.A. and Hart, G.W. 1997. Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *Journal of Biological Chemistry*. **272**(14), pp.9308–9315.

Kreppel, L.K. and Hart, G.W. 1999. Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *The Journal of Biological Chemistry*. **274**(45), pp.32015–32022.

Kruiswijk, F., Labuschagne, C.F. and Vousden, K.H. 2015. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **16**(7), pp.393–405.

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. 2018. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet (London, England)*. **391**(10126), pp.1163–1173.

Kuhajda, F.P., Jenner, K., Wood, F.D., Hennigar, R.A., Jacobs, L.B., Dick, J.D. and Pasternack, G.R. 1994. Fatty acid synthesis: a potential selective target for antineoplastic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **91**(14), pp.6379–6383.

Kumar, M.V., Shimokawa, T., Nagy, T.R. and Lane, M.D. 2002. Differential effects of a centrally acting fatty acid synthase inhibitor in lean and obese mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**(4), pp.1921–1925.

Kusakabe, T., Nashimoto, A., Honma, K. and Suzuki, T. 2002. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology*. **40**(1), pp.71–79.

Kushner, J.A., Ciemerych, M.A., Sicinska, E., Wartschow, L.M., Teta, M., Long, S.Y., Sicinski, P. and White, M.F. 2005. Cyclins D2 and D1 Are Essential for Postnatal Pancreatic β-Cell Growth. *Molecular and Cellular Biology*. **25**(9), pp.3752–3762.

Kwei, K.A., Baker, J.B. and Pelham, R.J. 2012. 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), p.e46518.

de La Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C.A., Buendia, M.A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A. and Perret, C. 1998. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**(15), pp.8847–8851.

Lagerlöf, O., Hart, G.W. and Huganir, R.L. 2017. O-GlcNAc transferase regulates excitatory synapse maturity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **114**(7), pp.1684–1689.

Lagerlöf, O., Slocomb, J.E., Hong, I., Aponte, Y., Blackshaw, S., Hart, G.W. and Huganir, R.L. 2016. The nutrient sensor OGT in PVN neurons regulates feeding. *Science (New York, N.Y.)*. **351**(6279), pp.1293–1296.

Latasa, M.-J., Griffin, M.J., Soo Moon, Y., Kang, C. and Sul, H.S. 2003. Occupancy and Function of the −150 Sterol Regulatory Element and −65 E-Box in Nutritional Regulation of the Fatty Acid Synthase Gene in Living Animals. *Molecular and Cellular Biology*. **23**(16), pp.5896–5907.

Laurencikiene, J. and Rydén, M. 2012. Liver X receptors and fat cell metabolism. *International Journal of Obesity (2005)*. **36**(12), pp.1494–1502.

Laurent-Puig, P., Legoix, P., Bluteau, O., Belghiti, J., Franco, D., Binot, F., Monges, G., Thomas, G., Bioulac-Sage, P. and Zucman-Rossi, J. 2001. Genetic alterations associated with hepatocellular carcinomas define distinct pathways of hepatocarcinogenesis. *Gastroenterology*. **120**(7), pp.1763–1773.

Lazarus, M.B., Jiang, J., Gloster, T.M., Zandberg, W.F., Whitworth, G.E., Vocadlo, D.J. and Walker, S. 2012. Structural snapshots of the reaction coordinate for O-GlcNAc transferase. *Nature Chemical Biology*. **8**(12), pp.966–968.

Lazarus, M.B., Jiang, J., Kapuria, V., Bhuiyan, T., Janetzko, J., Zandberg, W.F., Vocadlo, D.J., Herr, W. and Walker, S. 2013. HCF-1 is cleaved in the active site of O-GlcNAc transferase. *Science (New York, N.Y.)*. **342**(6163), pp.1235–1239.

Lazarus, M.B., Nam, Y., Jiang, J., Sliz, P. and Walker, S. 2011. Structure of human O-GlcNAc transferase and its complex with a peptide substrate. *Nature*. **469**(7331), pp.564–567.

Le Grazie, M., Biagini, M.R., Tarocchi, M., Polvani, S. and Galli, A. 2017. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: The present and the future. *World Journal of Hepatology*. **9**(21), pp.907–920.

Lee, B.E., Kim, H.Y., Kim, H.-J., Jeong, H., Kim, B.-G., Lee, H.-E., Lee, J., Kim, H.B., Lee, S.E., Yang, Y.R., Yi, E.C., Hanover, J.A., Myung, K., Suh, P.-G., Kwon, T. and Kim, J.-I. 2020. O-GlcNAcylation regulates dopamine neuron function, survival and degeneration in Parkinson disease. *Brain: A Journal of Neurology*. **143**(12), pp.3699–3716.

Lee, D.H., Kwon, N.E., Lee, W.-J., Lee, M.-S., Kim, D.-J., Kim, J.H. and Park, S.-K. 2020. Increased O-GlcNAcylation of c-Myc Promotes Pre-B Cell Proliferation. *Cells*. **9**(1), p.E158.

Lee, J.-H., Liow, J.-S., Paul, S., Morse, C.L., Haskali, M.B., Manly, L., Shcherbinin, S., Ruble, J.C., Kant, N., Collins, E.C., Nuthall, H.N., Zanotti-Fregonara, P., Zoghbi, S.S., Pike, V.W. and Innis, R.B. 2020.

PET quantification of brain O-GlcNAcase with [18F]LSN3316612 in healthy human volunteers. *EJNMMI research*. **10**(1), p.20.

Lefebvre, T., Alonso, C., Mahboub, S., Dupire, M.J., Zanetta, J.P., Caillet-Boudin, M.L. and Michalski, J.C. 1999. Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1472**(1–2), pp.71–81.

Lefebvre, T., Baert, F., Bodart, J.-F., Flament, S., Michalski, J.-C. and Vilain, J.-P. 2004. Modulation of O-GlcNAc glycosylation during Xenopus oocyte maturation. *Journal of Cellular Biochemistry*. **93**(5), pp.999–1010.

Lehman, D.M., Fu, D.-J., Freeman, A.B., Hunt, K.J., Leach, R.J., Johnson-Pais, T., Hamlington, J., Dyer, T.D., Arya, R., Abboud, H., Göring, H.H.H., Duggirala, R., Blangero, J., Konrad, R.J. and Stern, M.P. 2005. A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes*. **54**(4), pp.1214–1221.

Leturcq, M., Mortuaire, M., Hardivillé, S., Schulz, C., Lefebvre, T. and Vercoutter-Edouart, A.-S. 2018. O-GlcNAc transferase associates with the MCM2-7 complex and its silencing destabilizes MCM-MCM interactions. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. **75**(23), pp.4321–4339.

Levine, Z.G., Fan, C., Melicher, M.S., Orman, M., Benjamin, T. and Walker, S. 2018. O-GlcNAc transferase recognizes protein substrates using an asparagine ladder in the TPR superhelix. *Journal of the American Chemical Society*. **140**(10), pp.3510–3513.

Lewis, B.A., Burlingame, A.L. and Myers, S.A. 2016. Human RNA Polymerase II Promoter Recruitment in Vitro Is Regulated by O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase (OGT). *The Journal of Biological Chemistry*. **291**(27), pp.14056–14061.

Lewis, B.A. and Hanover, J.A. 2014. O-GlcNAc and the epigenetic regulation of gene expression. *The Journal of Biological Chemistry*. **289**(50), pp.34440–34448.

Li, B., Carey, M. and Workman, J.L. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell*. **128**(4), pp.707–719.

Li, J., Luo, J., Zhu, J., Sun, Y., Yao, D., Shi, H. and Wang, W. 2015. Regulation of the fatty acid synthase promoter by liver X receptor α through direct and indirect mechanisms in goat mammary epithelial cells. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. **184**, pp.44–51.

Li, M.-D., Ruan, H.-B., Hughes, M.E., Lee, J.-S., Singh, J.P., Jones, S.P., Nitabach, M.N. and Yang, X. 2013. O-GlcNAc Signaling Entrains the Circadian Clock by Inhibiting BMAL1/CLOCK Ubiquitination. *Cell Metabolism*. **17**(2), pp.303–310.

Li, M.-D., Ruan, H.-B., Singh, J.P., Zhao, L., Zhao, T., Azarhoush, S., Wu, J., Evans, R.M. and Yang, X. 2012. O-GlcNAc transferase is involved in glucocorticoid receptor-mediated transrepression. *The Journal of Biological Chemistry*. **287**(16), pp.12904–12912.

Li, M.V., Chen, W., Harmancey, R.N., Nuotio-Antar, A.M., Imamura, M., Saha, P., Taegtmeyer, H. and Chan, L. 2010. Glucose-6-phosphate mediates activation of the carbohydrate responsive binding protein (ChREBP). *Biochemical and biophysical research communications*. **395**(3), pp.395–400.

Li, T., Kon, N., Jiang, L., Tan, M., Ludwig, T., Zhao, Y., Baer, R. and Gu, W. 2012. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. *Cell*. **149**(6), pp.1269–1283.

Li, T., Weng, J., Zhang, Y., Liang, K., Fu, G., Li, Y., Bai, X. and Gao, Y. 2019. mTOR direct crosstalk with STAT5 promotes de novo lipid synthesis and induces hepatocellular carcinoma. *Cell Death & Disease*. **10**(8), p.619.

Li, Y., Xu, S., Mihaylova, M.M., Zheng, B., Hou, X., Jiang, B., Park, O., Luo, Z., Lefai, E., Shyy, J.Y.-J., Gao, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J., Shaw, R.J., Cohen, R.A. and Zang, M. 2011. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metabolism*. **13**(4), pp.376–388.

Liberti, M.V. and Locasale, J.W. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*. **41**(3), pp.211–218.

Lièvre, A. and Laurent-Puig, P. 2010. RAS/MAPK signaling pathway. Available from: https://doi.org/10.4267/2042/30747.

Lin, C.-H., Liao, C.-C., Chen, M.-Y. and Chou, T.-Y. 2021. Feedback Regulation of O-GlcNAc Transferase through Translation Control to Maintain Intracellular O-GlcNAc Homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. **22**(7), p.3463.

Lin, G., Wang, L., Marcogliese, P.C. and Bellen, H.J. 2019. Sphingolipids in the Pathogenesis of Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. **30**(2), pp.106–117.

Lin, H.-P., Cheng, Z.-L., He, R.-Y., Song, L., Tian, M.-X., Zhou, L.-S., Groh, B.S., Liu, W.-R., Ji, M.-B., Ding, C., Shi, Y.-H., Guan, K.-L., Ye, D. and Xiong, Y. 2016. Destabilization of Fatty Acid Synthase by Acetylation Inhibits De Novo Lipogenesis and Tumor Cell Growth. *Cancer Research*. **76**(23), pp.6924–6936.

Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, G.W. and Gong, C.-X. 2004. O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**(29), pp.10804–10809.

Liu, G.Y. and Sabatini, D.M. 2020. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **21**(4), pp.183–203.

Liu, H., Liu, Y. and Zhang, J.-T. 2008. A new mechanism of drug resistance in breast cancer cells: fatty acid synthase overexpression-mediated palmitate overproduction. *Molecular Cancer Therapeutics*. **7**(2), pp.263–270.

Liu, H., Wang, Z., Yu, S. and Xu, J. 2014. Proteasomal degradation of O-GlcNAc transferase elevates hypoxia-induced vascular endothelial inflammatory response. *Cardiovascular Research*. **103**(1), pp.131–139.

Liu, H., Xu, Y., Xiang, J., Long, L., Green, S., Yang, Z., Zimdahl, B., Lu, J., Cheng, N., Horan, L.H., Liu, B., Yan, S., Wang, P., Diaz, J., Jin, L., Nakano, Y., Morales, J.F., Zhang, P., Liu, L.-X., Staley, B.K., Priceman, S.J., Brown, C.E., Forman, S.J., Chan, V.W. and Liu, C. 2017. Targeting Alpha-Fetoprotein (AFP)-MHC Complex with CAR T-Cell Therapy for Liver Cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. **23**(2), pp.478–488.

Liu, K., Paterson, A.J., Chin, E. and Kudlow, J.E. 2000. Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**(6), pp.2820–2825.

Liu, S., Sheng, H., Yu, Z., Paschen, W. and Yang, W. 2016. O-linked β-N-acetylglucosamine modification of proteins is activated in post-ischemic brains of young but not aged mice: Implications for impaired functional recovery from ischemic stress. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. **36**(2), pp.393–398.

Liu, T.-W., Zandberg, W.F., Gloster, T.M., Deng, L., Murray, K.D., Shan, X. and Vocadlo, D.J. 2018. Metabolic Inhibitors of O-GlcNAc Transferase That Act In Vivo Implicate Decreased O-GlcNAc Levels in Leptin-Mediated Nutrient Sensing. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. **57**(26), pp.7644–7648.

Liu, X., Blaženović, I., Contreras, A.J., Pham, T.M., Tabuloc, C.A., Li, Y.H., Ji, J., Fiehn, O. and Chiu, J.C. 2021. Hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAc-processing enzymes regulate daily rhythms in protein O-GlcNAcylation. *Nature Communications*. **12**(1), p.4173.

Liu, Y., An, S., Ward, R., Yang, Y., Guo, X.-X., Li, W. and Xu, T.-R. 2016. G protein-coupled receptors as promising cancer targets. *Cancer Letters*. **376**(2), pp.226–239.

Liu, Y., Huang, H., Cao, Y., Wu, Q., Li, W. and Zhang, J. 2017. Suppression of OGT by microRNA24 reduces FOXA1 stability and prevents breast cancer cells invasion. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **487**(3), pp.755–762.

Liu, Y., Li, X., Yu, Y., Shi, J., Liang, Z., Run, X., Li, Y., Dai, C., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Liu, F. and Gong, C.-X. 2012. Developmental regulation of protein O-GlcNAcylation, O-GlcNAc transferase, and O-GlcNAcase in mammalian brain. *PloS One*. **7**(8), p.e43724.

Liu, Y., Ren, Y., Cao, Y., Huang, H., Wu, Q., Li, W., Wu, S. and Zhang, J. 2017. Discovery of a Low Toxicity O-GlcNAc Transferase (OGT) Inhibitor by Structure-based Virtual Screening of Natural Products. *Scientific Reports*. **7**(1), p.12334.

Lu, L.-C., Shao, Y.-Y., Lee, Y.-H., Hsieh, M.-S., Hsiao, C.-H., Lin, H.-H., Kao, H.-F., Ma, Y.-Y., Yen, F.-C., Cheng, A.-L. and Hsu, C.-H. 2014. β-catenin (CTNNB1) mutations are not associated with prognosis in advanced hepatocellular carcinoma. *Oncology*. **87**(3), pp.159–166.

Lu, S., Haskali, M.B., Ruley, K.M., Dreyfus, N.J.-F., DuBois, S.L., Paul, S., Liow, J.-S., Morse, C.L., Kowalski, A., Gladding, R.L., Gilmore, J., Mogg, A.J., Morin, S.M., Lindsay-Scott, P.J., Ruble, J.C., Kant, N.A., Shcherbinin, S., Barth, V.N., Johnson, M.P., Cuadrado, M., Jambrina, E., Mannes, A.J., Nuthall, H.N., Zoghbi, S.S., Jesudason, C.D., Innis, R.B. and Pike, V.W. 2020. PET ligands [18F]LSN3316612 and [11C]LSN3316612 quantify O-linked-β-N-acetyl-glucosamine hydrolase in the brain. *Science Translational Medicine*. **12**(543), p.eaau2939.

Lubas, W.A., Frank, D.W., Krause, M. and Hanover, J.A. 1997. O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**(14), pp.9316–9324.

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. 2017. Site-specific identification and quantitation of endogenous SUMO modifications under native conditions. *Nature Communications*. **8**, p.1171.

Lundby, A., Lage, K., Weinert, B.T., Bekker-Jensen, D.B., Secher, A., Skovgaard, T., Kelstrup, C.D., Dmytriyev, A., Choudhary, C., Lundby, C. and Olsen, J.V. 2012. Proteomic Analysis of Lysine Acetylation Sites in Rat Tissues Reveals Organ Specificity and Subcellular Patterns. *Cell reports*. **2**(2), pp.419–431.

Lynch, T.P., Ferrer, C.M., Jackson, S.R., Shahriari, K.S., Vosseller, K. and Reginato, M.J. 2012. Critical role of O-Linked β-N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *The Journal of Biological Chemistry*. **287**(14), pp.11070–11081.

Ma, J., Wu, C. and Hart, G.W. 2021. Analytical and Biochemical Perspectives of Protein O-GlcNAcylation. *Chemical Reviews*. **121**(3), pp.1513–1581.

Ma, Z., Vocadlo, D.J. and Vosseller, K. 2013. Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-κB activity in pancreatic cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **288**(21), pp.15121–15130.

Madigan, A.A., Rycyna, K.J., Parwani, A.V., Datiri, Y.J., Basudan, A.M., Sobek, K.M., Cummings, J.L., Basse, P.H., Bacich, D.J. and O'Keefe, D.S. 2014. Novel nuclear localization of fatty acid synthase correlates with prostate cancer aggressiveness. *The American Journal of Pathology*. **184**(8), pp.2156–2162.

Mailleux, F., Gélinas, R., Beauloye, C., Horman, S. and Bertrand, L. 2016. O-GlcNAcylation, enemy or ally during cardiac hypertrophy development? *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1862**(12), pp.2232–2243.

Marotta, N.P., Lin, Y.H., Lewis, Y.E., Ambroso, M.R., Zaro, B.W., Roth, M.T., Arnold, D.B., Langen, R. and Pratt, M.R. 2015. O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the protein α-synuclein associated with Parkinson's disease. *Nature Chemistry*. **7**(11), pp.913–920.

Marrero, J.A., Romano, P.R., Nikolaeva, O., Steel, L., Mehta, A., Fimmel, C.J., Comunale, M.A., D'Amelio, A., Lok, A.S. and Block, T.M. 2005. GP73, a resident Golgi glycoprotein, is a novel serum marker for hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. **43**(6), pp.1007–1012.

Marsh, S.A., Collins, H.E. and Chatham, J.C. 2014. Protein O-GlcNAcylation and cardiovascular (patho)physiology. *The Journal of Biological Chemistry*. **289**(50), pp.34449–34456.

Marshall, S., Bacote, V. and Traxinger, R.R. 1991. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *The Journal of Biological Chemistry*. **266**(8), pp.4706–4712.

Martin, S.E.S., Tan, Z.-W., Itkonen, H.M., Duveau, D.Y., Paulo, J.A., Janetzko, J., Boutz, P.L., Törk, L., Moss, F.A., Thomas, C.J., Gygi, S.P., Lazarus, M.B. and Walker, S. 2018. Structure-Based Evolution of Low Nanomolar O-GlcNAc Transferase Inhibitors. *Journal of the American Chemical Society*. **140**(42), pp.13542–13545.

Mayers, J.R., Wu, C., Clish, C.B., Kraft, P., Torrence, M.E., Fiske, B.P., Yuan, C., Bao, Y., Townsend, M.K., Tworoger, S.S., Davidson, S.M., Papagiannakopoulos, T., Yang, A., Dayton, T.L., Ogino, S., Stampfer, M.J., Giovannucci, E.L., Qian, Z.R., Rubinson, D.A., Ma, J., Sesso, H.D., Gaziano, J.M., Cochrane, B.B., Liu, S., Wactawski-Wende, J., Manson, J.E., Pollak, M.N., Kimmelman, A.C., Souza, A., Pierce, K., Wang, T.J., Gerszten, R.E., Fuchs, C.S., Vander Heiden, M.G. and Wolpin, B.M. 2014. Elevation of circulating branched-chain amino acids is an early event in human pancreatic adenocarcinoma development. *Nature Medicine*. **20**(10), pp.1193–1198.

McClain, D.A., Lubas, W.A., Cooksey, R.C., Hazel, M., Parker, G.J., Love, D.C. and Hanover, J.A. 2002. Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**(16), pp.10695–10699.

Menendez, J.A., Decker, J.P. and Lupu, R. 2005. In support of fatty acid synthase (FAS) as a metabolic oncogene: extracellular acidosis acts in an epigenetic fashion activating FAS gene expression in cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. **94**(1), pp.1–4.

Meng, L. and Zheng, X.F.S. 2015. Toward rapamycin analog (rapalog)-based precision cancer therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. **36**(10), pp.1163–1169.

Meng, Z., Li, T., Ma, X., Wang, X., Van Ness, C., Gan, Y., Zhou, H., Tang, J., Lou, G., Wang, Y., Wu, J., Yen, Y., Xu, R. and Huang, W. 2013. Berbamine inhibits the growth of liver cancer cells and cancer-initiating cells by targeting Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II. *Molecular Cancer Therapeutics*. **12**(10), pp.2067–2077.

Menon, S., Yecies, J.L., Zhang, H.H., Howell, J.J., Nicholatos, J., Harputlugil, E., Bronson, R.T., Kwiatkowski, D.J. and Manning, B.D. 2012. Chronic activation of mTOR complex 1 is sufficient to cause hepatocellular carcinoma in mice. *Science Signaling*. **5**(217), p.ra24.

Mertins, P., Mani, D.R., Ruggles, K.V., Gillette, M.A., Clauser, K.R., Wang, P., Wang, X., Qiao, J.W., Cao, S., Petralia, F., Kawaler, E., Mundt, F., Krug, K., Tu, Z., Lei, J.T., Gatza, M.L., Wilkerson, M., Perou, C.M., Yellapantula, V., Huang, K., Lin, C., McLellan, M.D., Yan, P., Davies, S.R., Townsend, R.R., Skates, S.J., Wang, J., Zhang, B., Kinsinger, C.R., Mesri, M., Rodriguez, H., Ding, L., Paulovich, A.G., Fenyö, D., Ellis, M.J., Carr, S.A., and NCI CPTAC 2016. Proteogenomics connects somatic mutations to signalling in breast cancer. *Nature*. **534**(7605), pp.55–62.

Migita, T., Ruiz, S., Fornari, A., Fiorentino, M., Priolo, C., Zadra, G., Inazuka, F., Grisanzio, C., Palescandolo, E., Shin, E., Fiore, C., Xie, W., Kung, A.L., Febbo, P.G., Subramanian, A., Mucci, L., Ma, J., Signoretti, S., Stampfer, M., Hahn, W.C., Finn, S. and Loda, M. 2009. Fatty Acid Synthase: A Metabolic Enzyme and Candidate Oncogene in Prostate Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. **101**(7), pp.519–532.

Miller, W.P., Mihailescu, M.L., Yang, C., Barber, A.J., Kimball, S.R., Jefferson, L.S. and Dennis, M.D. 2016. The Translational Repressor 4E-BP1 Contributes to Diabetes-Induced Visual Dysfunction. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **57**(3), pp.1327–1337.

Miniaci, M.C., Dattolo, M.G., Irace, C., Capuozzo, A., Santamaria, R. and Scotto, P. 2015. Glucose deprivation promotes activation of mTOR signaling pathway and protein synthesis in rat skeletal muscle cells. *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology*. **467**(6), pp.1357–1366.

Mollinedo, F. and Gajate, C. 2015. Lipid rafts as major platforms for signaling regulation in cancer. *Advances in Biological Regulation*. **57**, pp.130–146.

Moore, M., Avula, N., Jo, S., Beetch, M. and Alejandro, E.U. 2021. Disruption of O-Linked N-Acetylglucosamine Signaling in Placenta Induces Insulin Sensitivity in Female Offspring. *International Journal of Molecular Sciences*. **22**(13), p.6918.

Morgan, D.O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **13**, pp.261–291.

Motzer, R.J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T.E., Porta, C., Bracarda, S., Grünwald, V., Thompson, J.A., Figlin, R.A., Hollaender, N., Urbanowitz, G., Berg, W.J., Kay, A., Lebwohl, D., Ravaud, A., and RECORD-1 Study Group 2008. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet (London, England)*. **372**(9637), pp.449–456.

Muthusamy, S., Hong, K.U., Dassanayaka, S., Hamid, T. and Jones, S.P. 2015. E2F1 Transcription Factor Regulates O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) Transferase and O-GlcNAcase Expression. *The Journal of Biological Chemistry*. **290**(52), pp.31013–31024.

Nagnan-Le Meillour, P., Vercoutter-Edouart, A.-S., Hilliou, F., Le Danvic, C. and Lévy, F. 2014. Proteomic Analysis of Pig (Sus scrofa) Olfactory Soluble Proteome Reveals O-Linked-N-Acetylglucosaminylation of Secreted Odorant-Binding Proteins. *Frontiers in Endocrinology*. **5**.

Najafi-Shoushtari, S.H., Kristo, F., Li, Y., Shioda, T., Cohen, D.E., Gerszten, R.E. and Näär, A.M. 2010. MicroRNA-33 and the SREBP Host Genes Cooperate to Control Cholesterol Homeostasis. *Science*. **328**(5985), pp.1566–1569.

Nault, J.C., Calderaro, J., Di Tommaso, L., Balabaud, C., Zafrani, E.S., Bioulac-Sage, P., Roncalli, M. and Zucman-Rossi, J. 2014. Telomerase reverse transcriptase promoter mutation is an early somatic genetic alteration in the transformation of premalignant nodules in hepatocellular carcinoma on cirrhosis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. **60**(6), pp.1983–1992.

Nault, J.C., Mallet, M., Pilati, C., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Laurent, C., Laurent, A., Cherqui, D., Balabaud, C., Zucman-Rossi, J. and Zucman Rossi, J. 2013. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nature Communications*. **4**, p.2218.

Ngoh, G.A., Hamid, T., Prabhu, S.D. and Jones, S.P. 2009. O-GlcNAc signaling attenuates ER stress-induced cardiomyocyte death. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. **297**(5), pp.H1711-1719.

Ngoh, G.A., Watson, L.J., Facundo, H.T. and Jones, S.P. 2011. Augmented O-GlcNAc signaling attenuates oxidative stress and calcium overload in cardiomyocytes. *Amino Acids*. **40**(3), pp.895–911.

Nguyen, P.L., Ma, J., Chavarro, J.E., Freedman, M.L., Lis, R., Fedele, G., Fiore, C., Qiu, W., Fiorentino, M., Finn, S., Penney, K.L., Eisenstein, A., Schumacher, F.R., Mucci, L.A., Stampfer, M.J., Giovannucci, E. and Loda, M. 2010. Fatty Acid Synthase Polymorphisms, Tumor Expression, Body Mass Index, Prostate Cancer Risk, and Survival. *Journal of Clinical Oncology*. **28**(25), pp.3958–3964.

Nie, H., Ju, H., Fan, J., Shi, X., Cheng, Y., Cang, X., Zheng, Z., Duan, X. and Yi, W. 2020. O-GlcNAcylation of PGK1 coordinates glycolysis and TCA cycle to promote tumor growth. *Nature Communications*. **11**(1), p.36.

Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J. and Yonezawa, K. 2003. The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**(18), pp.15461–15464.

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

O'Donnell, N., Zachara, N.E., Hart, G.W. and Marth, J.D. 2004. Ogt-Dependent X-Chromosome-Linked Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability. *Molecular and Cellular Biology*. **24**(4), pp.1680–1690.

Ogino, S., Kawasaki, T., Ogawa, A., Kirkner, G.J., Loda, M. and Fuchs, C.S. 2007. Fatty acid synthase overexpression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, independent of CpG island methylator phenotype. *Human Pathology*. **38**(6), pp.842–849.

Ohn, T., Kedersha, N., Hickman, T., Tisdale, S. and Anderson, P. 2008. A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nature Cell Biology*. **10**(10), pp.1224–1231.

Ohtsu, A., Ajani, J.A., Bai, Y.-X., Bang, Y.-J., Chung, H.-C., Pan, H.-M., Sahmoud, T., Shen, L., Yeh, K.-H., Chin, K., Muro, K., Kim, Y.H., Ferry, D., Tebbutt, N.C., Al-Batran, S.-E., Smith, H., Costantini, C., Rizvi, S., Lebwohl, D. and Van Cutsem, E. 2013. Everolimus for previously treated advanced gastric cancer: results of the randomized, double-blind, phase III GRANITE-1 study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **31**(31), pp.3935–3943.

Oikari, S., Kettunen, T., Tiainen, S., Häyrinen, J., Masarwah, A., Sudah, M., Sutela, A., Vanninen, R., Tammi, M. and Auvinen, P. 2018. UDP-sugar accumulation drives hyaluronan synthesis in breast cancer. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*. **67**, pp.63–74.

Okuyama, R. and Marshall, S. 2004. Potential regulation of nuclear UDP-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) by substrate availability: ability of chromatin protein to bind UDP-N-acetylglucosamine and reduce OGT-mediated O-Linked glycosylation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **27**(8), pp.1293–1296.

Oliveras-Ferraros, C., Vazquez-Martin, A., Fernández-Real, J.M. and Menendez, J.A. 2009. AMPK-sensed cellular energy state regulates the release of extracellular Fatty Acid Synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **378**(3), pp.488–493.

Oliveri, R.S., Wetterslev, J. and Gluud, C. 2011. Transarterial (chemo)embolisation for unresectable hepatocellular carcinoma. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. (3), p.CD004787.

Olivier-Van Stichelen, S., Dehennaut, V., Buzy, A., Zachayus, J.-L., Guinez, C., Mir, A.-M., El Yazidi-Belkoura, I., Copin, M.-C., Boureme, D., Loyaux, D., Ferrara, P. and Lefebvre, T. 2014. O-GlcNAcylation stabilizes β-catenin through direct competition with phosphorylation at threonine 41. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. **28**(8), pp.3325–3338.

Olivier-Van Stichelen, S., Drougat, L., Dehennaut, V., El Yazidi-Belkoura, I., Guinez, C., Mir, A.-M., Michalski, J.-C., Vercoutter-Edouart, A.-S. and Lefebvre, T. 2012. Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis*. **1**, p.e36.

Orita, H., Coulter, J., Tully, E., Abe, M., Montgomery, E., Alvarez, H., Sato, K., Hino, O., Kajiyama, Y., Tsurumaru, M. and Gabrielson, E. 2010. High levels of fatty acid synthase expression in esophageal cancers represent a potential target for therapy. *Cancer Biology & Therapy*. **10**(6), pp.549–554.

Orr, B., Bousbaa, H. and Sunkel, C.E. 2007. Mad2-independent Spindle Assembly Checkpoint Activation and Controlled Metaphase–Anaphase Transition in Drosophila S2 Cells. *Molecular Biology of the Cell*. **18**(3), pp.850–863.

Ortiz-Meoz, R.F., Jiang, J., Lazarus, M.B., Orman, M., Janetzko, J., Fan, C., Duveau, D.Y., Tan, Z.-W., Thomas, C.J. and Walker, S. 2015. A Small Molecule That Inhibits OGT Activity in Cells. *ACS Chemical Biology*. **10**(6), pp.1392–1397.

Osborne, T.F. 2000. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**(42), pp.32379–32382.

Owen, J.L., Zhang, Y., Bae, S.-H., Farooqi, M.S., Liang, G., Hammer, R.E., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. 2012. Insulin stimulation of SREBP-1c processing in transgenic rat hepatocytes requires p70 S6-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**(40), pp.16184–16189.

Pajic, A., Spitkovsky, D., Christoph, B., Kempkes, B., Schuhmacher, M., Staege, M.S., Brielmeier, M., Ellwart, J., Kohlhuber, F., Bornkamm, G.W., Polack, A. and Eick, D. 2000. Cell cycle activation by c-myc in a burkitt lymphoma model cell line. *International Journal of Cancer*. **87**(6), pp.787–793.

Pantaleon, M., Tan, H.Y., Kafer, G.R. and Kaye, P.L. 2010. Toxic Effects of Hyperglycemia Are Mediated by the Hexosamine Signaling Pathway and O-Linked Glycosylation in Early Mouse Embryos. *Biology of Reproduction*. **82**(4), pp.751–758.

Pardee, A.B. 1974. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **71**(4), pp.1286–1290.

Park, K., Saudek, C.D. and Hart, G.W. 2010. Increased expression of beta-N-acetylglucosaminidase in erythrocytes from individuals with pre-diabetes and diabetes. *Diabetes*. **59**(7), pp.1845–1850.

Park, S.-K., Zhou, X., Pendleton, K.E., Hunter, O.V., Kohler, J.J., O'Donnell, K.A. and Conrad, N.K. 2017. A Conserved Splicing Silencer Dynamically Regulates O-GlcNAc Transferase Intron Retention and O-GlcNAc Homeostasis. *Cell Reports*. **20**(5), pp.1088–1099.

Park, S.Y., Kim, H.S., Kim, N.H., Ji, S., Cha, S.Y., Kang, J.G., Ota, I., Shimada, K., Konishi, N., Nam, H.W., Hong, S.W., Yang, W.H., Roth, J., Yook, J.I. and Cho, J.W. 2010. Snail1 is stabilized by O-GlcNAc modification in hyperglycaemic condition. *The EMBO Journal*. **29**(22), pp.3787–3796.

Park, S.Y., Ryu, J. and Lee, W. 2005. O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Experimental & Molecular Medicine*. **37**(3), pp.220–229.

Pearce, L.R., Huang, X., Boudeau, J., Pawłowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A.F.M., Gourlay, R., Magnuson, M.A. and Alessi, D.R. 2007. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *The Biochemical Journal*. **405**(3), pp.513–522.

Perez-Cervera, Y., Dehennaut, V., Aquino Gil, M., Guedri, K., Solorzano Mata, C.J., Olivier-Van Stichelen, S., Michalski, J.-C., Foulquier, F. and Lefebvre, T. 2013. Insulin signaling controls the expression of O-GlcNAc transferase and its interaction with lipid microdomains. *The FASEB Journal*. **27**(9), pp.3478–3486.

Peterson, S.B. and Hart, G.W. 2016. New insights: A role for O-GlcNAcylation in diabetic complications. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. **51**(3), pp.150–161.

Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S. and Sabatini, D.M. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. **137**(5), pp.873–886.

Peterson, T.R., Sengupta, S.S., Harris, T.E., Carmack, A.E., Kang, S.A., Balderas, E., Guertin, D.A., Madden, K.L., Carpenter, A.E., Finck, B.N. and Sabatini, D.M. 2011. mTOR complex 1 regulates lipin 1 localization to control the SREBP pathway. *Cell*. **146**(3), pp.408–420.

Petrick, J.L., Campbell, P.T., Koshiol, J., Thistle, J.E., Andreotti, G., Beane-Freeman, L.E., Buring, J.E., Chan, A.T., Chong, D.Q., Doody, M.M., Gapstur, S.M., Gaziano, J.M., Giovannucci, E., Graubard, B.I., Lee, I.-M., Liao, L.M., Linet, M.S., Palmer, J.R., Poynter, J.N., Purdue, M.P., Robien, K., Rosenberg, L., Schairer, C., Sesso, H.D., Sinha, R., Stampfer, M.J., Stefanick, M., Wactawski-Wende, J., Zhang, X., Zeleniuch-Jacquotte, A., Freedman, N.D. and McGlynn, K.A. 2018. Tobacco, alcohol use and risk of hepatocellular carcinoma and intrahepatic cholangiocarcinoma: The Liver Cancer Pooling Project. *British Journal of Cancer*. **118**(7), pp.1005–1012.

Pines, J. 1995. Cyclins and Cyclin-Dependent Kinases: Theme and Variations *In*: G. F. Vande Woude and G. Klein, eds. *Advances in Cancer Research* [Online]. Academic Press, pp.181–212. [Accessed 25 April 2020]. Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065230X08602547.

Plate, C.A., Joshi, V.C., Sedgwick, B. and Wakil, S.J. 1968. Studies on the mechanism of fatty acid synthesis. XXI. The role of fructose 1,6-diphosphate in the stimulation of the fatty acid synthetase from pigeon liver. *The Journal of Biological Chemistry*. **243**(20), pp.5439–5445.

Porstmann, T., Santos, C.R., Griffiths, B., Cully, M., Wu, M., Leevers, S., Griffiths, J.R., Chung, Y.-L. and Schulze, A. 2008. SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metabolism*. **8**(3), pp.224–236.

Poteet, E., Choudhury, G.R., Winters, A., Li, W., Ryou, M.-G., Liu, R., Tang, L., Ghorpade, A., Wen, Y., Yuan, F., Keir, S.T., Yan, H., Bigner, D.D., Simpkins, J.W. and Yang, S.-H. 2013. Reversing the Warburg effect as a treatment for glioblastoma. *The Journal of Biological Chemistry*. **288**(13), pp.9153–9164.

Prasad Tharanga Jayasooriya, R.G., Dilshara, M.G., Neelaka Molagoda, I.M., Park, C., Park, S.R., Lee, S., Choi, Y.H. and Kim, G.-Y. 2018. Camptothecin induces G2/M phase arrest through the ATM-Chk2-Cdc25C axis as a result of autophagy-induced cytoprotection: Implications of reactive oxygen species. *Oncotarget*. **9**(31), pp.21744–21757.

Qian, K., Wang, S., Fu, M., Zhou, J., Singh, J.P., Li, M.-D., Yang, Y., Zhang, K., Wu, J., Nie, Y., Ruan, H.-B. and Yang, X. 2018. Transcriptional regulation of O-GlcNAc homeostasis is disrupted in pancreatic cancer. *The Journal of Biological Chemistry*. **293**(36), pp.13989–14000.

Qian, Y., Ahmad, M., Chen, S., Gillespie, P., Le, N., Mennona, F., Mischke, S., So, S.-S., Wang, H., Burghardt, C., Tannu, S., Conde-Knape, K., Kochan, J. and Bolin, D. 2011. Discovery of 1-arylcarbonyl-6,7-dimethoxyisoquinoline derivatives as glutamine fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **21**(21), pp.6264–6269.

Qureshi, A.A., Jenik, R.A., Kim, M., Lornitzo, F.A. and Porter, J.W. 1975. Separation of two active forms (holo-a and holo-b) of pigeon liver fatty acid synthetase and their interconversion by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **66**(1), pp.344–351.

Raimi, O.G., Hurtado-Guerrero, R., Borodkin, V., Ferenbach, A., Urbaniak, M.D., Ferguson, M.A.J. and van Aalten, D.M.F. 2020. A mechanism-inspired UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase inhibitor. *RSC chemical biology*. **1**(1), pp.13–25.

Ramadori, P., Cubero, F.J., Liedtke, C., Trautwein, C. and Nevzorova, Y.A. 2017. Alcohol and Hepatocellular Carcinoma: Adding Fuel to the Flame. *Cancers*. **9**(10), p.E130.

Ramirez-Correa, G.A., Ma, J., Slawson, C., Zeidan, Q., Lugo-Fagundo, N.S., Xu, M., Shen, X., Gao, W.D., Caceres, V., Chakir, K., DeVine, L., Cole, R.N., Marchionni, L., Paolocci, N., Hart, G.W. and Murphy, A.M. 2015. Removal of Abnormal Myofilament O-GlcNAcylation Restores Ca2+ Sensitivity in Diabetic Cardiac Muscle. *Diabetes*. **64**(10), pp.3573–3587.

Ranuncolo, S.M., Ghosh, S., Hanover, J.A., Hart, G.W. and Lewis, B.A. 2012. Evidence of the Involvement of O-GlcNAc-modified Human RNA Polymerase II CTD in Transcription in Vitro and in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*. **287**(28), pp.23549–23561.

Rao, F.V., Schüttelkopf, A.W., Dorfmueller, H.C., Ferenbach, A.T., Navratilova, I. and van Aalten, D.M.F. 2013. Structure of a bacterial putative acetyltransferase defines the fold of the human O-GlcNAcase C-terminal domain. *Open Biology*. **3**(10), p.130021.

Rao, X., Duan, X., Mao, W., Li, X., Li, Z., Li, Q., Zheng, Z., Xu, H., Chen, M., Wang, P.G., Wang, Y., Shen, B. and Yi, W. 2015. O-GlcNAcylation of G6PD promotes the pentose phosphate pathway and tumor growth. *Nature Communications*. **6**, p.8468.

Rashid, A., Pizer, E.S., Moga, M., Milgraum, L.Z., Zahurak, M., Pasternack, G.R., Kuhajda, F.P. and Hamilton, S.R. 1997. Elevated expression of fatty acid synthase and fatty acid synthetic activity in colorectal neoplasia. *The American Journal of Pathology*. **150**(1), pp.201–208.

Razani, B., Zhang, H., Schulze, P.C., Schilling, J.D., Verbsky, J., Lodhi, I.J., Topkara, V.K., Feng, C., Coleman, T., Kovacs, A., Kelly, D.P., Saffitz, J.E., Dorn, G.W., Nichols, C.G. and Semenkovich, C.F. 2011. Fatty acid synthase modulates homeostatic responses to myocardial stress. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**(35), pp.30949–30961.

Repa, J.J., Liang, G., Ou, J., Bashmakov, Y., Lobaccaro, J.M., Shimomura, I., Shan, B., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Mangelsdorf, D.J. 2000. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes & Development*. **14**(22), pp.2819–2830.

Resto, M., Kim, B.-H., Fernandez, A.G., Abraham, B.J., Zhao, K. and Lewis, B.A. 2016. O-GlcNAcase Is an RNA Polymerase II Elongation Factor Coupled to Pausing Factors SPT5 and TIF1β. *The Journal of Biological Chemistry*. **291**(43), pp.22703–22713.

Ricciardiello, F., Votta, G., Palorini, R., Raccagni, I., Brunelli, L., Paiotta, A., Tinelli, F., D'Orazio, G., Valtorta, S., De Gioia, L., Pastorelli, R., Moresco, R.M., La Ferla, B. and Chiaradonna, F. 2018. Inhibition of the Hexosamine Biosynthetic Pathway by targeting PGM3 causes breast cancer growth arrest and apoptosis. *Cell Death & Disease*. **9**(3), p.377.

Rieder, C.L. 2011. Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*. **19**(3), pp.291–306.

Rigbolt, K.T.G., Prokhorova, T.A., Akimov, V., Henningsen, J., Johansen, P.T., Kratchmarova, I., Kassem, M., Mann, M., Olsen, J.V. and Blagoev, B. 2011. System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Science Signaling*. **4**(164), p.rs3.

Rodrik-Outmezguine, V.S., Okaniwa, M., Yao, Z., Novotny, C.J., McWhirter, C., Banaji, A., Won, H., Wong, W., Berger, M., de Stanchina, E., Barratt, D.G., Cosulich, S., Klinowska, T., Rosen, N. and Shokat, K.M. 2016. Overcoming mTOR resistance mutations with a new-generation mTOR inhibitor. *Nature*. **534**(7606), pp.272–276.

Rozanski, W., Krzeslak, A., Forma, E., Brys, M., Blewniewski, M., Wozniak, P. and Lipinski, M. 2012. Prediction of bladder cancer based on urinary content of MGEA5 and OGT mRNA level. *Clinical Laboratory*. **58**(5–6), pp.579–583.

Ruan, H.-B., Han, X., Li, M.-D., Singh, J.P., Qian, K., Azarhoush, S., Zhao, L., Bennett, A.M., Samuel, V.T., Wu, J., Yates, J.R. and Yang, X. 2012. O-GlcNAc transferase/host cell factor C1 complex regulates gluconeogenesis by modulating PGC-1α stability. *Cell Metabolism*. **16**(2), pp.226–237.

Ryczko, M.C., Pawling, J., Chen, R., Abdel Rahman, A.M., Yau, K., Copeland, J.K., Zhang, C., Surendra, A., Guttman, D.S., Figeys, D. and Dennis, J.W. 2016. Metabolic Reprogramming by Hexosamine Biosynthetic and Golgi N-Glycan Branching Pathways. *Scientific Reports*. **6**, p.23043.

Ryu, I.-H. and Do, S.-I. 2011. Denitrosylation of S-nitrosylated OGT is triggered in LPS-stimulated innate immune response. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **408**(1), pp.52–57.

Ryu, I.-H., Lee, K.-Y. and Do, S.-I. 2016. Aβ-affected pathogenic induction of S-nitrosylation of OGT and identification of Cys-NO linkage triplet. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1864**(5), pp.609–621.

Sakabe, K., Wang, Z. and Hart, G.W. 2010. Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**(46), pp.19915–19920.

Sakaidani, Y., Nomura, T., Matsuura, A., Ito, M., Suzuki, E., Murakami, K., Nadano, D., Matsuda, T., Furukawa, K. and Okajima, T. 2011. O-Linked- N -acetylglucosamine on extracellular protein domains mediates epithelial cell–matrix interactions. *Nature Communications*. **2**(1), p.583.

Sakamaki, T., Casimiro, M.C., Ju, X., Quong, A.A., Katiyar, S., Liu, M., Jiao, X., Li, A., Zhang, X., Lu, Y., Wang, C., Byers, S., Nicholson, R., Link, T., Shemluck, M., Yang, J., Fricke, S.T., Novikoff, P.M., Papanikolaou, A., Arnold, A., Albanese, C. and Pestell, R. 2006. Cyclin D1 determines mitochondrial function in vivo. *Molecular and Cellular Biology*. **26**(14), pp.5449–5469.

Sakamoto, M. 2009. Early HCC: diagnosis and molecular markers. *Journal of Gastroenterology*. **44 Suppl 19**, pp.108–111.

Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A. and Sabatini, D.M. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular Cell*. **25**(6), pp.903–915.

Sapisochin, G. and Bruix, J. 2017. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: outcomes and novel surgical approaches. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*. **14**(4), pp.203–217.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D.M. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology: CB*. **14**(14), pp.1296–1302.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L. and Sabatini, D.M. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Molecular Cell*. **22**(2), pp.159–168.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. and Sabatini, D.M. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*. **307**(5712), pp.1098–1101.

Sarruf, D.A., Iankova, I., Abella, A., Assou, S., Miard, S. and Fajas, L. 2005. Cyclin D3 promotes adipogenesis through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Molecular and Cellular Biology*. **25**(22), pp.9985–9995.

Sato, S., Jung, H., Nakagawa, T., Pawlosky, R., Takeshima, T., Lee, W.-R., Sakiyama, H., Laxman, S., Wynn, R.M., Tu, B.P., MacMillan, J.B., De Brabander, J.K., Veech, R.L. and Uyeda, K. 2016. Metabolite Regulation of Nuclear Localization of Carbohydrate-response Element-binding Protein (ChREBP). *The Journal of Biological Chemistry*. **291**(20), pp.10515–10527.

Saung, M.T., Pelosof, L., Casak, S., Donoghue, M., Lemery, S., Yuan, M., Rodriguez, L., Schotland, P., Chuk, M., Davis, G., Goldberg, K.B., Theoret, M.R., Pazdur, R. and Fashoyin-Aje, L. 2021. FDA Approval Summary: Nivolumab Plus Ipilimumab for the Treatment of Patients with Hepatocellular Carcinoma Previously Treated with Sorafenib. *The Oncologist*.

Sawaguchi, S., Varshney, S., Ogawa, M., Sakaidani, Y., Yagi, H., Takeshita, K., Murohara, T., Kato, K., Sundaram, S., Stanley, P. and Okajima, T. 2017. O-GlcNAc on NOTCH1 EGF repeats regulates ligand-induced Notch signaling and vascular development in mammals H. Gerhardt, ed. *eLife*. **6**, p.e24419.

Schafer, K.A. 1998. The cell cycle: a review. *Veterinary Pathology*. **35**(6), pp.461–478.

Scheuermann, J.C., de Ayala Alonso, A.G., Oktaba, K., Ly-Hartig, N., McGinty, R.K., Fraterman, S., Wilm, M., Muir, T.W. and Müller, J. 2010. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature*. **465**(7295), pp.243–247.

Schirm, M., Kalmokoff, M., Aubry, A., Thibault, P., Sandoz, M. and Logan, S.M. 2004. Flagellin from Listeria monocytogenes Is Glycosylated with β-O-Linked N-Acetylglucosamine. *Journal of Bacteriology*. **186**(20), pp.6721–6727.

Schultz, J.R., Tu, H., Luk, A., Repa, J.J., Medina, J.C., Li, L., Schwendner, S., Wang, S., Thoolen, M., Mangelsdorf, D.J., Lustig, K.D. and Shan, B. 2000. Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes & Development*. **14**(22), pp.2831–2838.

Schulze, K., Gasch, C., Staufer, K., Nashan, B., Lohse, A.W., Pantel, K., Riethdorf, S. and Wege, H. 2013. Presence of EpCAM-positive circulating tumor cells as biomarker for systemic disease strongly correlates to survival in patients with hepatocellular carcinoma. *International Journal of Cancer*. **133**(9), pp.2165–2171.

Schulze, K., Imbeaud, S., Letouzé, E., Alexandrov, L.B., Calderaro, J., Rebouissou, S., Couchy, G., Meiller, C., Shinde, J., Soysouvanh, F., Calatayud, A.-L., Pinyol, R., Pelletier, L., Balabaud, C., Laurent, A., Blanc, J.-F., Mazzaferro, V., Calvo, F., Villanueva, A., Nault, J.-C., Bioulac-Sage, P., Stratton, M.R., Llovet, J.M. and Zucman-Rossi, J. 2015. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature Genetics*. **47**(5), pp.505–511.

Selnick, H.G., Hess, J.F., Tang, C., Liu, K., Schachter, J.B., Ballard, J.E., Marcus, J., Klein, D.J., Wang, X., Pearson, M., Savage, M.J., Kaul, R., Li, T.-S., Vocadlo, D.J., Zhou, Y., Zhu, Y., Mu, C., Wang, Y., Wei, Z., Bai, C., Duffy, J.L. and McEachern, E.J. 2019. Discovery of MK-8719, a Potent O-GlcNAcase Inhibitor as a Potential Treatment for Tauopathies. *Journal of Medicinal Chemistry*. **62**(22), pp.10062–10097.

Semenza, G.L. 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. **148**(3), pp.399–408.

Seo, H.G., Kim, H.B., Kang, M.J., Ryum, J.H., Yi, E.C. and Cho, J.W. 2016. Identification of the nuclear localisation signal of O -GlcNAc transferase and its nuclear import regulation. *Scientific Reports*. **6**(1), p.34614.

Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D.L., Vetrini, F., Erdin, Serkan, Erdin, SerpilUckac, Huynh, T., Ferron, M., Karsenty, G., Vellard, M.C., Facchinetti, V., Sabatini, D.M. and Ballabio, A. 2012. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO journal*. **31**(5), pp.1095–1108.

Shackelford, D.B. and Shaw, R.J. 2009. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature Reviews. Cancer*. **9**(8), pp.563–575.

Shafi, R., Iyer, S.P.N., Ellies, L.G., O'Donnell, N., Marek, K.W., Chui, D., Hart, G.W. and Marth, J.D. 2000. The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **97**(11), pp.5735–5739.

Shah, U.S., Dhir, R., Gollin, S.M., Chandran, U.R., Lewis, D., Acquafondata, M. and Pflug, B.R. 2006. Fatty acid synthase gene overexpression and copy number gain in prostate adenocarcinoma. *Human Pathology*. **37**(4), pp.401–409.

Shaheen, R., Aglan, M., Keppler-Noreuil, K., Faqeih, E., Ansari, S., Horton, K., Ashour, A., Zaki, M.S., Al-Zahrani, F., Cueto-González, A.M., Abdel-Salam, G., Temtamy, S. and Alkuraya, F.S. 2013. Mutations in EOGT confirm the genetic heterogeneity of autosomal-recessive Adams-Oliver syndrome. *American Journal of Human Genetics*. **92**(4), pp.598–604.

Sharma, K., D'Souza, R.C.J., Tyanova, S., Schaab, C., Wiśniewski, J.R., Cox, J. and Mann, M. 2014. Ultradeep human phosphoproteome reveals a distinct regulatory nature of Tyr and Ser/Thr-based signaling. *Cell Reports*. **8**(5), pp.1583–1594.

Sharma, N.S., Gupta, V.K., Dauer, P., Kesh, K., Hadad, R., Giri, B., Chandra, A., Dudeja, V., Slawson, C., Banerjee, Santanu, Vickers, S.M., Saluja, A. and Banerjee, Sulagna 2019. O-GlcNAc modification of Sox2 regulates self-renewal in pancreatic cancer by promoting its stability. *Theranostics*. **9**(12), pp.3410–3424.

Shaw, R.J. and Cantley, L.C. 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature*. **441**(7092), pp.424–430.

Sherman, M. 2014. Surveillance for hepatocellular carcinoma. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*. **28**(5), pp.783–793.

Shi, H.B., Zhang, C.H., Xu, Z.A., Xu, X.F., Lv, Z.B., Luo, J. and Loor, J.J. 2017. Nuclear receptor subfamily 1 group H member 2 (LXRB) is the predominant liver X receptor subtype regulating transcription of 2 major lipogenic genes in goat primary mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*. **100**(8), pp.6743–6752.

Shi, J., Gu, Jin-hua, Dai, C., Gu, Jianlan, Jin, X., Sun, J., Iqbal, K., Liu, F. and Gong, C.-X. 2015. O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling. *Scientific Reports*. **5**(1), p.14500.

Shirasaki, T., Honda, M., Shimakami, T., Horii, R., Yamashita, T., Sakai, Y., Sakai, A., Okada, H., Watanabe, R., Murakami, S., Yi, M., Lemon, S.M. and Kaneko, S. 2013. MicroRNA-27a Regulates Lipid Metabolism and Inhibits Hepatitis C Virus Replication in Human Hepatoma Cells. *Journal of Virology*. **87**(9), pp.5270–5286.

Singh, J.P., Qian, K., Lee, J.-S., Zhou, J., Han, X., Zhang, B., Ong, Q., Ni, W., Jiang, M., Ruan, H.-B., Li, M.-D., Zhang, K., Ding, Z., Lee, P., Singh, K., Wu, J., Herzog, R.I., Kaech, S., Wendel, H.-G., Yates, J.R., Han, W., Sherwin, R.S., Nie, Y. and Yang, X. 2020. O-GlcNAcase targets pyruvate kinase M2 to regulate tumor growth. *Oncogene*. **39**(3), pp.560–573.

Singh, P., Saxena, R., Srinivas, G., Pande, G. and Chattopadhyay, A. 2013. Cholesterol biosynthesis and homeostasis in regulation of the cell cycle. *PloS One*. **8**(3), p.e58833.

Slawson, C., Lakshmanan, T., Knapp, S. and Hart, G.W. 2008. A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Molecular biology of the cell*. **19**(10), pp.4130–4140.

Slawson, C., Shafii, S., Amburgey, J. and Potter, R. 2002. Characterization of the O-GlcNAc protein modification in Xenopus laevis oocyte during oogenesis and progesterone-stimulated maturation. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **1573**(2), pp.121–129.

Slawson, C., Zachara, N.E., Vosseller, K., Cheung, W.D., Lane, M.D. and Hart, G.W. 2005. Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *The Journal of Biological Chemistry*. **280**(38), pp.32944–32956.

Sodi, V.L., Bacigalupa, Z.A., Ferrer, C.M., Lee, J.V., Gocal, W.A., Mukhopadhyay, D., Wellen, K.E., Ivan, M. and Reginato, M.J. 2018. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase controls cancer lipid metabolism via SREBP-1 regulation. *Oncogene*. **37**(7), pp.924–934.

Sodi, V.L., Khaku, S., Krutilina, R., Schwab, L.P., Vocadlo, D.J., Seagroves, T.N. and Reginato, M.J. 2015. mTOR/MYC Axis Regulates O-GlcNAc Transferase Expression and O-GlcNAcylation in Breast Cancer. *Molecular Cancer Research*. **13**(5), pp.923–933.

Soesanto, Y.A., Luo, B., Jones, D., Taylor, R., Gabrielsen, J.S., Parker, G. and McClain, D.A. 2008. Regulation of Akt signaling by O-GlcNAc in euglycemia. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. **295**(4), pp.E974-980.

Song, Z., Xiaoli, A.M. and Yang, F. 2018. Regulation and Metabolic Significance of De Novo Lipogenesis in Adipose Tissues. *Nutrients*. **10**(10).

Sourdioux, M., Brevelet, C., Delabrosse, Y. and Douaire, M. 1999. Association of fatty acid synthase gene and malic enzyme gene polymorphisms with fatness in turkeys. *Poultry Science*. **78**(12), pp.1651–1657.

Starr, C.M. and Hanover, J.A. 1990. Glycosylation of nuclear pore protein p62. Reticulocyte lysate catalyzes O-linked N-acetylglucosamine addition in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. **265**(12), pp.6868–6873.

Stine, Z.E., Walton, Z.E., Altman, B.J., Hsieh, A.L. and Dang, C.V. 2015. MYC, Metabolism, and Cancer. *Cancer Discovery*. **5**(10), pp.1024–1039.

Stoops, J.K., Ross, P., Arslanian, M.J., Aune, K.C., Wakil, S.J. and Oliver, R.M. 1979. Physicochemical studies of the rat liver and adipose fatty acid synthetases. *The Journal of Biological Chemistry*. **254**(15), pp.7418–7426.

Stoops, J.K. and Wakil, S.J. 1981. Animal fatty acid synthetase. A novel arrangement of the beta-ketoacyl synthetase sites comprising domains of the two subunits. *The Journal of Biological Chemistry*. **256**(10), pp.5128–5133.

Suburu, J., Shi, L., Wu, J., Wang, S., Samuel, M., Thomas, M.J., Kock, N.D., Yang, G., Kridel, S. and Chen, Y.Q. 2014. Fatty acid synthase is required for mammary gland development and milk production during lactation. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. **306**(10), pp.E1132-1143.

Sukowati, C.H.C. 2019. Heterogeneity of Hepatic Cancer Stem Cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **1139**, pp.59–81.

Sun, L.-P., Seemann, J., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**(16), pp.6519–6526.

Sun, T., Liu, Y., Liu, L. and Ma, F. 2020. MicroRNA-544 attenuates diabetic renal injury via suppressing glomerulosclerosis and inflammation by targeting FASN. *Gene*. **723**, p.143986.

Sun, Y.-F., Xu, Y., Yang, X.-R., Guo, W., Zhang, X., Qiu, S.-J., Shi, R.-Y., Hu, B., Zhou, J. and Fan, J. 2013. Circulating stem cell-like epithelial cell adhesion molecule-positive tumor cells indicate poor prognosis of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Hepatology (Baltimore, Md.)*. **57**(4), pp.1458–1468.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. and Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. **71**(3), pp.209–249.

Swain, S.M., Tseng, T.S. and Olszewski, N.E. 2001. Altered expression of SPINDLY affects gibberellin response and plant development. *Plant Physiology*. **126**(3), pp.1174–1185.

Swamy, M., Pathak, S., Grzes, K.M., Damerow, S., Sinclair, L.V., van Aalten, D.M.F. and Cantrell, D.A. 2016. Glucose and glutamine fuel protein O-GlcNAcylation to control T cell self-renewal and malignancy. *Nature Immunology*. **17**(6), pp.712–720.

Swinnen, J.V., Van Veldhoven, P.P., Timmermans, L., De Schrijver, E., Brusselmans, K., Vanderhoydonc, F., Van de Sande, T., Heemers, H., Heyns, W. and Verhoeven, G. 2003. Fatty acid synthase

drives the synthesis of phospholipids partitioning into detergent-resistant membrane microdomains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **302**(4), pp.898–903.

Tabrizian, P., Jibara, G., Shrager, B., Schwartz, M. and Roayaie, S. 2015. Recurrence of hepatocellular cancer after resection: patterns, treatments, and prognosis. *Annals of Surgery*. **261**(5), pp.947–955.

Tallent, M.K., Varghis, N., Skorobogatko, Y., Hernandez-Cuebas, L., Whelan, K., Vocadlo, D.J. and Vosseller, K. 2009. In vivo modulation of O-GlcNAc levels regulates hippocampal synaptic plasticity through interplay with phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(1), pp.174–181.

Tan, J.Z.A. and Gleeson, P.A. 2019. The role of membrane trafficking in the processing of amyloid precursor protein and production of amyloid peptides in Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta. Biomembranes*. **1861**(4), pp.697–712.

Tan, Z.-W., Fei, G., Paulo, J.A., Bellaousov, S., Martin, S.E.S., Duveau, D.Y., Thomas, C.J., Gygi, S.P., Boutz, P.L. and Walker, S. 2020. O-GlcNAc regulates gene expression by controlling detained intron splicing. *Nucleic Acids Research*. **48**(10), pp.5656–5669.

Taylor, R.P., Geisler, T.S., Chambers, J.H. and McClain, D.A. 2009. Up-regulation of O-GlcNAc transferase with glucose deprivation in HepG2 cells is mediated by decreased hexosamine pathway flux. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(6), pp.3425–3432.

Taylor, R.P., Parker, G.J., Hazel, M.W., Soesanto, Y., Fuller, W., Yazzie, M.J. and McClain, D.A. 2008. Glucose Deprivation Stimulates O-GlcNAc Modification of Proteins through Up-regulation of O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. **283**(10), pp.6050–6057.

Teo, C.F., Wollaston-Hayden, E.E. and Wells, L. 2010. Hexosamine flux, the O-GlcNAc modification, and the development of insulin resistance in adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. **318**(1–2), pp.44–53.

Thiery, J.P. and Sleeman, J.P. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **7**(2), pp.131–142.

Thorgeirsson, S.S. and Grisham, J.W. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*. **31**(4), pp.339–346.

Tomic, J., McCaw, L., Li, Y., Hough, M.R., Ben-David, Y., Moffat, J. and Spaner, D.E. 2013. Resveratrol has anti-leukemic activity associated with decreased O-GlcNAcylated proteins. *Experimental Hematology*. **41**(8), pp.675–686.

Torres, C.R. and Hart, G.W. 1984. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *The Journal of Biological Chemistry*. **259**(5), pp.3308–3317.

Torres-Gutiérrez, E., Pérez-Cervera, Y., Camoin, L., Zenteno, E., Aquino-Gil, M.O., Lefebvre, T., Cabrera-Bravo, M., Reynoso-Ducoing, O., Bucio-Torres, M.I. and Salazar-Schettino, P.M. 2019. Identification of O-Glcnacylated Proteins in Trypanosoma cruzi. *Frontiers in Endocrinology*. **10**, p.199.

Trapannone, R., Mariappa, D., Ferenbach, A.T. and vanAalten, D.M.F. 2016. Nucleocytoplasmic human O-GlcNAc transferase is sufficient for O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins. *Biochemical Journal*. **473**(12), pp.1693–1702.

Traxinger, R.R. and Marshall, S. 1991. Coordinated regulation of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity by insulin, glucose, and glutamine. Role of hexosamine biosynthesis in enzyme regulation. *The Journal of Biological Chemistry*. **266**(16), pp.10148–10154.

Trinidad, J.C., Barkan, D.T., Gulledge, B.F., Thalhammer, A., Sali, A., Schoepfer, R. and Burlingame, A.L. 2012. Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Molecular & Cellular Proteomics*. **11**(8), pp.215–229.

Vaidyanathan, K., Niranjan, T., Selvan, N., Teo, C.F., May, M., Patel, S., Weatherly, B., Skinner, C., Opitz, J., Carey, J., Viskochil, D., Gecz, J., Shaw, M., Peng, Y., Alexov, E., Wang, T., Schwartz, C. and Wells, L. 2017. Identification and characterization of a missense mutation in the O-linked β-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) transferase gene that segregates with X-linked intellectual disability. *The Journal of Biological Chemistry*. **292**(21), pp.8948–8963.

Vander Haar, E., Lee, S.-I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J. and Kim, D.-H. 2007. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biology*. **9**(3), pp.316–323.

Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Lupu, R. and Menendez, J.A. 2008. Overexpression of fatty acid synthase gene activates HER1/HER2 tyrosine kinase receptors in human breast epithelial cells. *Cell Proliferation*. **41**(1), pp.59–85.

Vazquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J. and Menendez, J.A. 2007. Pharmacological blockade of fatty acid synthase (FASN) reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin by transcriptionally inhibiting 'HER2 super-expression' occurring in high-dose trastuzumab-conditioned SKBR3/Tzb100 breast cancer cells. *International Journal of Oncology*. **31**(4), pp.769–776.

Veigel, D., Wagner, R., Stübiger, G., Wuczkowski, M., Filipits, M., Horvat, R., Benhamú, B., López-Rodríguez, M.L., Leisser, A., Valent, P., Grusch, M., Hegardt, F.G., García, J., Serra, D., Auersperg, N., Colomer, R. and Grunt, T.W. 2015. Fatty acid synthase is a metabolic marker of cell proliferation rather than malignancy in ovarian cancer and its precursor cells. *International Journal of Cancer*. **136**(9), pp.2078–2090.

Vella, P., Scelfo, A., Jammula, S., Chiacchiera, F., Williams, K., Cuomo, A., Roberto, A., Christensen, J., Bonaldi, T., Helin, K. and Pasini, D. 2013. Tet Proteins Connect the O-Linked N-acetylglucosamine Transferase Ogt to Chromatin in Embryonic Stem Cells. *Molecular Cell*. **49**(4), pp.645–656.

Ventura, R., Mordec, K., Waszczuk, J., Wang, Z., Lai, J., Fridlib, M., Buckley, D., Kemble, G. and Heuer, T.S. 2015. Inhibition of de novo Palmitate Synthesis by Fatty Acid Synthase Induces Apoptosis in Tumor Cells by Remodeling Cell Membranes, Inhibiting Signaling Pathways, and Reprogramming Gene Expression. *EBioMedicine*. **2**(8), pp.808–824.

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

Vigneron, S., Sundermann, L., Labbé, J.-C., Pintard, L., Radulescu, O., Castro, A. and Lorca, T. 2018. Cyclin A-cdk1-Dependent Phosphorylation of Bora Is the Triggering Factor Promoting Mitotic Entry. *Developmental Cell*. **45**(5), pp.637-650.e7.

Villanueva, A., Hoshida, Y., Battiston, C., Tovar, V., Sia, D., Alsinet, C., Cornella, H., Liberzon, A., Kobayashi, M., Kumada, H., Thung, S.N., Bruix, J., Newell, P., April, C., Fan, J.-B., Roayaie, S., Mazzaferro, V., Schwartz, M.E. and Llovet, J.M. 2011. Combining clinical, pathology, and gene expression data to predict recurrence of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. **140**(5), pp.1501-1512.e2.

Visca, P., Sebastiani, V., Botti, C., Diodoro, M.G., Lasagni, R.P., Romagnoli, F., Brenna, A., De Joannon, B.C., Donnorso, R.P., Lombardi, G. and Alo, P.L. 2004. Fatty acid synthase (FAS) is a marker of increased risk of recurrence in lung carcinoma. *Anticancer Research*. **24**(6), pp.4169–4173.

Vocadlo, D.J. 2012. O-GlcNAc processing enzymes: catalytic mechanisms, substrate specificity, and enzyme regulation. *Current Opinion in Chemical Biology*. **16**(5–6), pp.488–497.

Vosseller, K., Trinidad, J.C., Chalkley, R.J., Specht, C.G., Thalhammer, A., Lynn, A.J., Snedecor, J.O., Guan, S., Medzihradszky, K.F., Maltby, D.A., Schoepfer, R. and Burlingame, A.L. 2006. O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry. *Molecular & cellular proteomics: MCP*. **5**(5), pp.923–934.

Vosseller, K., Wells, L., Lane, M.D. and Hart, G.W. 2002. Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**(8), pp.5313–5318.

Wagle, S., Bui, A., Ballard, P.L., Shuman, H., Gonzales, J. and Gonzales, L.W. 1999. Hormonal regulation and cellular localization of fatty acid synthase in human fetal lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. **277**(2), pp.L381–L390.

Wagner, R., Stübiger, G., Veigel, D., Wuczkowski, M., Lanzerstorfer, P., Weghuber, J., Karteris, E., Nowikovsky, K., Wilfinger-Lutz, N., Singer, C.F., Colomer, R., Benhamú, B., López-Rodríguez, M.L., Valent, P. and Grunt, T.W. 2017. Multi-level suppression of receptor-PI3K-mTORC1 by fatty acid synthase inhibitors is crucial for their efficacy against ovarian cancer cells. *Oncotarget*. **8**(7), pp.11600–11613.

Wagner, S.A., Beli, P., Weinert, B.T., Nielsen, M.L., Cox, J., Mann, M. and Choudhary, C. 2011. A Proteome-wide, Quantitative Survey of In Vivo Ubiquitylation Sites Reveals Widespread Regulatory Roles. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*. **10**(10), M111.013284.

Walter, K., Hong, S.-M., Nyhan, S., Canto, M., Fedarko, N., Klein, A., Griffith, M., Omura, N., Medghalchi, S., Kuhajda, F. and Goggins, M. 2009. Serum Fatty Acid Synthase as a Marker of Pancreatic Neoplasia. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. **18**(9), pp.2380–2385.

Wang, C., Li, Z., Lu, Y., Du, R., Katiyar, S., Yang, J., Fu, M., Leader, J.E., Quong, A., Novikoff, P.M. and Pestell, R.G. 2006. Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**(31), pp.11567–11572.

Wang, D. and Sul, H.S. 1997. Upstream stimulatory factor binding to the E-box at -65 is required for insulin regulation of the fatty acid synthase promoter. *The Journal of Biological Chemistry*. **272**(42), pp.26367–26374.

Wang, J., Liu, R., Hawkins, M., Barzilai, N. and Rossetti, L. 1998. A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature*. **393**(6686), pp.684–688.

Wang, L., Feng, Y., Zhang, C., Chen, X., Huang, H., Li, W., Zhang, J. and Liu, Y. 2021. Upregulation of OGT by Caveolin-1 promotes hepatocellular carcinoma cell migration and invasion. *Cell Biology International*.

Wang, Y., Liu, J., Jin, X., Zhang, D., Li, D., Hao, F., Feng, Y., Gu, S., Meng, F., Tian, M., Zheng, Y., Xin, L., Zhang, X., Han, X., Aravind, L. and Wei, M. 2017. O-GlcNAcylation destabilizes the active tetrameric PKM2 to promote the Warburg effect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **114**(52), pp.13732–13737.

Wang, Z., Gucek, M. and Hart, G.W. 2008. Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**(37), pp.13793–13798.

Wang, Z., Park, K., Comer, F., Hsieh-Wilson, L.C., Saudek, C.D. and Hart, G.W. 2009. Site-Specific GlcNAcylation of Human Erythrocyte Proteins: Potential Biomarker(s) for Diabetes. *Diabetes*. **58**(2), pp.309–317.

Wang, Z., Sheng, Y.-Y., Gao, X.-M., Wang, C.-Q., Wang, X.-Y., Lu, X.U., Wei, J.-W., Zhang, K.-L., Dong, Q.-Z. and Qin, L.-X. 2015. β-catenin mutation is correlated with a favorable prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Molecular and Clinical Oncology*. **3**(4), pp.936–940.

Wang, Z.V., Deng, Y., Gao, N., Pedrozo, Z., Li, D.L., Morales, C.R., Criollo, A., Luo, X., Tan, W., Jiang, N., Lehrman, M.A., Rothermel, B.A., Lee, A.-H., Lavandero, S., Mammen, P.P.A., Ferdous, A., Gillette, T.G., Scherer, P.E. and Hill, J.A. 2014. Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway. *Cell*. **156**(6), pp.1179–1192.

Wani, W.Y., Chatham, J.C., Darley-Usmar, V., McMahon, L.L. and Zhang, J. 2017. O-GlcNAcylation and neurodegeneration. *Brain Research Bulletin*. **133**, pp.80–87.

Wani, W.Y., Ouyang, X., Benavides, G.A., Redmann, M., Cofield, S.S., Shacka, J.J., Chatham, J.C., Darley-Usmar, V. and Zhang, J. 2017. O-GlcNAc regulation of autophagy and α-synuclein homeostasis; implications for Parkinson's disease. *Molecular Brain*. **10**(1), p.32.

Warburg, O. 1956. [Origin of cancer cells]. *Oncologia*. **9**(2), pp.75–83.

Webster, D.M., Teo, C., Sun, Y., Wloga, D., Gay, S., Klonowski, K.D., Wells, L. and Dougan, S.T. 2009. O-GlcNAc modifications regulate cell survival and epiboly during zebrafish development. *BMC Developmental Biology*. **9**(1), p.28.

Wei, X., Yang, Z., Rey, F.E., Ridaura, V.K., Davidson, N.O., Gordon, J.I. and Semenkovich, C.F. 2012. Fatty Acid Synthase Modulates Intestinal Barrier Function through Palmitoylation of Mucin 2. *Cell host & microbe*. **11**(2), pp.140–152.

Weihofen, W.A., Berger, M., Chen, H., Saenger, W. and Hinderlich, S. 2006. Structures of human N-Acetylglucosamine kinase in two complexes with N-Acetylglucosamine and with ADP/glucose:

insights into substrate specificity and regulation. *Journal of Molecular Biology*. **364**(3), pp.388–399.

Welcker, M. and Clurman, B.E. 2008. FBW7 ubiquitin ligase: a tumour suppressor at the crossroads of cell division, growth and differentiation. *Nature Reviews. Cancer*. **8**(2), pp.83–93.

Wells, L., Slawson, C. and Hart, G.W. 2011. The E2F-1 associated retinoblastoma-susceptibility gene product is modified by O-GlcNAc. *Amino Acids*. **40**(3), pp.877–883.

WENZEL, E.S. and SINGH, A.T.K. 2018. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. *In Vivo*. **32**(1), pp.1–5.

Wesierska-Gadek, J., Wojciechowski, J., Ranftler, C. and Schmid, G. 2005. Role of p53 tumor suppressor in ageing: regulation of transient cell cycle arrest and terminal senescence. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*. **56**(1), pp.15–28.

Whelan, S.A., Dias, W.B., Thiruneelakantapillai, L., Lane, M.D. and Hart, G.W. 2010. Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**(8), pp.5204–5211.

Whelan, S.A., Lane, M.D. and Hart, G.W. 2008. Regulation of the O-Linked -N-Acetylglucosamine Transferase by Insulin Signaling. *Journal of Biological Chemistry*. **283**(31), pp.21411–21417.

Whisenhunt, T.R., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., Van Tine, B.A. and Kudlow, J.E. 2006. Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology*. **16**(6), pp.551–563.

Witkowski, A., Ghosal, A., Joshi, A.K., Witkowska, H.E., Asturias, F.J. and Smith, S. 2004. Head-to-head coiled arrangement of the subunits of the animal fatty acid synthase. *Chemistry & Biology*. **11**(12), pp.1667–1676.

Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K.H. and Beach, D. 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science (New York, N.Y.)*. **269**(5228), pp.1281–1284.

Wong, K.-K., Engelman, J.A. and Cantley, L.C. 2010. Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*. **20**(1), pp.87–90.

Woosley, B., Xie, M., Wells, L., Orlando, R., Garrison, D., King, D. and Bergmann, C. 2006. Comprehensive glycan analysis of recombinant Aspergillus niger endo-polygalacturonase C. *Analytical Biochemistry*. **354**(1), pp.43–53.

Worth, M., Hu, C.-W., Li, H., Fan, D., Estevez, A., Zhu, D., Wang, A. and Jiang, J. 2019. Targeted covalent inhibition of O-GlcNAc transferase in cells. *Chemical Communications (Cambridge, England)*. **55**(88), pp.13291–13294.

Wulff-Fuentes, E., Berendt, R.R., Massman, L., Danner, L., Malard, F., Vora, J., Kahsay, R. and Olivier-Van Stichelen, S. 2021. The human O-GlcNAcome database and meta-analysis. *Scientific Data*. **8**(1), p.25.

Xu, H.F., Luo, J., Wang, H.P., Wang, H., Zhang, T.Y., Tian, H.B., Yao, D.W. and Loor, J.J. 2016. Sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1)c promoter: Characterization and transcriptional regulation by mature SREBP-1 and liver X receptor α in goat mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*. **99**(2), pp.1595–1604.

Xu, M., Sheppard, K.A., Peng, C.Y., Yee, A.S. and Piwnica-Worms, H. 1994. Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Molecular and Cellular Biology*. **14**(12), pp.8420–8431.

Xu, R.-H., Wei, W., Krawczyk, M., Wang, W., Luo, H., Flagg, K., Yi, S., Shi, W., Quan, Q., Li, K., Zheng, L., Zhang, H., Caughey, B.A., Zhao, Q., Hou, J., Zhang, R., Xu, Y., Cai, H., Li, G., Hou, R., Zhong, Z., Lin, D., Fu, X., Zhu, J., Duan, Y., Yu, M., Ying, B., Zhang, W., Wang, J., Zhang, E., Zhang, C., Li, O., Guo, R., Carter, H., Zhu, J.-K., Hao, X. and Zhang, K. 2017. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Nature Materials*. **16**(11), pp.1155–1161.

Xu, W., Zhang, X., Wu, J.-L., Fu, L., Liu, K., Liu, D., Chen, G.G., Lai, P.B.-S., Wong, N. and Yu, J. 2017. O-GlcNAc transferase promotes fatty liver-associated liver cancer through inducing palmitic acid and activating endoplasmic reticulum stress. *Journal of Hepatology*. **67**(2), pp.310–320.

Yahagi, N., Shimano, H., Hasegawa, K., Ohashi, Kenichi, Matsuzaka, T., Najima, Y., Sekiya, M., Tomita, S., Okazaki, H., Tamura, Y., Iizuka, Y., Ohashi, Ken, Nagai, R., Ishibashi, S., Kadowaki, T., Makuuchi, M., Ohnishi, S., Osuga, J. and Yamada, N. 2005. Co-ordinate activation of lipogenic enzymes in hepatocellular carcinoma. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*. **41**(9), pp.1316–1322.

Yalcin, A., Clem, B.F., Simmons, A., Lane, A., Nelson, K., Clem, A.L., Brock, E., Siow, D., Wattenberg, B., Telang, S. and Chesney, J. 2009. Nuclear targeting of 6-phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) increases proliferation via cyclin-dependent kinases. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(36), pp.24223–24232.

Yamashita, T., Honda, M., Takatori, H., Nishino, R., Minato, H., Takamura, H., Ohta, T. and Kaneko, S. 2009. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. **50**(1), pp.100–110.

Yang, H., Jiang, X., Li, B., Yang, H.J., Miller, M., Yang, A., Dhar, A. and Pavletich, N.P. 2017. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. *Nature*. **552**(7685), pp.368–373.

Yang, H., Rudge, D.G., Koos, J.D., Vaidialingam, B., Yang, H.J. and Pavletich, N.P. 2013. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature*. **497**(7448), pp.217–223.

Yang, Q., Inoki, K., Ikenoue, T. and Guan, K.-L. 2006. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes & Development*. **20**(20), pp.2820–2832.

Yang, S., Zou, L.-Y., Bounelis, P., Chaudry, I., Chatham, J.C. and Marchase, R.B. 2006. Glucosamine administration during resuscitation improves organ function after trauma hemorrhage. *Shock (Augusta, Ga.)*. **25**(6), pp.600–607.

Yang, W., Xia, Y., Ji, H., Zheng, Y., Liang, J., Huang, W., Gao, X., Aldape, K. and Lu, Z. 2017. Corrigendum: Nuclear PKM2 regulates β-catenin transactivation upon EGFR activation. *Nature*. **550**(7674), p.142.

Yang, W.H., Kim, J.E., Nam, H.W., Ju, J.W., Kim, H.S., Kim, Y.S. and Cho, J.W. 2006. Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nature Cell Biology*. **8**(10), pp.1074–1083.

Yang, X., Ongusaha, P.P., Miles, P.D., Havstad, J.C., Zhang, F., So, W.V., Kudlow, J.E., Michell, R.H., Olefsky, J.M., Field, S.J. and Evans, R.M. 2008. Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*. **451**(7181), pp.964–969.

Yang, X., Zhang, F. and Kudlow, J.E. 2002. Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell*. **110**(1), pp.69–80.

Yang, Y., Vankayalapati, H., Tang, M., Zheng, Y., Li, Y., Ma, C. and Lai, K. 2020. Discovery of Novel Inhibitors Targeting Multi-UDP-hexose Pyrophosphorylases as Anticancer Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*. **25**(3), p.E645.

Yang, Y., Yin, X., Yang, H. and Xu, Y. 2015. Histone Demethylase LSD2 Acts as an E3 Ubiquitin Ligase and Inhibits Cancer Cell Growth through Promoting Proteasomal Degradation of OGT. *Molecular Cell*. **58**(1), pp.47–59.

Yang, Y.R., 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. 2012a. O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell*. **11**(3), pp.439–448.

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. 2012b. O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell*. **11**(3), pp.439–448.

Yang, Z., Cappello, T. and Wang, L. 2015. Emerging role of microRNAs in lipid metabolism. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*. **5**(2), pp.145–150.

Yao, J.C., Fazio, N., Singh, S., Buzzoni, R., Carnaghi, C., Wolin, E., Tomasek, J., Raderer, M., Lahner, H., Voi, M., Pacaud, L.B., Rouyrre, N., Sachs, C., Valle, J.W., Fave, G.D., Van Cutsem, E., Tesselaar, M., Shimada, Y., Oh, D.-Y., Strosberg, J., Kulke, M.H., Pavel, M.E., and RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumours, Fourth Trial (RADIANT-4) Study Group 2016. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet (London, England)*. **387**(10022), pp.968–977.

Yao, J.C., Shah, M.H., Ito, T., Bohas, C.L., Wolin, E.M., Van Cutsem, E., Hobday, T.J., Okusaka, T., Capdevila, J., de Vries, E.G.E., Tomassetti, P., Pavel, M.E., Hoosen, S., Haas, T., Lincy, J., Lebwohl, D., Öberg, K., and RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group 2011. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *The New England Journal of Medicine*. **364**(6), pp.514–523.

Yellaturu, C.R., Deng, X., Park, E.A., Raghow, R. and Elam, M.B. 2009. Insulin Enhances the Biogenesis of Nuclear Sterol Regulatory Element-binding Protein (SREBP)-1c by Posttranscriptional Down-regulation of Insig-2A and Its Dissociation from SREBP Cleavage-activating Protein (SCAP)·SREBP-1c Complex. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**(46), pp.31726–31734.

Yi, W., Clark, P.M., Mason, D.E., Keenan, M.C., Hill, C., Goddard, W.A., Peters, E.C., Driggers, E.M. and Hsieh-Wilson, L.C. 2012. Phosphofructokinase 1 Glycosylation Regulates Cell Growth and Metabolism. *Science*. **337**(6097), pp.975–980.

Yi, X., Jiang, X.-J., Li, X.-Y. and Jiang, D.-S. 2015. Histone methyltransferases: novel targets for tumor and developmental defects. *American Journal of Translational Research*. **7**(11), pp.2159–2175.

Yoon, S., Lee, M.-Y., Park, S.W., Moon, J.-S., Koh, Y.-K., Ahn, Y.-H., Park, B.-W. and Kim, K.-S. 2007. Up-regulation of Acetyl-CoA Carboxylase α and Fatty Acid Synthase by Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 at the Translational Level in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*. **282**(36), pp.26122–26131.

Yu, F.Y., Zhou, C.Y., Liu, Y.B., Wang, B., Mao, L. and Li, Y. 2018. miR-483 is down-regulated in gastric cancer and suppresses cell proliferation, invasion and protein O-GlcNAcylation by targeting OGT. *Neoplasma*. **65**(3), pp.406–414.

Yu, L., McPhee, C.K., Zheng, L., Mardones, G.A., Rong, Y., Peng, J., Mi, N., Zhao, Y., Liu, Z., Wan, F., Hailey, D.W., Oorschot, V., Klumperman, J., Baehrecke, E.H. and Lenardo, M.J. 2010. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*. **465**(7300), pp.942–946.

Yuan, H.-X. and Guan, K.-L. 2015. The SIN1-PH Domain Connects mTORC2 to PI3K. *Cancer Discovery*. **5**(11), pp.1127–1129.

Yuan, T.L. and Cantley, L.C. 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene*. **27**(41), pp.5497–5510.

Yuzwa, S.A., Macauley, M.S., Heinonen, J.E., Shan, X., Dennis, R.J., He, Y., Whitworth, G.E., Stubbs, K.A., McEachern, E.J., Davies, G.J. and Vocadlo, D.J. 2008. A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nature Chemical Biology*. **4**(8), pp.483–490.

Zeidan, Q., Wang, Z., De Maio, A. and Hart, G.W. 2010. O-GlcNAc cycling enzymes associate with the translational machinery and modify core ribosomal proteins. *Molecular Biology of the Cell*. **21**(12), pp.1922–1936.

Zein, C.O., Unalp, A., Colvin, R., Liu, Y.-C., McCullough, A.J., and Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network 2011. Smoking and severity of hepatic fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology*. **54**(4), pp.753–759.

Zetterberg, A., Larsson, O. and Wiman, K.G. 1995. What is the restriction point? *Current Opinion in Cell Biology*. **7**(6), pp.835–842.

Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J. and Kudlow, J.E. 2003. O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell*. **115**(6), pp.715–725.

Zhang, P., Wang, C., Ma, T. and You, S. 2015. O-GlcNAcylation enhances the invasion of thyroid anaplastic cancer cells partially by PI3K/Akt1 pathway. *OncoTargets and Therapy*. **8**, pp.3305–3313.

Zhang, Q., Liu, X., Gao, W., Li, P., Hou, J., Li, J. and Wong, J. 2014. Differential Regulation of the Ten-Eleven Translocation (TET) Family of Dioxygenases by *O* -Linked β- *N* -Acetylglucosamine Transferase (OGT). *Journal of Biological Chemistry*. **289**(9), pp.5986–5996.

Zhang, S., Roche, K., Nasheuer, H.-P. and Lowndes, N.F. 2011. Modification of histones by sugar β-N-acetylglucosamine (GlcNAc) occurs on multiple residues, including histone H3 serine 10, and is cell cycle-regulated. *The Journal of Biological Chemistry*. **286**(43), pp.37483–37495.

Zhang, Z., Tan, E.P., VandenHull, N.J., Peterson, K.R. and Slawson, C. 2014. O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis. *Frontiers in Endocrinology*. **5**, p.206.

Zheng, C., Zheng, L., Yoo, J.-K., Guo, H., Zhang, Y., Guo, X., Kang, B., Hu, R., Huang, J.Y., Zhang, Q., Liu, Z., Dong, M., Hu, X., Ouyang, W., Peng, J. and Zhang, Z. 2017. Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell*. **169**(7), pp.1342-1356.e16.

Zhou, L., Huang, Y., Li, J. and Wang, Z. 2010. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*. **27**(2), pp.255–261.

Zhu, A.X., Kudo, M., Assenat, E., Cattan, S., Kang, Y.-K., Lim, H.Y., Poon, R.T.P., Blanc, J.-F., Vogel, A., Chen, C.-L., Dorval, E., Peck-Radosavljevic, M., Santoro, A., Daniele, B., Furuse, J., Jappe, A., Perraud, K., Anak, O., Sellami, D.B. and Chen, L.-T. 2014. Effect of everolimus on survival in advanced hepatocellular carcinoma after failure of sorafenib: the EVOLVE-1 randomized clinical trial. *JAMA*. **312**(1), pp.57–67.

Zhu, A.X., Park, J.O., Ryoo, B.-Y., Yen, C.-J., Poon, R., Pastorelli, D., Blanc, J.-F., Chung, H.C., Baron, A.D., Pfiffer, T.E.F., Okusaka, T., Kubackova, K., Trojan, J., Sastre, J., Chau, I., Chang, S.-C., Abada, P.B., Yang, L., Schwartz, J.D., Kudo, M., and REACH Trial Investigators 2015. Ramucirumab versus placebo as second-line treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma following first-line therapy with sorafenib (REACH): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*. **16**(7), pp.859–870.

Zhu, G., Tao, T., Zhang, D., Liu, X., Qiu, H., Han, L., Xu, Z., Xiao, Y., Cheng, C. and Shen, A. 2016. O-GlcNAcylation of histone deacetylases 1 in hepatocellular carcinoma promotes cancer progression. *Glycobiology*. **26**(8), pp.820–833.

Zhu, Q., Zhou, L., Yang, Z., Lai, M., Xie, H., Wu, L., Xing, C., Zhang, F. and Zheng, S. 2012. O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Medical Oncology*. **29**(2), pp.985–993.

Zhu, Y., Liu, T.-W., Cecioni, S., Eskandari, R., Zandberg, W.F. and Vocadlo, D.J. 2015. O-GlcNAc occurs cotranslationally to stabilize nascent polypeptide chains. *Nature Chemical Biology*. **11**(5), pp.319–325.

Zhu, Y., Willems, L.I., Salas, D., Cecioni, S., Wu, W.B., Foster, L.J. and Vocadlo, D.J. 2020. Tandem Bioorthogonal Labeling Uncovers Endogenous Cotranslationally O-GlcNAc Modified Nascent Proteins. *Journal of the American Chemical Society*. **142**(37), pp.15729–15739.

Zou, L., Yang, S., Champattanachai, V., Hu, S., Chaudry, I.H., Marchase, R.B. and Chatham, J.C. 2009. Glucosamine improves cardiac function following trauma-hemorrhage by increased protein O-GlcNAcylation and attenuation of NF-{kappa}B signaling. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*. **296**(2), pp.H515-523.

Zou, L., Yang, S., Hu, S., Chaudry, I.H., Marchase, R.B. and Chatham, J.C. 2007. The protective effects of PUGNAc on cardiac function after trauma-hemorrhage are mediated via increased protein O-GlcNAc levels. *Shock (Augusta, Ga.)*. **27**(4), pp.402–408.

Zu, X.L. and Guppy, M. 2004. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **313**(3), pp.459–465.

Zucman-Rossi, J., Villanueva, A., Nault, J.-C. and Llovet, J.M. 2015. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. **149**(5), pp.1226-1239.e4.