

ANNÉE 2021

N°

THÈSE
pour le
DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Charlotte BETUS

Présentée et soutenue publiquement le 20/10/2021

**Intérêts thérapeutiques de la modulation des
niveaux de O-GlcNAcylation**

Présidente : **Dr Christine Bobin-Dubigeon**, Maître de Conférences des Universités de Pharmacologie

Directrice : **Dr Edith Bigot-Corbel**, Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier de Biochimie clinique

Membres du jury : **Dr Benjamin Lauzier**, Maître de Conférences des Universités de Physiologie et Pharmacologie
Dr Cédric Logé, Maître de Conférences des Universités de Chimie Thérapeutique

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement et sincèrement toutes les personnes qui m'ont accompagnée, aidée, soutenue, supportée parfois, tout au long de mes années d'études en pharmacie et au cours de mon master 2 de science. Vous avez contribué à me faire grandir et mûrir.

Je remercie, **Dr Christine Bobin-Dubigeon, Maître de Conférences des Universités de Pharmacologie**, de me faire l'honneur de présider ce jury. De par votre confiance et votre disponibilité. Je vous remercie de m'avoir donné la possibilité de participer à la rédaction d'un cours de cinquième année sur les essais cliniques.

Je tiens à remercier **Dr Edith Bigot-Corbel, Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier de Biochimie clinique**, ma directrice de thèse qui m'a guidé à la rédaction. Je vous remercie pour votre aide et votre bienveillance. Je sais que j'ai pu partir dans tous les sens, merci d'avoir eu la patience et la gentillesse pour me recentrer dans la bonne direction.

Je remercie sincèrement et non sans émotion **Dr Benjamin Lauzier, Maître de Conférences des Universités de Physiologie et Pharmacologie**. Mon parcours scientifique a été un peu chamboulé en cette année 2021. Je te remercie aujourd'hui de m'avoir donné l'opportunité de réaliser un stage de recherche au sein de ton équipe et de découvrir la O-GlcNAcylation. Je te remercie de ta disponibilité, ton expertise et de ton aide dans toutes les situations. Merci pour ta confiance et de m'avoir donné les libertés nécessaires pour m'épanouir dans ce projet de recherche. Merci d'avoir passé autant de temps à me guider et souvent me recentrer. Je te suis très reconnaissante pour ton soutien tant sur le plan professionnel que personnel.

Je vous remercie, **Dr Cédric Logé, Maître de Conférences des Universités de Chimie Thérapeutique**, d'avoir accepté d'être membre de mon jury. **Dr Delphine Carbonnelle, Maître de Conférences des Universités de Physiologie**, je vous remercie d'être présente lors de ma soutenance de thèse et votre soutien au cours de ces nombreuses années. L'étudiante de deuxième année de pharmacie que j'étais et que vous avez rassuré a bien évolué. Il était important pour moi de vous compter parmi les membres de ce jury.

Je remercie tous mes professeurs de la faculté de pharmacie de Nantes pour ces cinq années riches en connaissances. **Dr Murielle Duflos, Professeur des Universités**, merci pour votre pédagogie et votre disponibilité auprès des étudiants. Je me sens épanouie et très fière d'avoir pu participer à vos enseignements.

Je tiens à remercier chaleureusement les deux co-responsables du master BBRT, **Yannick Guilloux et Benjamin Lauzier**, pour m'avoir accordé de suivre cette formation mais surtout merci pour votre bonne humeur, votre soutien et votre dévouement pour les étudiants. Un grand merci aux superbes personnes que j'ai rencontrées durant le master 2, **Morgane Krejbich, Lucie Gillet et Marie Pallard**. J'ai hâte de continuer à partager nos quotidiens de thésarde.

Ce travail expérimental a été réalisé à l'institut du thorax, INSERM UMR-1087 et CNRS-6291, dirigé par le **Dr. Richard Redon**. Je tiens à remercier **Michel de Waard** ainsi que **Benjamin Lauzier** pour m'avoir intégré à l'équipe IIb : Insuffisance cardiaque et approches pharmacologiques.

Je vous remercie **Lucine Marotte, Thomas Dupas, Ludivine Lopez, Thomas Pelé, Antoine Persello, Manon Denis, Anaïs Maillard, Elisa Bernard, Amandine Vergnaud, Angélique Blangy--Letheule, Virginie Aillerie, Angélique Erraud**. Merci **Lucine** pour m'avoir guidé ces dernières années

grâce à tes conseils et de continuer à passer de longs moments au téléphone depuis ton départ en post-doc à Marseille. Tu es une amie incroyable ! Merci à toi, **Toto**, pour m'avoir tout appris sur la O-GlcNAcylation mais surtout pour t'être levé très tôt afin de traiter les cellules. Même si ça n'a pas été toujours facile, merci de m'avoir supporté et d'avoir été là dans toutes les situations. Merci à **Thomas P**, je suis tellement contente d'avoir pu partager le bureau avec toi. Merci de me faire rire tous les jours, ta gentillesse et ton aide lors des dernières semaines de mon stage. Merci **Ludivine** pour toutes ces pauses passées ensemble et pour ton dévouement jusqu'au dernier moment à la rédaction de cette thèse. Sans oublier la partie électrophysiologie de l'équipe, Merci à **Jérôme Montnach, Sébastien, Oliver Brun, Barbara Ribeiro, Michel Ronjat et Michel de Waard** pour les réunions hebdomadaires au sein de l'équipe et vos questions très constructives. Je suis très heureuse d'avoir pu vous rencontrer.

Je tiens à remercier les chimistes du laboratoire CEISAM, **Jacques Lebreton, Arnaud Tessier** et particulièrement **Matthieu Rivière**. Merci pour votre disponibilité et merci pour toutes ces magnifiques figures de molécules présentes dans cette thèse.

Un immense et gigantesque merci à ma famille (**Maman, Salomé, Tata Rachel, Tata ciacia, Mamie de la montagne** et sans oublier mes petit(e)s cousin(e)s (**Margot, Daphné, Raphaël et Simon**). Je vous remercie tous pour votre soutien sans faille. Nous avons traversé des moments très difficiles mais il n'y a que de belles choses devant nous. Je tiens particulièrement à remercier **mamie de la montagne** pour ta gentillesse et ta générosité. Tu m'as offert un lieu de révision incroyable qui m'a permis d'arriver jusqu'à cette thèse de pharmacie. Je tiens à te remercier de tout mon cœur **Maman**. Je te remercie mille fois **Tata Rachel** pour tout ! Je crois bien que tu es la plus belle personne que je connaisse. Je voudrais également remercier ma petite sœur, **Salomé**, qui est une grande battante. Je t'admire énormément et je suis très fière de toi ! Je vous aime tellement fort et vous allez me manquer à Montréal ! Merci à mes grands-parents, **Monique et Alexis**. Merci à **Damien Betus** de m'avoir permis de réaliser de longues études.

Pour ce qui est de mon quotidien, je remercie particulièrement mes colocataires. Les merveilleux, les magnifiques, **Chloé Belaud, François Salomon, Amaury Texier, Alexandre Luda, Pierre Bordas-Larribe, Nathan Cornu**. Vous avez été des rayons de soleil durant cette année de pandémie. Je m'excuse d'avoir écrit sur toutes les vitres pendant la rédaction de la thèse malgré que vous m'avez offert un tableau Veleda. Je vous remercie de votre bonne humeur et de tous les moments qu'on a partagés ensemble mais ce n'est pas fini. Vous serez toujours les bienvenus à Montréal ! Quelle joie de t'avoir rencontré **Antoine Moureau**, j'ai hâte de continuer nos aventures pendant un bon moment.

A mes amis, **Marion Harat, Laetitia Placide, Charlène Savin, Paul Boinnot, Pauline Labé, Camille Delastre et Aurore Chetritt**. Je voulais vous remercier pour toutes ces années incroyables. Même si vous êtes parfois parti très loin à Paris, je vous remercie pour toutes ces années d'amitiés qui continueront encore pour un bon moment. **Marion**, je te remercie pour ton amitié sans faille, ton honnêteté et toutes ces soirées endiablées. **Laetitia**, je te remercie pour ta sincérité, ta générosité et pour tous ces fous-rires. Je serais là, quoi qu'il arrive. **Charlène**, je n'ai toujours pas les mots pour te remercier pour ces derniers mois. Merci de m'avoir aidé rebondir. Merci à toi **Paul** pour tous ces beaux moments de partage ! Je remercie mes coéquipiers de vaccination, **Marie-Tiphaine Bujoli, Geoffrey Legeay, Adam Mouhib**, pour leur bonne humeur.

Vous avez tous contribué à faire de moi, la personne que je suis aujourd'hui. Merci d'avoir cru en moi.

A tous, merci ...

SOMMAIRE

ABREVIATION	I
FIGURES	III
TABLEAUX	V
AVANT -PROPOS	VI
Partie 1 : Connaissances générales sur la voie de biosynthèses des hexosamines et la O-GlcNAcylation au niveau physio-pathologique	1
I) Introduction généraliste	1
A) Les modifications post-traductionnelles des protéines	1
B) Définition de la O-GlcNAcylation	3
II) Implication de la O-GlcNAcylation dans l'organisme	6
A) Phylogénie de la O-GlcNAcylation +	6
B) Localisation de la O-GlcNAcylation	6
1) Les différents organes ayant des protéines O-GlcNAcylées	6
2) Implication de la O-GlcNAcylation au niveau cellulaire	7
C) Les rôles de la O-GlcNAcylation à différentes échelles du corps humain	8
1) Le trafic de protéines et des organelles	9
2) La réponse cellulaire au stress	9
D) La O-GlcNAcylation et organites cellulaires spécifiques	9
E) La voie de biosynthèse des hexosamines, un carrefour métabolique	12
1) Les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des hexosamines	14
a) L'enzyme limitante de la voie de biosynthèse des hexosamines, l'enzyme GFAT	14
i) Généralités sur l'enzyme GFAT	14
ii) Les mécanismes de régulation et d'inhibition de GFAT	14
b) La O-GlcNAc transférase, la seule enzyme de la O-GlcNAcylation	15
i) Généralités sur l'enzyme OGT	15
ii) Les régulateurs et inhibiteurs de l'enzyme OGT	17
c) Les hexosaminidases	18
i) L'O-GlcNAcase, l'enzyme de dé-OglcNAcylation	19
1) Généralités sur l'enzyme OGA	19
2) Activité catalytique de l'enzyme OGA	20
3) Les régulateurs clés et délétions génétiques de l'enzyme OGA	22
III) Impact de la O-GlcNAcylation dans les mécanismes physio-pathologiques	23

A) Effets physiologiques des variations de la O-GlcNAcylation	23
1) Variations au cours du développement	23
2) Maintien de l'homéostasie des niveaux O-GlcNAcylation	24
B) La O-GlcNAcylation en lien avec des pathologies	25
1) Les niveaux de la O-GlcNAcylation sont dérégulés dans les pathologies chroniques	25
a) Les cancers	25
b) Le diabète de type 2	26
c) Les maladies neurodégénératives	27
d) Les maladies cardiovasculaires	28
2) Impact de la O-GlcNAcylation dans les pathologies aiguës	28
a) Le choc septique	29
b) Le choc hémorragique	31
Partie 2 : Une voie de recherche thérapeutique pour la prise en charge de ces pathologies aiguës à l'aide de différents inhibiteurs enzymatiques de l'OGA.	33
I) Les caractéristiques pharmacodynamiques d'un inhibiteur enzymatique de OGA	33
A) Généralités sur l'utilisation des inhibiteurs de l'OGA in vitro	33
B) Les divers inhibiteurs enzymatiques de l'enzyme OGA	34
1) Les inhibiteurs à base de carbohydrates	35
a) Le Thiamet G	35
II) Le développement d'un nouvel inhibiteur pharmacologique de l'OGA	37
A) Le développement d'un inhibiteur de l'enzyme OGA mito-ciblé	37
1) L' impact du traitement Thiamet G sur les mitochondries cardiaques	37
2) La molécule de TPP-Thiamet G	39
III) Matériels et méthodes	40
A) Les inhibiteurs pharmacologiques	40
B) Culture cellulaire	40
1) La lignée de cardiomyocytes atriaux de souris	40
C) Analyse protéique	40
1) Extraction des protéines cellulaires	40
2) Dosage des protéines	41
D) Western-blot	41
E) Dosage l'activité enzymatique OGA par spectrophotométrie	42
IV) Résultats	43
A) Validation des effets de l'inhibiteur enzymatique mito-ciblé	43
1) L' inhibiteur pharmacologique TPP-Thiamet G diminue l'activité de l'enzyme OGA	43

2) La molécule de TPP-Thiamet G conserve une efficacité et une puissance sur l'enzyme OGA	44
B) Impact de la O-GlcNAcylation sur une protéine mitochondriale du métabolisme cardiaque	46
1) Le TPP-Thiamet G augmente spécifiquement l'expression de l'enzyme ACSS1	46
V) Conclusion	47
VI) Discussion	48
A) Le TPP-Thiamet G inhibe efficacement OGA	48
B) Influence des inhibiteurs de OGA sur une protéine du métabolisme cardiaque	49
VII) Limites	49
VIII) Perspectives	50
A) Les différentes méthodes de mesure de l'activité enzymatique de l'OGA	50
B) Impact de la O-GlcNAcylation sur les protéines cellulaires et mitochondriales	51
C) Les différentes techniques d'imagerie intracellulaire pour marquer le motif O-GlcNAc	52
D) L'étude de l'influence de la O-GlcNAcylation sur l'enzyme ACSS1	52
IX) Références	1
X) Annexes	21
A) Annexe 1 : Tableau des inhibiteurs de l'enzyme GFAT	21
B) Annexe 2 : Tableau des inhibiteurs de l'enzyme OGT	21
C) Annexe 3 : Tableau des inhibiteurs de l'enzyme OGA	29

ABREVIATION

4-MU-GlcNAc : 4-méthylumbelliferyl-N-acétyl-β-d-glucosaminide	HRP : peroxydase de raifort (<i>horseradish peroxidase</i>)
4-MU : 4-méthylumbelliferyl	IC : Intracellulaire
Ac : Anticorps	IP : Intrapéritonéale
Acétyl-CoA : acétyl coenzyme A	IV : Intraveineuse
ACS2L : Acétyl-CoA synthetase 2-like	Ki : Constante d'inhibition
ACSS1 : Acétyl-Coenzyme A Synthétase 1	KO : <i>Knock-out</i>
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	LonP1 : Lon homologue 1
AMPK : Adenosine MonoPhosphate-activated protein kinase	ManNAc : N-acétylmannosamine
Asp : Aspartate	MCU : Transporteur uniport de calcium mitochondrial (<i>Mitochondrial Calcium Uniporter</i>)
ATP : Adénosine Triphosphate	<i>MGEA5</i> : <i>meningioma expressed antigen 5</i>
ATP5A : sous-unité alpha ATP synthase mitochondriale (<i>mitochondrial ATP synthase alpha-subunit</i>)	MMP-2 : Métalloprotéinase matricielle
AUC : Aire sous la courbe	MPT : Lodification post-traductionnelle
BHE : Barrière hémato-encéphalique	NAc : N-acétyl
BSA : Albumine bovine sérique (<i>Bovine Serum Albumine</i>)	NAGA : N-acétyl-glucosamine-6-phosphate-N-acétylase
BtOGA : Enzyme OGA d'origine bactérienne	O-GlcNAc : N-acétylglucosamine O-liée
CE50 : Concentration nécessaire pour observer 50 % effet maximal	OGA : O-GlcNAcase
CEISAM : Chimie Et Interdisciplinarité, Synthèse, Analyse, Modélisation	OGT : O-GlcNAc Transférase
CHO : Ovaire de hamster chinois	OTf : triflate ou trifluorométhylsulfonate
CI50 : Concentration nécessaire pour observer 50 % inhibition	PaCO ₂ : Pression partielle en dioxyde de carbone artériel
CI : Complexe I mitochondrial	Papp : Perméabilité apparente
COS : Fibroblaste de singe	PKA : <i>Cyclic Adenosine MonoPhosphate-dependant protein kinase</i>
CTE : Chaîne de transport des électrons	pNP : para-nitrophényl
DON : 6-azido-5-oxo-L-norleucine	pNP-GlcNAc : para-nitrophényl N-acétylglucosaminide
E _{max} : Efficacité maximale	pRB : protéine du rétinoblastome
eNOS : <i>Endothelial Nitric Oxyde Synthase</i>	Q6S : Quinolinone-6-sulfonamide
ES : Substituants nucléophiles	R : Groupement partant
F : Biodisponibilité	r/h : Rat/humain
FC : Fréquence cardiaque	r/min : Respiration par minute
FR : Fréquence respiratoire	RE : Réticulum endoplasmique
Fru : Fructose	ROS : Espaces réactives de l'oxygène (<i>Reactive oxygene species</i>)
Fru-6-P : Fructose-6-Phosphate	SDS : Sodium dodécyl sulfate
GalNAc : N-acétylgalactosamine	Ser : Sérine

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase GAT2 : glutamine amidotransférase 2 GCN5 : <i>General Control Non-repressed 5 protein</i> GFAT : Glucose-fructose 6-phosphate amidotransférase GH20 : La famille 20 des glycosides hydrolases GH84 : La famille 84 des glycosides hydrolases Glc : Glucose Glc-6-P : Glucose-6-Phosphate GlcN-6-P : Glucosamine-6-P GlcNAc-1-P : N-acétyl-glucosamine-1-phosphate GlcNAc-6-P : N-acétyl-glucosamine-6-phosphate GLUT : Transporteur de glucose (<i>GLUcose Transporter</i>) GNK : GlcNAc Kinase HAT : Histone acétyltransférase HEX: Hexosaminidases HIC1 : Hypermethylated in Cancer 1 HPP : Projet du génome humain (<i>Human Genome Project</i>) HPG : Projet du protéome humain (<i>Human Proteome Project</i>)	SERCA2a : <i>Sarco/endo plasmic reticulum calcium (Ca²⁺) ATPase</i> SIS : sugar isomerase SRIS : Syndrome de réponse inflammatoire systémique TG : Thiamet G Thr : Thréonine TPP : Triphénylphosphonium TPP-Thiamet G : Triphénylphosphonium-Thiamet G TPR : Répétitions de tétra-peptides (<i>TetratricoPeptide Repeat</i>) UDP-GlcNAc : Uridine diphosphate N-acétylglucosamine UDP-GalNAc : Uridine diphosphate N-acétylgalactosamine UMP : Uridine monophosphate UTP : Uridine triphosphate UV : ultraviolet VBH : Voie de biosynthèse des hexosamines VEGF-A : Facteur pro-angiogénique du facteur de croissance endothéliale vasculaire A Vd : Volume de distribution VO : voie orale
---	---

FIGURES

Figure 1 : Implication de la O-GlcNAcylation dans les processus cellulaires et le lien entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation (Gerald W. Hart et al. 2011a)	2
Figure 2 : Distribution tissulaire de l'O-GlcNAcome humain. Les couleurs représentent le score de confiance médian (Wulff-Fuentes et al. 2021).....	7
Figure 3: Distribution cellulaire de l'O-GlcNAcome des protéines intracellulaires. Les couleurs représentent le score de confiance médian (Wulff-Fuentes et al. 2021).....	8
Figure 4: Cycle de la O-GlcNAcylation dans les mitochondries (P. S. Banerjee, Ma, and Hart 2015; Zhao et al. 2016)..	10
Figure 5: La voie de biosynthèse des hexosamines (VBH) et O-GlcNAcylation des protéines d'après Yang et Qian 2017.	13
Figure 6: Représentation schématique de la structure protéique des trois isoformes de l'OGT humaine (A) et les conformations homo/hétérotrimères de l'enzyme OGT (B).	17
Figure 7 : Représentation schématique de la structure peptidique de l'enzyme OGA inspiré de la revue X. Yang et Qian 2017.	20
Figure 8 : Mécanisme catalytique en deux étapes de l'enzyme OGA inspiré Elbatrawy et al. 2020	21
Figure 9 : Homéostasie des niveaux de O-GlcNAcylation totaux cellulaire et système de régulation commun par le couple d'enzyme OGT/OGA dépendant de la disponibilité des nutriments et du stress cellulaire inspiré de Yang et Qian en 2017.	24
Figure 10 : Hypothèse de l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation des protéines empêchant l'agrégation de la protéine Tau.(Selnick et al. 2019).	27
Figure 11 : Définition du sepsis et du choc septique adapté d'après Martin, 2012 (G. S. Martin 2012) issus de la thèse de Marine Ferron 2017.....	30
Figure 12 : Cinétique basale et inhibée de l'activité de l'enzyme OGA en fonction de la concentration de substrats selon (Macauley and Vocadlo 2010).	33
Figure 13 : Quelques inhibiteurs connus de l'OGA humaine (Cekic et al. 2016).	35
Figure 14 : Structure chimique de la molécule de Triphénylphosphonium-Thiamet G.	39
Figure 15 : Variations de l'activité enzymatique de l'enzyme OGA des cellules HL-1 en fonction de différentes concentrations de Thiamet G ou de TPP-Thiamet G	43

Figure 16 : Effet de concentration croissante de Thiamet G sur les niveaux de O-GlcNAcylation cellulaires	45
Figure 17 : Effet de concentration croissante de TPP-Thiamet G sur les niveaux de O-GlcNAcylation cellulaires.....	45
Figure 18 : Variations des niveaux d'expression de l'enzyme ACSS1 de cellules HL-1 traitées au Thiamet G ou TPP-Thiamet G	46
Figure 19 : Variations des niveaux d'expression des protéines caractéristiques d'un compartiment cellulaire après un enrichissement mitochondrial (A) et représentation schématique de la localisation des différentes protéines (B).....	51

TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques communes et distinctes entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation d'après (Bond and Hanover 2015).	3
Tableau 2 : Résumé des données pharmacologiques sur la molécule de Thiamet G (Yuzwa et al. 2008)	36
Tableau 3 : Paramètres pharmacocinétique du Thiamet G chez le rat mâle (Selnick et al. 2019)	36
Tableau 4 : Caractéristiques des anticorps utilisés pour les western-blots	41
Tableau 5 : Résumé des molécules inhibitrices de l'enzyme GFAT	21
Tableau 6 : Résumé des molécules inhibitrices de l'enzyme OGT	21
Tableau 7 : Résumé des molécules inhibitrices de l'enzyme OGA.....	29

AVANT-PROPOS

Le monde de la santé et de la recherche scientifique m'ont toujours intrigué et passionné. Au cours de ces six années d'études en pharmacie, j'ai effectué des stages officinaux, des stages hospitalo-universitaires et des stages dans différents laboratoires de recherche. Ma formation de pharmacien m'a permis de découvrir la recherche pharmaceutique en choisissant la filière industrie-recherche.

J'ai réalisé ma sixième année de pharmacie dans le master BBRT (Biologie, Biotechnologie et Recherche Thérapeutique) à l'Université de Nantes. J'ai pu bénéficier des enseignements comprenant une approche scientifique expérimentale qui complète ma formation de pharmacien. Cette seconde année de master s'est déroulée pendant la pandémie. Au vu du contexte sanitaire, j'ai eu l'opportunité de réaliser un stage au sein de l'équipe de recherche de Benjamin Lauzier à l'Institut du Thorax à Nantes. Le domaine de la O-GlcNAcylation m'était alors inconnu. Lors de ce dernier stage, j'ai participé à la caractérisation pharmacologique d'un inhibiteur mito-ciblé de l'enzyme O-GlcNAcase. Durant ces 6 mois, j'ai pu réaliser des manipulations *in vitro* et *ex vivo*. J'ai mené des expériences de biochimie et biologique moléculaire qui m'ont permis de commencer à déterminer l'intérêt et l'impact de cibler les protéines mitochondriales. Grâce à ces travaux, j'ai pu participer à deux congrès scientifiques et d'apparaître dans un article publié.

Pendant ces dernières années, j'ai acquis de nombreuses connaissances théoriques et expérimentales. Cette thèse de pharmacie n'est pas un aboutissement mais un très beau tremplin vers une thèse scientifique. Aujourd'hui, j'ai l'opportunité de pouvoir continuer à travailler dans le monde de la recherche de l'autre côté de l'Atlantique, à Montréal, dans l'équipe du professeur Jean-Sébastien Joyal. Cette thèse de pharmacie contient une partie de mes recherches bibliographiques et une partie de mes travaux de caractérisation d'un inhibiteur mito-ciblé. J'espère que vous prendrez autant de plaisir à lire cette thèse que j'ai eue de plaisir à l'écrire.

Partie 1 : Connaissances générales sur la voie de biosynthèses des hexosamines et la O-GlcNAcylation au niveau physio-pathologique

I) Introduction généraliste

Au début des années 1990, le projet “Génome humain” (*Human Genome Project* HGP) a vu le jour afin d’établir le séquençage complet de l’ADN du génome humain. Les résultats publiés en 2004 mettent en évidence une liste exhaustive de 20 000 à 25 000 gènes codant des protéines (*International Human Genome Sequencing Consortium* 2004).

Depuis 2010, le projet “Protéome humain” a été lancé (*Human Proteome Project* HPP). Il consiste à caractériser l’ensemble des protéines codées par le génome humain. Dans ce contexte, la France s’est vu attribuer le chromosome 14. Ce second projet n’est pas terminé à ce jour. Il permettra d’apporter une meilleure compréhension moléculaire de la dynamique du protéome. En janvier 2020, plus de 19 000 protéines codées par le génome humain ont été découvertes (‘HUPO - Home’).

A) Les modifications post-traductionnelles des protéines

Les cellules sont des systèmes complexes avec une grande diversité de fonctions. Les protéines subissent, après fabrication, de nombreuses modifications post-traductionnelles (MPT) dont les plus connues sont la phosphorylation, la glycosylation, l’hydroxylation, l’acétylation, etc. Les MPT sont définies par la liaison covalente et spécifique d’un groupement chimique sur une protéine. Elles jouent un rôle central dans les divers processus biologiques comme la survie cellulaire, la réponse au stress cellulaire, la localisation ou la stabilité des protéines.

La phosphorylation correspond à l’ajout d’un radical phosphate sur les hydroxyles de certains acides aminés des protéines. La phosphorylation des protéines est régie par un grand nombre d’enzymes soit environ 518 kinases spécifiques et environ 200 phosphatases (Manning et al. 2002; Sacco et al. 2012). Cela permet l’adaptation aux variations de l’environnement cellulaire. Elle est rapide, réversible et s’oppose à la glycosylation des protéines qui consiste en l’ajout d’une

chaîne d'hydrates de carbone. En effet, la glycosylation est perçue comme un mécanisme stable car elle serait constante sur les protéines matures. Il existe deux grands sous-types de glycosylation : la O-glycosylation et la N-glycosylation. On les retrouve au niveau des résidus sérines, thréonines et asparagines des protéines. En 1984, Torres et Hart décrivent une sous-catégorie de O-glycosylation : la O- β -N-acétyl-glucosaminylation, plus communément appelée la O-GlcNAcylation. Mise en évidence à la surface interne des membranes plasmiques de lymphocytes (Torres and Hart 1984), elle consiste en l'ajout d'un monosaccharide : le β -D-N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur les sérines et thréonines des protéines (Natasha E. Zachara and Hart 2006) (**Figure 1**).

Les protéines O-GlcNAcylées et/ou phosphorylées régulent de nombreuses fonctions dans l'organisme et sont impliquées dans de multiples processus cellulaires, tels que la transcription, la traduction, la fonction neuronale, le cycle cellulaire et la réponse au stress (**Figure 1**).

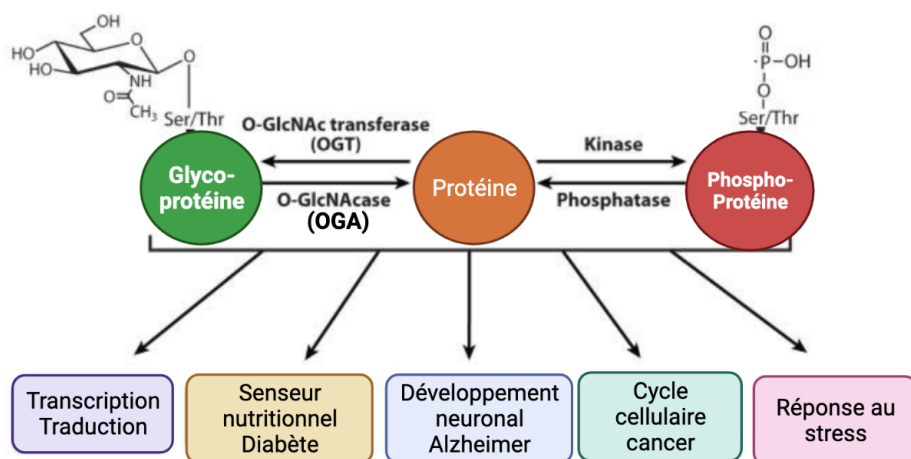


Figure 1 : Implication de la O-GlcNAcylation dans les processus cellulaires et le lien entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation (Gerald W. Hart et al. 2011a)

La O-GlcNAcylation et la phosphorylation sont des régulateurs de signalisation similaires mais présentent certaines caractéristiques distinctes (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Caractéristiques communes et distinctes entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation d'après (Bond and Hanover 2015).

	O-GlcNAcylation	Phosphorylation
Donneur	UDP-GlcNAc	ATP
Acides aminés accepteurs	Sérine, Thréonine	Sérine, Thréonine, Tyrosine
Charge au pH physiologique	Non chargé	Chargé négativement
Cycle addition/élimination	Dynamique	Dynamique
Enzyme(s) catalysant l'addition	OGT	Nombreuses kinases
Enzyme(s) catalysant l'élimination	OGA	Nombreuses phosphatases

L'absence de séquence consensus établi pour la O-GlcNAcylation limite son étude. L'abondance de sérine ou thréonine autour des sites de O-GlcNAc est favorable tandis que la présence d'acide glutamique ou de cystéine est défavorable (Wulff-Fuentes et al. 2021).

La O-GlcNAcylation contribue à un niveau supplémentaire de régulation post-traductionnelle des protéines cibles puisqu'elle peut entrer en compétition ou agir en synergie avec la phosphorylation. L'interaction de ces deux modifications peut être essentielle à la régulation des propriétés fonctionnelles de certaines protéines. Par exemple, la O-GlcNAcylation de la *Endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) sur la sérine 615 va induire son inactivation alors que la phosphorylation de ce même site va activer la protéine (P. Hu, Shimoji, and Hart 2010). Concernant la kératine 18, la O-GlcNAcylation sur la sérine 30 est nécessaire à la phosphorylation de la sérine 33. La O-GlcNAcylation permet de réguler la migration cellulaire, la stabilité et les propriétés de solubilité de la protéine (Kakade et al. 2016).

B) Définition de la O-GlcNAcylation

La O-GlcNAcylation est une MPT très conservée au cours de l'évolution, des organismes unicellulaires jusqu'à l'Homme (Gerald W. Hart et al. 2011a; Torres and Hart 1984). Elle est ubiquitaire, réversible et représente un mécanisme fondamental de la vie cellulaire en tant que

capteur métabolique variant en fonction de l'environnement énergétique de la cellule (Gerald W. Hart et al. 2011a).

Le résidu GlcNAc est nécessaire pour la O-GlcNAcylation. Lorsque le glucose pénètre dans la cellule, une faible proportion (0,003 % dans le cœur) est directement adressée vers la voie de biosynthèse des hexosamines. Cela commence par une réaction enzymatique catalysée par l'enzyme Glutamine-Fructose-6-Phosphate-amino Transférase (GFAT), enzyme limitante dans cette voie de biosynthèse. Le composé glucose modifié est converti en Uridine diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc). Un couple unique d'enzymes permet ce processus : O-GlcNAc transférase (OGT) et O-GlcNAcase (OGA). L'enzyme OGT catalyse l'ajout du résidu GlcNAc au niveau du groupement hydroxyle des résidus sérines et thréonines des protéines cibles (Natasha E. Zachara and Hart 2006). Cette réaction est dynamique grâce à la présence de l'enzyme OGA dont le rôle est l'élimination du résidu GlcNAc de ces mêmes protéines (Gerald W. Hart et al. 2011a).

Lors de l'étude des modèles knock-out (KO) pour les enzymes, les souris KO OGT décèdent *in utero* (Shafi et al. 2000; Ida et al. 2017) alors que les KO OGA (Y. R. Yang et al. 2012; Keembiyehetty et al. 2015) meurent rapidement après la naissance. Ces données renforcent l'idée que la O-GlcNAcylation est essentielle à la stabilité cellulaire ainsi qu'au développement. La modulation des niveaux de O-GlcNAcylation peut être réalisée à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques des différentes enzymes impliquées : GFAT, OGT ou OGA.

La O-GlcNAcylation a été observée sur des protéines cytoplasmiques, nucléaires (Holt and Hart 1986; Schindler et al. 1987) et mitochondriales (Y. Hu et al. 2009). A ce jour, on dénombre plus de 5 000 protéines O-GlcNAcylées ('O-GlcNAc Database'). L'identification des sites O-GlcNAc sur les protéines est difficile car la liaison du résidu GlcNAc sur la protéine est très labile et est perdue avec les méthodes traditionnelles de fragmentation des peptides en spectrométrie de masse (Greis and Hart 1998; Z. Wang et al. 2010). Les connaissances augmentent rapidement depuis quelques années grâce à l'amélioration des techniques de détection de la O-GlcNAcylation. En janvier 2021, Wulff-Fuentes et ses collaborateurs ont créé une base de données des protéines O-GlcNAcylées issue de l'ensemble des 1700 articles publiés sur ce sujet (Wulff-Fuentes et al.

2021; 'O-GlcNAc Database'). Ils ont ainsi pu mettre en évidence 7 000 sites potentiels composants l'O-GlcNAcome humain.

Des perturbations de la O-GlcNAcylation des protéines pourraient jouer un rôle important dans certaines pathologies humaines comme les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète de type 2 ou les maladies neurodégénératives. Au niveau cardiaque, l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation peut entraîner deux effets opposés en fonction du temps :

- les maladies chroniques cardiométaboliques, comme le diabète, qui provoquent des effets délétères associés à une augmentation chronique de O-GlcNAc (R. J. Clark et al. 2003; Ramirez-Correa et al. 2008; Y. Hu et al. 2009; J. Ma et al. 2016);
- une augmentation aiguë provoque des effets protecteurs en cas de traumatisme ou d'hémorragie (Xing et al. 2008; S. Yang et al. 2006; Jensen et al. 2019).

L'impact de l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation dans les tissus cardiovasculaires se traduit par une diminution de la surcharge calcique, du stress du réticulum endoplasmique, du stress oxydatif mais aussi d'une diminution de la fonction mitochondriale. Dans les cardiomyocytes, les mitochondries représentent une densité importante du volume cellulaire et produisent plus de 95 % de l'énergie de la cellule sous forme d'adénosine triphosphate (ATP) (Brown et al. 2017). La O-GlcNAcylation est essentielle à la bonne régulation de la fonction mitochondriale et du métabolisme énergétique.

À travers cette revue bibliographique et mon stage de master 2, j'ai cherché à caractériser deux inhibiteurs de l'enzyme OGA. L'objectif étant d'améliorer les connaissances sur la modulation des niveaux de O-GlcNAcylation cardiaque avec un focus particulier pour la mitochondrie *via* une optimisation moléculaire.

II) Implication de la O-GlcNAcylation dans l'organisme

A) Phylogénie de la O-GlcNAcylation +

Les protéines O-GlcNAcylées sont retrouvées dans quasiment tous les *phyla*. Cette conservation phylogénétique permet de penser qu'elle est apparue très tôt au cours de l'évolution. En effet, cette MPT est détectée chez l'ensemble des eucaryotes étudiés à ce jour : protistes (organisme vivant unicellulaire) tels que *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *Toxoplasma gondii* (S. Banerjee, Robbins, and Samuelson 2009). Les bactéries *Listeria monocytogenes* présentent des flagellines O-GlcNAcylées (Schirm et al. 2004) ; les champignons filamenteux (Woosley et al. 2006) ; nématode *Caenorhabditis elegans* (Lubas et al. 1997) ; insectes comme la *Drosophila melanogaster* (G W Hart et al. 1989) ; plantes supérieures dont *Vitis vinifera* (Olszewski et al. 2010). Enfin, elle a été décrite chez de nombreuses espèces de mammifères (Wulff-Fuentes et al. 2021).

B) Localisation de la O-GlcNAcylation

1) Les différents organes ayant des protéines O-GlcNAcylées

En janvier 2021, Wulff-Fuentes et ses collaborateurs ont mis en évidence la distribution tissulaire des protéines O-GlcNAcylées humaines (Wulff-Fuentes et al. 2021). Les chercheurs ont attribué un score O-GlcNAc aux tissus allant de 0 à 5. Plus le score augmente, plus il y a de protéines O-GlcNAcylées dans le tissu étudié. Ce score dépend de la longueur de la liste de références, la somme des citations par année, le temps écoulé entre la première et la dernière publication de référence (**Figure 2**).

Ils ont pu mettre en évidence la présence de la O-GlcNAcylation au sein de tous les organes principaux. Le système nerveux et le foie étant les organes les plus étudiés, comprenant le plus de protéines O-GlcNAcylées. Le sang et le cœur semblent contenir une quantité de protéines O-GlcNAcylées équivalente à celle des muscles et de l'intestin. *A contrario*, les tissus présentant le moins de protéines O-GlcNAcylées sont les os et la salive (**Figure 2**).

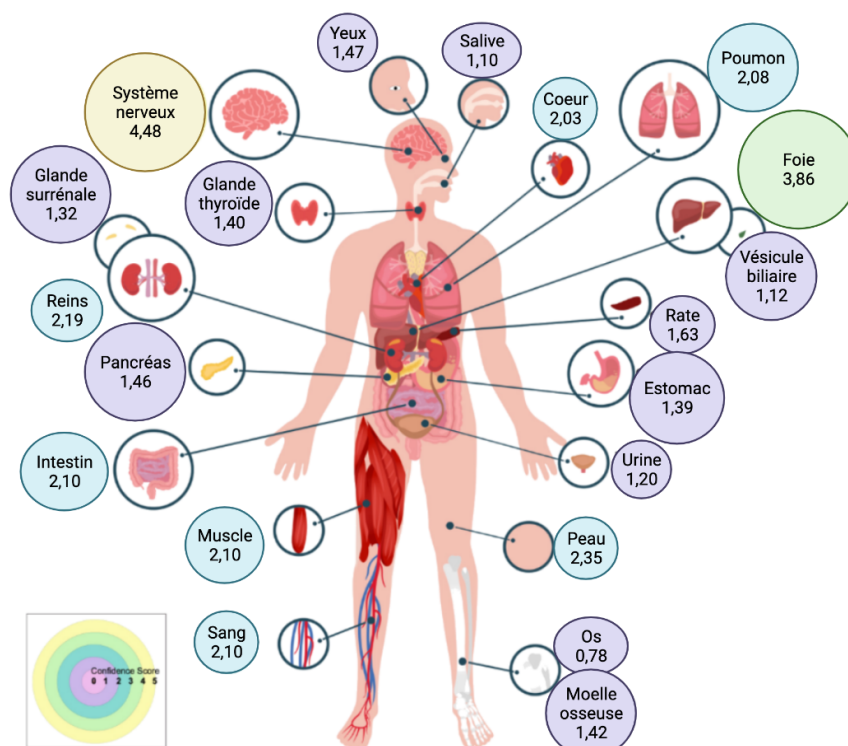


Figure 2 : Distribution tissulaire de l'O-GlcNAcome humain. Les couleurs représentent le score de confiance médian (Wulff-Fuentes et al. 2021).

2) Implication de la O-GlcNAcylation au niveau cellulaire

La O-GlcNAcylation étant retrouvée dans la majorité des tissus humains, il est intéressant d'investiguer la localisation cellulaire des protéines concernées.

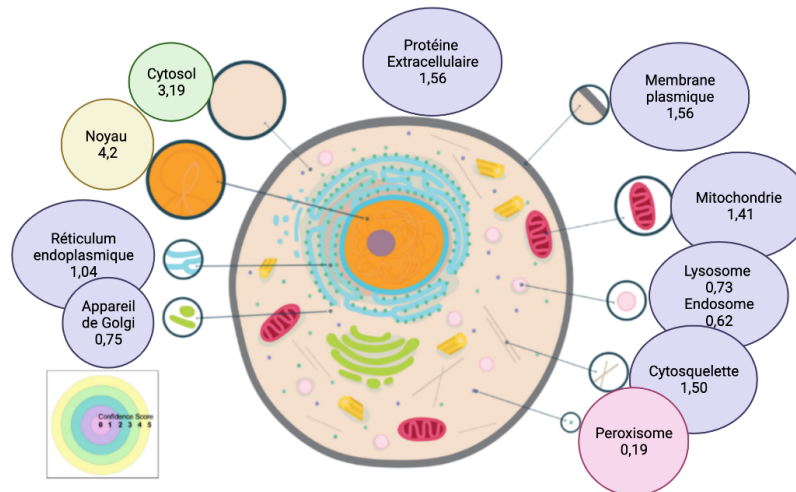


Figure 3: Distribution cellulaire de l'O-GlcNAcylation des protéines intracellulaires. Les couleurs représentent le score de confiance médian (Wulff-Fuentes et al. 2021).

Il est possible d'observer dans la **Figure 3**, les composants de la cellule les plus étudiés ainsi que la majorité des protéines subcellulaires sont O-GlcNAcylées. Ces protéines sont concentrées principalement dans les compartiments nucléaires et cytoplasmiques. Les protéines mitochondriales sont aussi O-GlcNAcylées (Wulff-Fuentes et al. 2021). Bien que l'isoforme mitochondrial de l'enzyme OGT a été identifiée en 2003 (Love et al. 2003), ce n'est qu'en 2009 que les premières protéines mitochondriales O-GlcNAcylées ont été décrites (Y. Hu et al. 2009). Ces données pourraient s'expliquer par la localisation des deux enzymes clés de régulation de la O-GlcNAcylation. En effet, dans la plupart des cellules, l'OGT se trouve principalement dans le noyau, et l'OGA dans le cytosol. Cependant, les deux enzymes sont présentes dans tous les compartiments intracellulaires, et la régulation de leur trafic intracellulaire n'est pas bien connue (Gerald W. Hart et al. 2011a). Toutes ces données confirment le caractère ubiquitaire de cette MPT.

C) Les rôles de la O-GlcNAcylation à différentes échelles du corps humain

La O-GlcNAcylation se produit sur un large éventail de protéines dont celles du cytosquelette, pores nucléaires, facteurs de transcription par exemple (Greis and Hart 1998; Wulff-Fuentes et al. 2021). Cette MPT joue un rôle essentiel dans de nombreuses fonctions cellulaires qui peuvent être communes entre les différents organes ou spécifique à un tissu donné.

1) Le trafic de protéines et des organelles

Au début des années 2000, il a été démontré que la O-GlcNAcylation peut moduler le trafic de certaines protéines à la membrane telles que la synapsine (Cole and Hart 2002), la β -caténine, la E-cadhérine (W. Zhu 2001). De plus, elle modulerait la perméabilité des pores nucléaires en influençant les nucléoporines (J. A. Hanover et al. 1987; Holt et al. 1987; Starr and Hanover 1990). Au niveau de la mitochondrie, la O-GlcNAcylation influence la morphologie (Bond and Hanover 2015). Les organelles comme les mitochondries peuvent se déplacer le long des réseaux d'actine et des microtubules à l'aide du recrutement de l'OGT au sein du complexe MIRO-Milton-TRAK (Pozo and Stephenson 2011; Pekkurnaz et al. 2014).

2) La réponse cellulaire au stress

Les cellules peuvent être exposées à différents types de stress (chaleur, salinité élevée, métaux lourds, rayons UV, hypoxie ...). Ce stress cellulaire peut provoquer une augmentation des protéines chaperonnes et une diminution de leur turn-over. La O-GlcNAcylation joue un rôle important dans la réponse cellulaire au stress (Natasha Elizabeth Zachara, Cheung, and Hart 2004; N. Zachara 2004) et assure une meilleure résistance des tissus ou des organes. Il a par exemple été démontré un effet protecteur de la stimulation des niveaux de O-GlcNAcylation en cas de traumatisme ou d'hémorragie (Xing et al. 2008; S. Yang et al. 2006; Jensen et al. 2019). En effet, l'augmentation rapide des niveaux de O-GlcNAcylation améliore la capacité des cellules à survivre à un stress toxique (Gerald W. Hart et al. 2011a).

D) La O-GlcNAcylation et organites cellulaires spécifiques

La O-GlcNAcylation participe aux modulations des fonctions des différents organites présents dans les différents types cellulaires. L'UDP-GlcNAc est généralement un substrat donneur des enzymes glycosyltransférases du réticulum endoplasmique et du Golgi qui participent à la synthèse des glucides complexes liés à l'azote sur les protéines sécrétées. De plus, une forme courte de l'enzyme OGA est retrouvée dans le réticulum endoplasmique (X. Yang and Qian 2017). Les deux enzymes clés régissant la O-GlcNAcylation possèdent des isoformes présents préférentiellement dans certains compartiments cellulaires.

De nombreuses preuves permettent de penser que le cycle de O-GlcNAcylation peut se dérouler au sein de la mitochondrie : il existe une isoforme de l'enzyme OGT (mOGT) située dans la membrane interne de la mitochondrie (Love et al. 2003), la présence du transporteur de nucléotides pyrimidiques (SLC25A33) de l'UDP-GlcNAc et une activité OGA détectée dans les mitochondries isolées (P. S. Banerjee, Ma, and Hart 2015) (**Figure 4**). Dans cette même étude publiée en 2015, Ma et ses collaborateurs ont réalisé une étude de O-GlcNAcylo-mique des protéines mitochondriales cardiaques. Grâce à cette approche, 88 protéines mitochondriales comprenant des protéines intervenant dans la phosphorylation oxydative, le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras ont été identifiées (J. Ma et al. 2015). Les auteurs ont aussi déterminé que la stimulation des niveaux de O-GlcNAcylation mitochondriaux favorise la consommation d'oxygène au sein de la chaîne respiratoire et donc la production d'ATP (J. Ma et al. 2015). Une controverse subsiste concernant la présence de ces enzymes OGT/OGA dans le compartiment mitochondrial (Trapannone, Rafie, and van Aalten 2016). Une étude menée par Yan Burelle et ses collaborateurs de l'Université d'Ottawa travaillant en collaboration avec l'équipe de recherche de Benjamin Lauzier de l'Université de Nantes a apporté la preuve du système de O-GlcNAcylation mitochondrial. À partir de mitochondries cardiaques de rats isolées, les seules isoformes mises en évidence sont l'isoforme mitochondriale de l'OGT (mOGT) et l'isoforme courte de l'OGA (sOGA) (Dontaine et al. 2021) (**Figure 4**). Ces nouvelles données apportent des données rationnelles quant aux mécanismes de O-GlcNAcylation mitochondriaux.

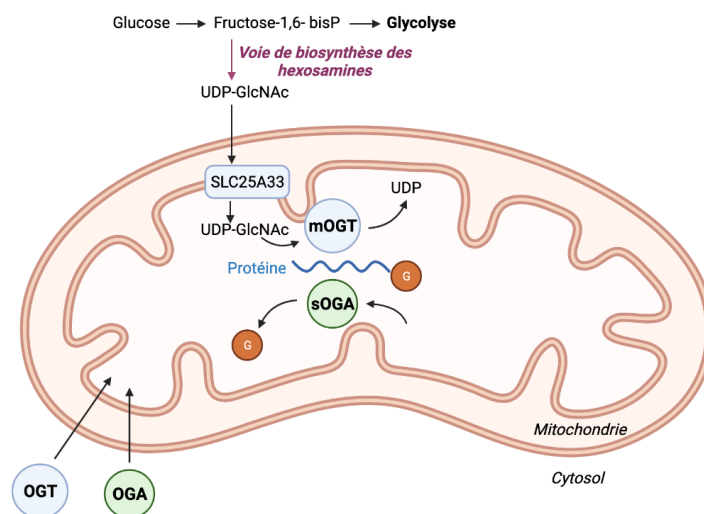


Figure 4 : Cycle de la O-GlcNAcylation dans les mitochondries (P. S. Banerjee, Ma, and Hart 2015; Zhao et al. 2016). *OGT* : *O-GlcNAc transférase* ; *OGA* : *O-GlcNAcase*.

Le protéome mitochondrial provient des protéines issues de l'ADN mitochondrial et également de l'ADN nucléaire. La O-GlcNAcylation des protéines pourrait alors avoir lieu dans le cytoplasme avant la translocation des protéines dans la mitochondrie ou directement au sein de la mitochondrie. La O-GlcNAcylation mitochondriale pourrait réguler de nombreuses fonctions de la mitochondrie :

- le métabolisme énergétique mitochondrial en modulant les composants du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire mitochondriale, ce qui pourrait orienter la consommation d'oxygène et la production d'ATP ;
- le seuil d'ouverture du pore de transition de perméabilité induit par le calcium (*mitochondrial Permeability Transition Pore* mPTP);
- la dynamique et la mobilité mitochondriale ;
- la morphologie mitochondriale ;
- l'acétylation du protéome mitochondrial ;
- le stress oxydatif mitochondrial (Zhao et al. 2016).

Il est important de noter que la modification par O-GlcNAc des protéines mitochondriales a été identifiée comme un mécanisme potentiel de modulation du métabolisme en cas de stress cellulaire, avec des effets potentiellement bénéfiques et néfastes. Cela suggère que les changements temps et niveaux dépendants de la O-GlcNAcylation peuvent avoir des effets différents sur la fonction mitochondriale. Les altérations des composants de la chaîne de transport d'électrons ont été découvertes comme des médiateurs des effets de la O-GlcNAcylation sur le métabolisme mitochondrial (Lozano et al. 2014).

Au sein de l'équipe de recherche de Benjamin Lauzier dans laquelle j'effectue le travail présenté, des protéines cardiaques ont été identifiées comme O-GlcNAcylées par spectrométrie de masse. Une enzyme O-GlcNAcylée mitochondriale d'intérêt est l'Acétyl-Coenzyme A Synthétase 1 (ACSS1). Elle catalyse la synthèse de l'acétyl-CoA à partir d'acétate et d'acides gras à chaîne courte (Schwer et al. 2006), permettant à la cellule d'utiliser l'acétate comme carburant lorsque la disponibilité du glucose est insuffisante (conditions cétogènes par exemple) ou pour la thermogenèse. L'acétate agit comme un capteur métabolique et régule la transcription des gènes en fonction de la disponibilité des nutriments et la réponse au stress cellulaire (Moffett et al. 2020).

Le rôle métabolique et l'impact de la O-GlcNAcylation sur les mécanismes de régulation de ces enzymes ne sont pas connus à ce jour.

E) La voie de biosynthèse des hexosamines, un carrefour métabolique

Le glucose extracellulaire pénètre dans la cellule par des transporteurs spécifiques nommés GLUT (GLUcose Transporter). Rapidement après la naissance, l'isoforme cardiaque de ce transporteur, qui devient GLUT4, est dépendant de l'insuline. En effet, son adressage à la membrane ne se fait qu'en présence de cette hormone. L'insuline est sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas dans une situation d'hyperglycémie physiologique ou pathologique.

Le glucose étant internalisé dans la cellule, il est transformé en Glucose-6-Phosphate (Glc-6-P) par l'action d'une hexokinase. Le Glc-6-P participe à la synthèse du glycogène hépatique principalement. Puis, il est converti en Fructose-6-Phosphate (Fru-6-P), *via* la phosphoglucose isomérase. La majorité du glucose sera orientée vers la glycolyse intracellulaire pour fournir des molécules énergétiques à la cellule, ou au niveau hépatique à la glycogénogenèse. Le Glc-6-P et le Fru-6-P sont des molécules communes entre la synthèse de glycogène, la glycolyse et la voie des hexosamines, mais elles varient en fonction du type cellulaire.

À partir du Fru-6-P et de la glutamine, l'enzyme GFAT catalyse de manière irréversible la synthèse du glucosamine-6-P (GlcN-6-P). Le GlcN-6-P est le premier composé de la voie de biosynthèse des hexosamines. La voie de biosynthèse des hexosamines utilise 0,003 % du glucose intracellulaire (Ferron, Denis, et al. 2019; Olson et al. 2020). Par la suite, le GlcN-6-P est acétylé par la Glucosamine-6-Phosphate acétyltransférase à l'aide de l'acétyl-coA. Cette réaction permet la synthèse du N-acétyl-glucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6-P) qui est transformé ensuite en N-acétyl-glucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P) par la N-acétylglucosamine phosphomutase. Le GlcNAc-1-P permet la synthèse d'un composé clé de la voie : l'uridine diphosphate N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) par l'action de l'UDP-GlcNAc pyrophosphorylase. L'UDP-GlcNAc peut également être épimérisé en UDP-GalNAc, métabolisé en N-acétyl-mannosamine (ManNAc), ou utilisé dans d'autres réactions de glycoconjugaison. En effet, l'apport d'UTP permet

la synthèse du substrat-donneur de l'enzyme OGT. L'enzyme OGT est très affine pour l'UDP-GlcNAc (Haltiwanger, Blomberg, and Hart 1992). La concentration d'UDP-GlcNAc disponible dans la cellule (Kreppel and Hart 1999) influence directement le niveau de protéines O-GlcNAcylées en intracellulaire (**Figure 5**).

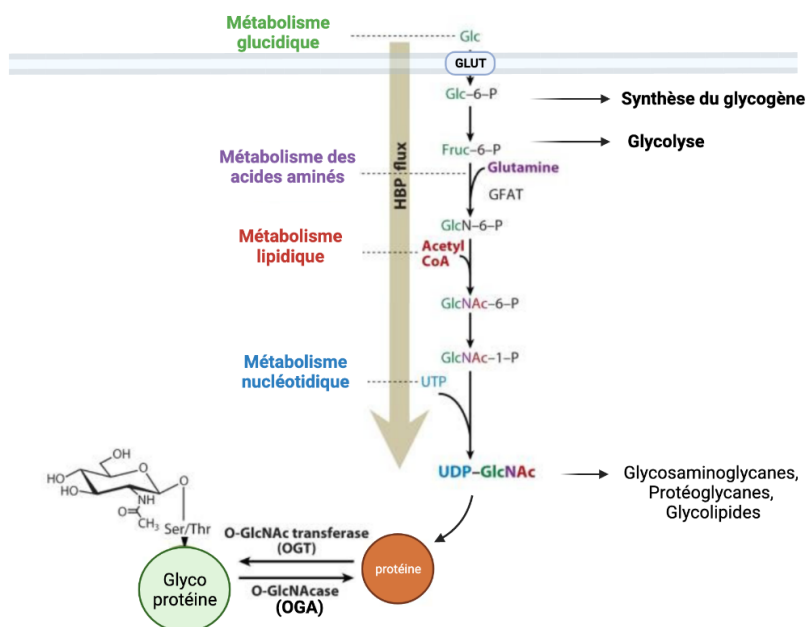


Figure 5 : La voie de biosynthèse des hexosamines (VBH) et O-GlcNAcylation des protéines d'après Yang et Qian 2017.

De plus, grâce à une boucle de rétrocontrôle négatif, l'UDP-GlcNAc peut inhiber l'enzyme GFAT initiatrice de cette voie de biosynthèse. Les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines sont donc finement régulés (Broschat et al. 2002). La dynamique de la O-GlcNAcylation des protéines est dépendante de l'environnement extracellulaire. La voie de biosynthèse des hexosamines est considérée comme un capteur métabolique car la variation de l'UDP-GlcNAc reflète le flux de nutriments entrant dans la cellule (glucose ou glucosamine) (Obici and Rossetti 2003). Les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines sont l'image de l'état physiologique de la cellule. Les modulations de ces niveaux peuvent influencer les propriétés fonctionnelles de protéines dans de nombreux processus biologiques et/ou physiopathologiques.

1) Les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des hexosamines

a) *L'enzyme limitante de la voie de biosynthèse des hexosamines, l'enzyme GFAT*

i) *Généralités sur l'enzyme GFAT*

L'enzyme GFAT est une glutamine-fructose-6-P amidotransférase. C'est l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse des hexosamines. Elle utilise la glutamine pour convertir le fructose-6-P en glucosamine-6-P. Elle catalyse de manière irréversible cette réaction enzymatique. Cette enzyme est présente dans de nombreuses espèces telles que les mammifères, les levures et les bactéries ce qui souligne l'importance des hexosamines pour le fonctionnement normal des cellules. En effet, la délétion du gène de la GFAT chez *Escherichia coli* et *Saccharomyces pombe* entraîne la mort cellulaire (Wu et al. 2011).

L'enzyme GFAT (77 kDa) est constitué de deux domaines :

- une extrémité N-terminale glutamine amidotransférase (GAT2) qui catalyse l'hydrolyse de la glutamine en glutamate et ammoniac ;
- une extrémité C-terminale sugar isomerase (SIS) qui catalyse l'isomérisation du fructose-6-P.

Cette enzyme GFAT présente deux isoformes codées par des gènes différents chez l'Homme. Le gène *GFPT1* codant l'isoforme GFAT1 (Zhou et al. 1995) et le gène *GFPT2*, permet la production de l'isoforme GFAT2 (Chumakov et al. 1995). Bien que l'enzyme GFAT soit ubiquitaire, on retrouve une prédominance de l'isoforme GFAT1 dans le placenta, le pancréas et les testicules (Oki et al. 1999) alors que GFAT2 est plutôt retrouvé dans le système nerveux central.

ii) *Les mécanismes de régulation et d'inhibition de GFAT*

L'activité de GFAT est modulée par plusieurs facteurs comme le glucose (Glc), l'insuline et la glutamine (Marshall, Bacote, and Traxinger 1991a; 1991b). Le contrôle de l'activité enzymatique semble être médié par l'augmentation de l'internalisation cellulaire du glucose sanguin induite par l'insuline (Traxinger and Marshall 1991). Il existe aussi un rétrocontrôle négatif de l'UDP-GlcNAc qui interagit directement avec l'enzyme (Graack, Cinque, and Kress

2001; DeHaven et al. 2001) et GlcN-6-P (Broschat et al. 2002) permettant d'inhiber l'activité catalytique.

De plus, l'enzyme GFAT peut subir des modifications post-traductionnelles influençant son activité enzymatique. Diverses phosphorylations ont été décrites sur des sites variables et en fonction de l'isoforme, ces MPT entraînent soit l'activation ou l'inhibition de l'enzyme (Chang et al. 2000; Y. Li et al. 2007; Eguchi et al. 2009). On ne connaît pas, à ce jour, l'impact de ces MPT sur l'activité de GFAT. Ce sont des pistes qui restent à investiguer.

Au cours des dernières décennies, de nombreux inhibiteurs pharmacologiques ont vu le jour (**Annexe 1**). Ces molécules présentent une faible sélectivité pour l'enzyme, elles provoquent donc de nombreux effets hors cible (Cervantes-Madrid, Romero, and Dueñas-González 2015)). Les inhibiteurs induisent une diminution de la production des glycosaminoglycanes et protéoglycanes, essentiels pour la cellule. À la suite des évaluations cliniques de ces molécules en cancérologie, leur développement a été abandonné en phase II (Cervantes-Madrid, Romero, and Dueñas-González 2015). A la suite d'un criblage à haut débit, le composé RO0509347 a été décrit comme un inhibiteur réversible de l'enzyme GFAT (Qian et al. 2011). Lors d'une étude menée en 2019, Pratt et ses collaborateurs n'ont pas observé de réduction de la O-GlcNAcylation globale des protéines *in vitro* lors de l'utilisation de la molécule à des concentrations élevées. Ces résultats démontrent que le RO0509347 est insuffisant pour l'expérimentation *in vivo* (Walter et al. 2020). Cependant, ces données pourront encourager le développement d'inhibiteurs potentiellement plus puissants basés sur sa structure chimique.

b) La O-GlcNAc transférase, la seule enzyme de la O-GlcNAcylation

i) Généralités sur l'enzyme OGT

L'enzyme O-GlcNAc Transférase (OGT ou Uridine diphosphO-N-acétylglucosamine:polypeptide β -N-acétylglucosamine transférase) est la seule enzyme capable à partir de l'UDP-GlcNAc, d'ajouter un résidu GlcNAc sur les groupements hydroxyles des sérines et des thréonines des protéines. Les protéines cibles de l'enzyme OGT sont nombreuses. L'OGT est très conservée au cours de l'évolution (Haltiwanger, Blomberg, and Hart 1992; Lubas et al. 1997; Kreppel, Blomberg, and Hart 1997). L'enzyme OGT est codée par un seul gène *OGT*. Chez

l'Homme, on retrouve ce gène sur le chromosome X (Shafi et al. 2000; Nolte and Müller 2002). Sur le plan génétique, les mutations OGT sont associées à une déficience intellectuelle (Niranjan et al. 2015; Vaidyanathan et al. 2017; Willems et al. 2017; Pravata et al. 2019; Pravata, Gundogdu, et al. 2020; Pravata, Omelková, et al. 2020). Les transcrits codant le gène *OGT* humain sont retrouvés dans tous les types cellulaires mais à des niveaux très élevés dans les cellules immunitaires (lymphocytes T, B et macrophages) ainsi que dans les cellules β pancréatiques et le système nerveux central (John A. Hanover, Krause, and Love 2010).

L'enzyme OGT présente 3 isoformes différents (**Figure 6**). Elles se distinguent par leur localisation et leur masse moléculaire. L'isoforme mitochondriale (mOGT) possède une séquence d'adressage à la mitochondrie (*mitochondrial targeting sequence* MTS). Au niveau de l'extrémité N-terminale, les isoformes présentent des répétitions de tétra-peptides (TPR). Les TPR sont des motifs de 34 acides aminés contenant une séquence consensus rassemblés pour former une superhélice (Lamb, Tugendreich, and Hieter 1995). Ces motifs sont responsables de la reconnaissance des protéines cibles de l'enzyme OGT (Blatch and Lässle 1999). L'OGT est une protéine bifonctionnelle. Tous les isoformes présentent deux domaines catalytiques (CDI et CDII) commun au niveau de l'extrémité C-terminale (Roos and Hanover 2000). Le CDI est le domaine portant l'activité enzymatique tandis que le CDII permet la liaison avec l'UDP-GlcNAc (Wrabl and Grishin 2001).

L'enzyme est principalement retrouvée sous la forme d'un homotrimère constitué de trois ncOGT ou hétérotrimère constitué de deux ncOGT et d'un sOGT (Haltiwanger, Blomberg, and Hart 1992; Kreppel, Blomberg, and Hart 1997) (**Figure 6**).

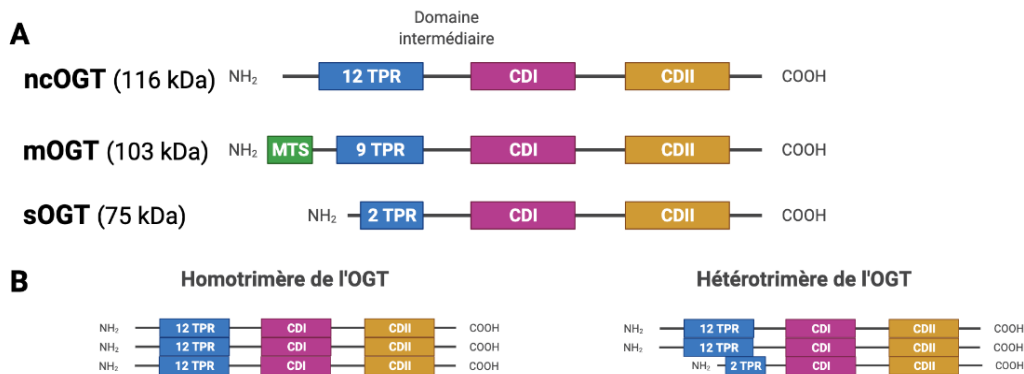


Figure 6: Représentation schématique de la structure protéique des trois isoformes de l'OGT humaine (A) et les conformations homo/hétérotrimères de l'enzyme OGT (B).

Les TPRs (répétitions de tétra-peptides) (bleu), le MTS (domaine d'adressage vers la mitochondrie) (vert), le domaine catalytique I (CDI) (violet) et le domaine catalytique II (CDII) (jaune).

ii) Les régulateurs et inhibiteurs de l'enzyme OGT

L'UDP-GlcNAc est le substrat donneur du résidu GlcNAc à l'enzyme OGT. Une étude *in vitro* a montré que de fortes concentrations d'UDP-GlcNAc (200 mM) permettent de réguler l'activité de l'enzyme (Dorfmueller et al. 2011), suggérant l'existence d'un rétrocontrôle. Lors de l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques de l'enzyme OGA, l'équilibre engendre une diminution de l'expression de l'enzyme OGT (Zhang et al. 2014). Cependant, aucune variation de l'expression de l'enzyme OGT n'est observée en cas de KO pour OGA (Yehezkel et al. 2012). L'enzyme OGT est la cible de plusieurs types de modifications post-traductionnelles. De manière générale, la phosphorylation d'OGT induit son activité glycosyltransférase (Kreppel, Blomberg, and Hart 1997; Dephoure et al. 2008; Olsen et al. 2010). À ce jour, leur influence n'est pas totalement élucidée.

L'étude de l'enzyme OGT peut se faire par modifications génétiques. Il existe des systèmes de recombinaison CRE-LoxP qui suppriment le gène *OGT* dans des tissus et des types cellulaires spécifiques (John A. Hanover, Krause, and Love 2010; Watson et al. 2014). L'enzyme OGT est essentielle au cours du développement des mammifères, le KO étant décrit comme létal dans les embryons de souris (Shafi et al. 2000) ou à 4 semaines par induction du KO (Ida et al. 2017). Des délétions de l'enzyme OGT tissu-spécifiques ont été également réalisées au niveau des cardiomyocytes, des muscles squelettiques, du foie, du tissu adipeux, des cellules β pancréatiques, des cellules immunitaires (macrophages, cellules T), des cellules épithéliales intestinales et des

neurones (O'Donnell et al. 2004; Watson et al. 2010; 2014; Ida et al. 2017; Dassanayaka et al. 2017; Murata et al. 2018; Shi et al. 2018; Wei-Zhong Zhu et al. 2019; Al-Mukh et al. 2020; Mu et al. 2020). La limite de ces modèles étant que la déplétion totale ou partielle provoque une perte concomitante des activités catalytiques et non-catalytiques. Ceci est donc inadapté aux expériences destinées à améliorer nos connaissances sur ces activités (Trapannone, Rafie, and van Aalten 2016).

Afin d'étudier l'impact de l'OGT sur les processus cellulaires, le développement d'inhibiteurs pharmacologiques s'est imposé. Ces inhibiteurs permettent d'explorer le rôle biologique de la O-GlcNAcylation chez les eucaryotes. Un très grand nombre de composés ont donc été développés (**Annexe 2**). Leur utilisation a permis des avancées scientifiques importantes liant le métabolisme de la O-GlcNAcylation aux pathologies. Tous ces composés provoquent une diminution des niveaux de O-GlcNAcylation des protéines totales. Cependant, les effets hors cible de ces inhibiteurs de l'OGT et leur manque d'internalisation intracellulaire nécessitent le développement de nouveaux inhibiteurs qui devront être plus puissants et sélectifs.

c) *Les hexosaminidases*

Les β -N-acétylhexosaminidases sont une classe importante de glycosidases qui catalysent le clivage des monosaccharides terminaux N-acétyl-B-D-hexosamines, N-acétylglucosamine (GlcNAc) et N-acétylgalactosamine (GalNAc) de divers oligosaccharides et glycoconjugués. Les mammifères possèdent quatre gènes codant ces enzymes (*HEXA*, *HEXB*, *HEXC* et *HEXDC*). Les gènes *HEXA* et *HEXB* codent respectivement une sous-unité α et une sous-unité β . Les sous-unités se dimérisent pour former trois isoenzymes : l'hexosaminidase A (*HEXA*), l'hexosaminidase B (*HEXB*) et l'hexosaminidase S (*HEXS*) (Calhoun et al. 1985; O'Dowd et al. 1985; Srinivasan et al. 2007). Ces trois isoenzymes sont localisées dans le lysosome, où elles hydrolysent les résidus GlcNAc et GalNAc terminaux des glycoconjugués et des oligosaccharides. Ces trois isoenzymes sont actives à pH acide et elles ont été très étudiées dans des maladies génétiques comme la maladie de Sandhoff et de Tay-Sachs. Les hexosaminidases A et B appartiennent à la famille 20 des glycosides hydrolases (GH20) du système de classification des enzymes ayant une activité glucidique (Carbohydrate-Active Enzymes database (CAZy; <http://www.cazy.org>)) (Lombard et al. 2014). L'O-GlcNAcase (OGA), codée par le gène *HEXC*, est une β -hexosaminidase (Gao et al.

2001). Cette enzyme élimine les résidus GlcNAc des protéines portant des N-acétylglucosamines O-liées aux résidus de sérine et de thréonine des protéines. Elle a été impliquée dans un grand nombre de processus physiologiques et s'est également avérée essentielle au développement des mammifères (L. Wells 2001). L'OGA est active à un pH neutre et appartient à la famille 84 des glycosides hydrolases (GH84) dans la classification CAZy. Récemment, un quatrième gène *HEXDC* codant une β -hexosaminidase de mammifère *HEXDC* a été identifié (Gutternigg et al. 2009; Alteen et al. 2016).

i) L'O-GlcNAcase, l'enzyme de dé-OglcNAcylation

1) Généralités sur l'enzyme OGA

La O-GlcNAcase (OGA) est la seule enzyme qui permet le retrait du groupement GlcNAc des protéines. L'OGA est une β -N-acétylglucosaminidase neutre cytosolique qui a été identifiée pour la première fois en 1974 dans des extraits cellulaires bruts et a été appelée hexosaminidase C pour la distinguer de ses homologues localisés dans les lysosomes (Braidman et al. 1974; Overdijk et al. 1981). L'OGA diffère de ces dernières par sa localisation et son pH d'activité optimal. Elle est, en effet, localisée principalement dans le cytoplasme et son activité est maximale entre les pH 5,5 et 7. La O-GlcNAcase a été purifiée, séquencée et clonée. La séquence s'est avérée être identique à un gène précédemment identifié, l'antigène 5 exprimé par les méningiomes (*meningioma expressed antigen 5 MGEA5*) (Heckel et al. 1998; Comtesse, Maldener, and Meese 2001). Le gène *MGEA5* est présent sur le chromosome 10 au niveau du locus q24.1-q24.3. Ce locus est associé à la maladie d'Alzheimer et chez certaines populations d'Amérique du sud à une prédisposition au diabète de type 2 (Bertram et al. 2000; Lehman et al. 2005). Comme l'OGT, l'OGA est hautement conservée au cours de l'évolution entre les espèces. L'OGA humaine présente 98 % d'homologie avec l'OGA murine (Gao et al. 2001). Son expression est ubiquitaire avec une distribution tissulaire semblable à celle de l'OGT. Elle est exprimée aux niveaux les plus élevés dans le pancréas, le cerveau et le thymus.

Cette enzyme OGA comprend 916 acides aminés et est composée de trois domaines :

- un domaine N-terminal avec une activité catalytique similaire à celle des glycosides hydrolases ;
- un domaine central de liaison à l'OGT (Whisenhunt et al. 2006) ;

- un domaine C-terminal avec une séquence homologue aux histones acétyltransférases (HAT), son rôle n'est pas totalement encore élucidé (**Figure 7**) (X. Yang and Qian 2017).

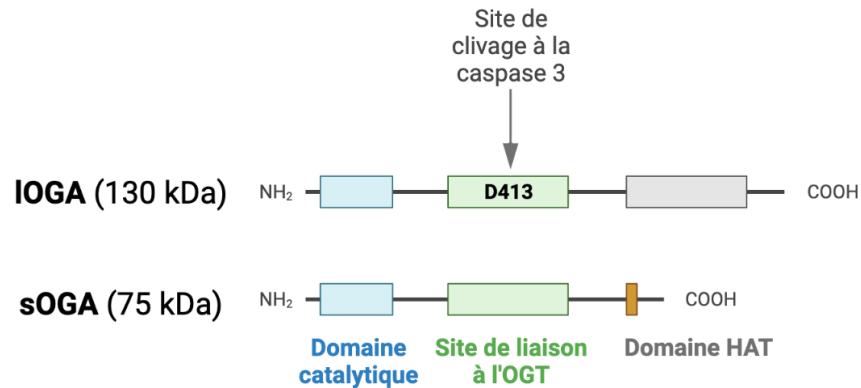


Figure 7 : Représentation schématique de la structure peptidique de l'enzyme OGA inspiré de la revue X. Yang et Qian 2017 (X. Yang and Qian 2017).

HAT : Histone AcétylTransférase.

Il existe deux isoformes de cette enzyme : une forme longue (IOGA) et une forme courte (sOGA). La forme longue de 130 kDa (IOGA) est retrouvée au niveau nucléocytoplasmique. La forme courte correspond à une forme tronquée de l'OGA de 75 kDa (sOGA) qui ne possède pas de domaine HAT et que l'on retrouve dans le réticulum endoplasmique et dans les gouttelettes lipidiques (Comtesse, Maldener, and Meese 2001; Keembiyehetty et al. 2015). L'activité de l'isoforme sOGA est réduite par rapport à l'isoforme IOGA et joue un rôle dans la stabilité des gouttelettes lipidiques ainsi que dans la dégradation protéasomale des protéines situées à leur surface (Eun Ju Kim, Kang, et al. 2006; Macauley and Vocadlo 2009).

2) Activité catalytique de l'enzyme OGA

Le mécanisme catalytique de l'enzyme OGA a été découvert pour la première fois par Vocadlo et ses collaborateurs (**Figure 8**) (Macauley et al. 2005). Il se décompose en deux étapes. La première étape permet la libération du substrat protéique, en passant par un intermédiaire oxazoline. La deuxième étape permet la libération du sucre de l'enzyme (Macauley, Stubbs, and Vocadlo 2005). Les deux résidus catalytiques clés de l'OGA humaine sont deux aspartates 174 et 175 (Cetinbaş et al. 2006). Les deux aspartates 243 et 242 permettent la liaison au substrat (Elbatrawy, Kim, and Nam 2020).

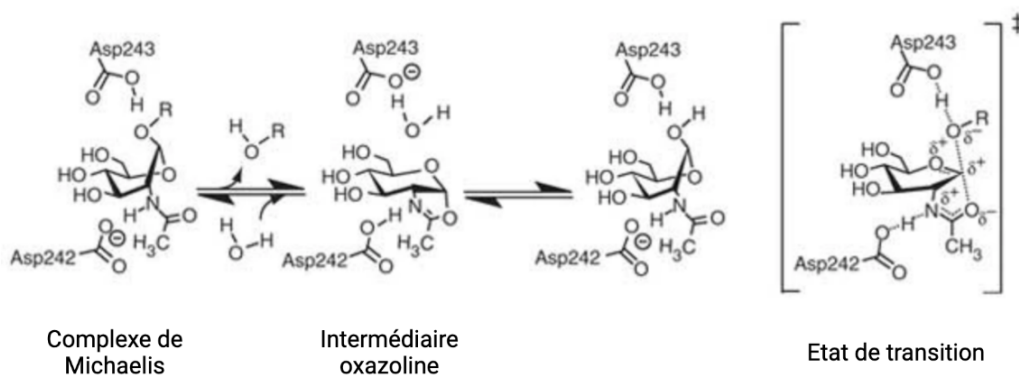


Figure 8 : Mécanisme catalytique en deux étapes de l'enzyme OGA inspiré Elbatrawy et al. 2020 (Elbatrawy, Kim, and Nam 2020).

R : groupement partant ; *Asp* : aspartate.

Tout comme l'enzyme OGT, l'isoforme longue lOGA est également une protéine bifonctionnelle possédant à la fois un domaine catalytique et un domaine HAT présentant une homologie avec les HAT de type GCN5 (*General Control Non-repressed 5 protein*) (Schultz and Pils 2002). La protéine GCN5 appartient à une famille d'histone acétyltransférases (HAT) ayant la capacité de fixer de l'acétyl-coA et régulant la fonction des protéines par acétylation (Xue-Franzen et al. 2013). Malgré les premiers travaux *in vitro* qui suggéraient une activité HAT (Toleman et al. 2004), d'autres études n'ont pas confirmées ces résultats (Butkinaree et al. 2008) et suggèrent que la région devrait donc être qualifiée de "pseudo-HAT" (Akan et al. 2018). L'isoforme sOGA possède une extension C-terminale unique de 15 acides aminés et ne possède pas le domaine "pseudo-HAT". Cette forme tronquée est suffisante pour permettre le maintien d'une activité hydrolase mais cette activité *in vitro* est plus faible pour certains substrats (Eun Ju Kim, Kang, et al. 2006; Macauley and Vocadlo 2009; J. Li et al. 2010). Cela suggère que les cofacteurs cellulaires ou la région C-terminale peuvent être importants pour le ciblage, le repliement correct ou l'activité enzymatique de l'OGA.

À l'intérieur du domaine d'interaction avec l'OGT, l'asparagine 413 est un site de clivage de la caspase 3, qui n'abroge pas l'activité de l'OGA *in vitro* (L. Wells 2001) et *in vivo* lors de l'apoptose (Butkinaree et al. 2008) (**Figure 7**). Individuellement, les deux formes tronquées de l'OGA générées suite à la coupure par la caspase 3 n'ont pas d'activité catalytique significative lorsqu'elles sont transfectées séparément dans les cellules HeLa. En revanche, lorsque le clivage

de l'OGA est induit dans les cellules, l'efficacité de l'activité hydrolase est comparable à celle de l'OGA non clivée. Il a été proposé qu'après la coupure protéolytique, les deux parties N- et C-terminales se réassemblent spontanément ou restent associées (L. Wells 2001; Butkinaree et al. 2008). Le rôle physiologique de cette coupure sur l'OGA reste cependant à déterminer.

3) Les régulateurs clés et délétions génétiques de l'enzyme OGA

L'expression de l'enzyme OGA est très finement régulée. Il semble exister une boucle compensatoire entre l'équilibre de l'enzyme OGT et OGA. En effet, lorsque la O-GlcNAcylation est diminuée dans des fibroblastes issus de souris KO OGT, les niveaux d'expression de l'OGA sont augmentés (Kazemi et al. 2010). Comme les enzymes décrites précédemment, GFAT et OGT, l'enzyme OGA est la cible de modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation et la O-GlcNAcylation retrouvées dans différents tissus tels que le cerveau de rat, de souris et les cellules souches embryonnaires humaines (Khidekel et al. 2007; Rigbolt et al. 2011; Trinidad et al. 2012). Cependant, ces MPT ne semblent pas modifier l'activité de l'enzyme OGA et leurs rôles ne sont pas totalement déterminés.

Afin d'améliorer nos connaissances sur les fonctions cellulaires de l'enzyme OGA, des modèles animaux KO OGA ont été générés. Le KO de l'OGA chez *C. elegans* reproduit un grand nombre des changements métaboliques et de signalisations associés à la résistance à l'insuline chez l'Homme. Dans cette situation, le nématode est viable mais il présente des dérégulations dans le stockage des lipides et du glycogène (Forsythe et al. 2006). Cependant, une étude menée en 2012 sur des rongeurs a montré le rôle central de l'enzyme OGA au cours du développement car l'extinction de son gène provoque un retard embryonnaire des souris et une létalité périnatale. Les fibroblastes embryonnaires KO OGA présentaient des défauts mitotiques et une instabilité génomique (Y. R. Yang et al. 2012).

L'étude de l'enzyme OGA peut également être réalisée par l'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques induisant une augmentation de la O-GlcNAcylation des protéines. Nous allons nous intéresser à l'atout de la stimulation des niveaux de O-GlcNAc dans un contexte pathologique pour comprendre l'intérêt de l'optimisation des inhibiteurs de l'OGA.

III) Impact de la O-GlcNAcylation dans les mécanismes physiopathologiques

La O-GlcNAcylation des protéines repose sur un équilibre dynamique. Le maintien de l'homéostasie des niveaux de O-GlcNAcylation est essentiel au fonctionnement normal de l'organisme chez l'Homme ainsi que chez de nombreuses espèces. Lors de la perturbation de l'homéostasie, il a été démontré que la O-GlcNAcylation était impliquée dans la pathogenèse de nombreuses maladies humaines (X. Yang and Qian 2017).

A) Effets physiologiques des variations de la O-GlcNAcylation

1) Variations au cours du développement

La communauté scientifique s'est rapidement rendu compte de l'importance de la O-GlcNAcylation au cours du développement embryonnaire. Comme les études citées précédemment, la délétion des gènes *OGT/OGA* dans les modèles animaux conduit majoritairement à des organismes non viables. Ces études génétiques ont permis d'établir le rôle essentiel de la O-GlcNAcylation au cours du développement (Gerald W. Hart et al. 2011b).

En 2020, Dupas, Denis et leurs collaborateurs ont étudié la O-GlcNAcylation des protéines lors du développement post-natal chez le rat. Il s'avère que le régime alimentaire, donc les transitions métaboliques subies par l'organisme au cours de cette période, ne semble pas influencer les niveaux de O-GlcNAcylation de protéines de différents tissus. Pendant la période fœtale, le cœur dépend entièrement du glucose et du lactate pour générer de l'ATP. Après la naissance, le métabolisme cardiaque passe rapidement aux lipides dérivés du lait maternel pour la production d'ATP, avant de passer à un mélange de glucides et de lipides à l'âge adulte. Les chercheurs ont pu mettre en évidence une réduction constante des niveaux de O-GlcNAcylation cardiaque de la naissance jusqu'à l'âge adulte. Les niveaux de O-GlcNAcylation cérébrale et hépatique semblent légèrement augmentés pendant les premiers stades de la vie. Par conséquent, la O-GlcNAcylation des protéines s'adapte au cours du développement en fonction du tissu cible (Dupas et al. 2021).

2) Maintien de l'homéostasie des niveaux O-GlcNAcylation

Du fait de son rôle central dans la régulation spatio-temporelle des processus cellulaires en réponse à des signaux nutritionnels et hormonaux, la O-GlcNAcylation fait l'objet d'un équilibre très précis. Yang et Qian proposent l'existence d'une "zone optimale" des niveaux totaux de O-GlcNAcylation permettant de préserver une fonction cellulaire normale (X. Yang and Qian 2017) (Figure 9).

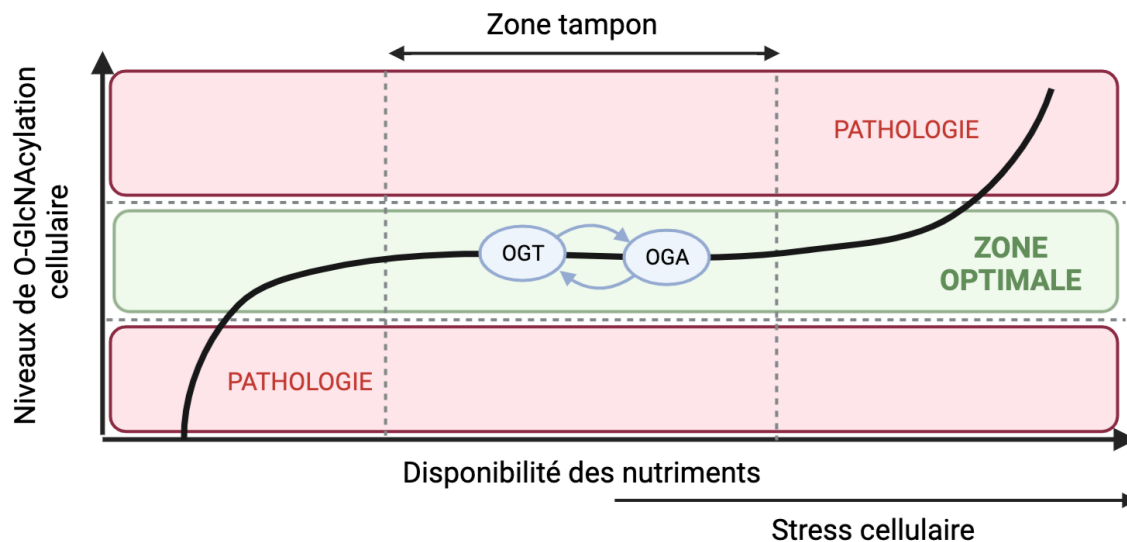


Figure 9 : Homéostasie des niveaux de O-GlcNAcylation totaux cellulaire et système de régulation commun par le couple d'enzyme OGT/OGA dépendant de la disponibilité des nutriments et du stress cellulaire inspiré de Yang et Qian en 2017 (X. Yang and Qian 2017).

Lors de la présence de stress légers ou de perturbations modérées et aiguës de la disponibilité des nutriments, les niveaux de O-GlcNAcylation totaux semblent être maintenus grâce à la régulation concomitante du couple OGT/OGA. Ce système "tampon" semble être dû à l'équilibre précis entre de l'expression et l'activité des enzymes OGT/OGA. Des preuves de ces mécanismes ont été identifiées. Par exemple, l'enzyme OGA est capable d'augmenter l'expression de l'enzyme OGT et inversement, une inhibition pharmacologique de l'enzyme OGA semble favoriser une transcription compensatoire du gène *MGEA5* (Zhang et al. 2014). De plus, comme décrit précédemment, ce couple d'enzyme est connu pour être lui-même O-GlcNAcylé. Ce phénomène suggère une auto-régulation post-traductionnelle fine (Kreppel, Blomberg, and Hart 1997; Khidekel et al. 2007).

En cas de perturbations sévères et chroniques, les niveaux de O-GlcNAcylation totaux tendent à varier de manière importante. En effet, un stress excessif et/ou une carence prolongée en nutriments perturbent le système “tampon” cellulaire. On observa alors une perte de l’homéostasie, contribuant à la pathogénie de diverses maladies humaines (**Figure 9**).

B) La O-GlcNAcylation en lien avec des pathologies

La O-GlcNAcylation ubiquitaire repose sur un processus dynamique. Cette modification post-traductionnelle joue un rôle croisé avec la phosphorylation et dépend de nombreux facteurs. Il n’est pas surprenant qu’on la retrouve décrite dans diverses pathologies humaines. La chronicité de la pathogenèse est une notion essentielle lorsque l’on aborde cette modification post-traductionnelle. En effet, dans les maladies chroniques comme le diabète, la neurodégénérescence, les maladies cardiovasculaires et le cancer, une hyper-O-GlcNAcylation chronique est délétère. Dans le cadre de la recherche thérapeutique, il apparaît donc intéressant de réduire les niveaux de O-GlcNAcylation pour pallier à ces effets néfastes. De nombreuses études ont toutefois également démontré son effet bénéfique dans le contexte de pathologies aiguës (principalement dans des situations de choc septique et hémorragique). Dans ce contexte, il pourrait être intéressant de stimuler les niveaux de O-GlcNAcylation totaux pour limiter les dommages encourus.

1) Les niveaux de la O-GlcNAcylation sont dérégulés dans les pathologies chroniques

a) Les cancers

Le cancer repose sur une reprogrammation métabolique lors de laquelle la glycolyse devient la principale source d’énergie. Le glucose pénètre de manière accrue dans les cellules cancéreuses. Il permet l’augmentation de la glycolyse mais permet aussi de stimuler de manière plus importante la voie de biosynthèse des hexosamines (Z. Ma and Vosseller 2014). Dans ce contexte, les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines qui reposent sur un système de régulation complexe ne sont pas toujours augmentés. Parmi les protéines cibles, de nombreux suppresseurs de tumeurs et oncogènes sont O-GlcNAcylés dont la protéine c-Myc (Chou, Hart, and Dang 1995), la protéine pRB (Lance Wells, Slawson, and Hart 2011), le suppresseur de tumeur HIC1

(Lefebvre et al. 2004). L'interaction entre la O-GlcNAcylation et la phosphorylation sur la sérine 16 module également les fonctions des récepteurs aux œstrogènes, impliqués dans la progression de certains cancers du sein (Cheng and Hart 2001). La O-GlcNAcylation joue un rôle majeur au sein des cellules cancéreuses impactant la prolifération, la survie, l'invasion, l'angiogenèse et les métastases (Z. Ma and Vosseller 2014).

b) Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 est un désordre métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique due à une résistance des cellules à l'insuline (Abdul-Ghani 2013). Les complications à long terme du diabète de type 2 sont liées à la perturbation du métabolisme lipidique, à la glucotoxicité, à la formation des produits finaux de glycation et au stress oxydant (Brownlee 2001; Abdul-Ghani 2013). La O-GlcNAcylation a rapidement été associée au diabète et à la toxicité du glucose (D. A. McClain and Crook 1996; Donald A. McClain 2002). L'hyperglycémie chronique induit une altération des voies de signalisation intracellulaires (Park, Ryu, and Lee 2005; Gandy, Rountree, and Bijur 2006; Soesanto et al. 2008; Whelan et al. 2010; S. Wang et al. 2012), du turn-over des facteurs de transcription provoquant une expression anormale des gènes (Andrali, Qian, and Ozcan 2007; Gao, Miyazaki, and Hart 2003) au sein de différents tissus (Vaidyanathan and Wells 2014). L'hyperglycémie chronique entraîne des altérations à long terme sur les fonctions cellulaires dont la O-GlcNAcylation des protéines. En 2008, une étude soutient l'implication directe de la O-GlcNAcylation et la voie de biosynthèse des hexosamines dans la résistance à l'insuline (Whelan, Lane, and Hart 2008; X. Yang et al. 2008).

La O-GlcNAcylation élevée de manière chronique dans le diabète de type 2 serait impliquée dans la physiopathologie des cardiomyopathies diabétiques (R. J. Clark et al. 2003; Ramirez-Correa et al. 2008; Y. Hu et al. 2009; J. Ma et al. 2016). Cela entraîne une décroissance prolongée de la concentration de calcium intracellulaire et une diminution de l'expression de SERCA2a dans les cardiomyocytes (R. J. Clark et al. 2003). En 2008, Ramirez-Correa et ses collaborateurs ont montré que la O-GlcNAcylation excessive des protéines contractiles du muscle cardiaque contribue à leur dysfonctionnement dans le diabète (Ramirez-Correa et al. 2008).

Dans ces contextes pathologiques de cancer et de diabète de type 2, la O-GlcNAcylation des protéines est responsable d'effets délétères. Il apparaît donc pertinent de

diminuer les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques de l'enzyme OGT.

c) Les maladies neurodégénératives

Les niveaux de O-GlcNAcylation sont particulièrement abondants dans le cerveau. Un lien a été établi entre un défaut du métabolisme glucidique et les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Shafi et al. 2000; Dias and Hart 2007).

Les dépôts de peptide amyloïde (A β 1-42) sous forme de plaques et l'hyperphosphorylation de la protéine Tau à l'origine de la dégénérescence neurofibrillaire sont les deux mécanismes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer. Une perturbation du métabolisme du glucose intra-cérébral est également retrouvée. Dans ce contexte pathologique, on observe une diminution des niveaux de O-GlcNAcylation. Dans un cerveau sain, la protéine Tau est fortement O-GlcNAcylée tandis qu'elle est hyperphosphorylée en cas de pathologie (Gerald W. Hart et al. 2011b; Y. Zhu et al. 2014) (**Figure 10**). La O-GlcNAcylation semble donc neuroprotectrice, et une stimulation de celle-ci pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante dans le traitement de la maladie d'Alzheimer ou pour d'autres tauopathies (Vaidyanathan and Wells 2014; Y. Zhu et al. 2014). Le ciblage pharmacologique de l'enzyme OGA, qui diminue les niveaux de O-GlcNAcylation, s'est révélé prometteur dans les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. La maladie d'Alzheimer est la première indication pour laquelle une étude de phase I d'essai clinique a été mise en place pour un inhibiteur de l'enzyme OGA (Selnick et al. 2019).

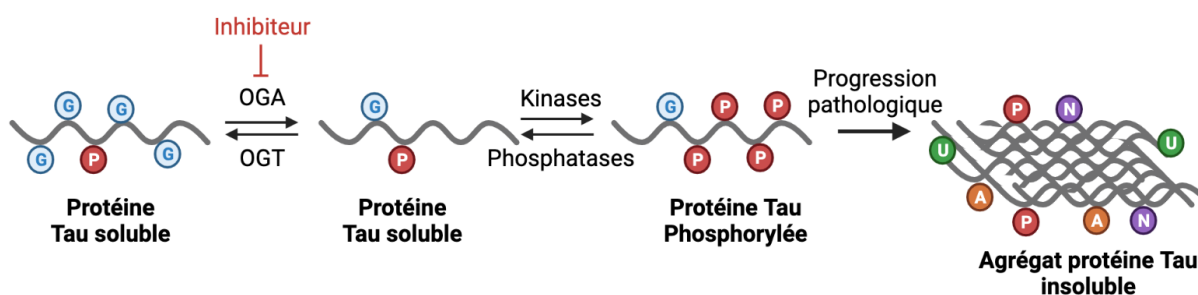


Figure 10 : Hypothèse de l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation des protéines empêchant l'agrégation de la protéine Tau d'après (Selnick et al. 2019).

La modification cellulaire de la protéine Tau avec O-GlcNAc (G) par OGT maintient la protéine sous une forme soluble stable. Les niveaux d'équilibre de O-GlcNAc sont maintenus par les actions antagonistes de l'OGT et de l'OGA. Les protéines peuvent être phosphorylées (P) par les kinases et déphosphorylées par les phosphatases. Ces protéines sont couplées à des modifications supplémentaires, notamment l'ajout de groupes nitro (N), acétyle (A) et ubiquitine (U), conduisant à des oligomères puis à des agrégats Tau insolubles.

d) Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Les maladies cardiovasculaires regroupent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins ('Cardiovascular diseases (CVDs)'). Dans un modèle d'accident vasculaire cérébral avec occlusion transitoire ou permanent de l'artère cérébrale moyenne, l'injection intra-péritonéale (IP) de Thiamet G, puissant inhibiteur de l'enzyme OGA, a permis à la fois de réduire l'infarctus chez les souris et d'améliorer les scores neurologiques chez les souris âgées (M. Jiang et al. 2017). Une augmentation de la O-GlcNAcylation des protéines a été constatée dans des biopsies cardiaques de patients atteints de sténose aortique par rapport aux patients non hypertrophiés (Lunde et al. 2012). Chez les patients souffrant d'une insuffisance cardiaque, une augmentation d'environ 20 % des niveaux totaux de O-GlcNAcylation des protéines a été observé par rapport aux individus sans insuffisance cardiaque (Dassanayaka et al. 2017). Plusieurs études ont montré qu'une O-GlcNAcylation excessive et prolongée conduit au dysfonctionnement mitochondrial dans les cardiomyocytes notamment par la modification des protéines clés de la chaîne de transport des électrons (Y. Hu et al. 2009; P. S. Banerjee, Ma, and Hart 2015).

2) Impact de la O-GlcNAcylation dans les pathologies aiguës

La chronicité de la pathologie et l'impact sur l'organisme est une notion centrale lors de l'étude de la O-GlcNAcylation. Dans le cadre des pathologies aiguës, nous allons nous concentrer sur l'impact de la O-GlcNAcylation des protéines cardiaques au vu des études montrant un effet cardioprotecteur.

De nombreuses études ont mis en évidence un effet cardioprotecteur de la stimulation aiguë de la O-GlcNAcylation. La stimulation prévient les lésions tissulaires lors d'un infarctus du myocarde en lien avec le stress oxydant, la surcharge calcique, le stress du réticulum endoplasmique ainsi que dans les lésions causées par l'ischémie/reperfusion ou durant un choc hémorragique (Fülöp et al. 2007; Fülöp, Marchase, and Chatham 2007; Jones et al. 2008; Chatham and Marchase 2010; Marsh, Collins, and Chatham 2014; Jensen et al. 2019). Cette protection a également été observée lors de dysfonction contractile induite par le sepsis (Ferron et al. 2019).

Les niveaux d'O-GlcNAcylation peuvent être stimulés par plusieurs méthodes telles que l'apport de glucosamine qui permet de stimuler la voie de biosynthèse des hexosamines en shuntant l'enzyme GFAT ou l'utilisation d'inhibiteur pharmacologique d'OGA (e.g. NButGT, Thiamet G). Cette stimulation aiguë participe à la récupération myocardique et améliore la survie des animaux (J. Liu et al. 2006; Laczy et al. 2010). En 2019, Lauzier et ses collaborateurs ont montré que la stimulation des niveaux d'O-GlcNAcylation induit une amélioration des fonctions cardiovasculaires, hépatiques et rénales, des marqueurs de souffrance tissulaire et une réduction de la mortalité dans 2 modèles de choc septique sur des rats adultes (Ferron, Cadiet, et al. 2019) et chez le rat jeune (Denis et al. 2021).

La même équipe de recherche travaille sur diverses pathologies aiguës dont le point commun est l'état de choc. Ce syndrome clinique correspond à une incapacité du système circulatoire à assurer les besoins de l'organisme, ce qui conduit à une altération de l'oxygénation et du métabolisme des tissus conduisant à une défaillance multi-organes. Cet état de choc est une urgence clinique qui peut rapidement engendrer le décès du patient. Il existe différents types d'état de choc tels que le choc septique ou hémorragique.

a) Le choc septique

En 2017, le choc septique a entraîné le décès de 11 millions de patients dans le monde (Rudd et al. 2020). Il se définit comme un dysfonctionnement d'organes résultant d'une réponse dérégulée de l'hôte à l'infection (Singer et al. 2016). Le sepsis est communément défini comme une cascade évolutive allant du Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique (SRIS) au choc septique.

Un patient est considéré en état de SRIS s'il présente au moins 2 critères suivants (**Figure 11**) :

- une dysfonction respiratoire (fréquence respiratoire ou FR supérieure à 20 respirations/min) ;
- une pression partielle en dioxyde de carbone artériel (PaCO_2) inférieure à 32 mmHg ;
- une dérégulation de la température par une hypothermie (moins de 36°C) ou une hyperthermie (plus de 38°C) ;
- une tachycardie (fréquence cardiaque ou FC supérieure à 90 battements par minute) ;

- un état hyper ou hypo-inflammatoire (avec un compte leucocytaire respectivement supérieur à 12 000 ou inférieur à 4 000 cellules/mL).

Le sepsis correspond ainsi à un SRIS avec une infection suspectée ou confirmée clinico-biologiquement. Il peut évoluer vers un sepsis sévère dans lequel s'associe un sepsis avec une défaillance d'organes ou une hypo-perfusion ou une hypotension. *In fine*, le choc septique est un sepsis sévère comprenant une hypotension persistante malgré un remplissage adéquat, accompagné ou non de signes d'hypoperfusion et nécessité d'administration d'amines vasopressives. En outre, le choc septique ajoute une défaillance cardiaque et circulatoire. Le choc septique provoque également une altération des divers métabolismes : lipidique et glucidique (Dhainaut et al. 1987).

Les causes principales des infections septiques sont bactériennes (88 %), virales, parasitaires, fongiques (7 %). Cela provoque principalement des infections pulmonaires, pour environ la moitié des cas mais aussi abdominales et uro-génitales (Angus et al. 2001; Mayr, Yende, and Angus 2014; Quenot et al. 2013) (**Figure 11**).

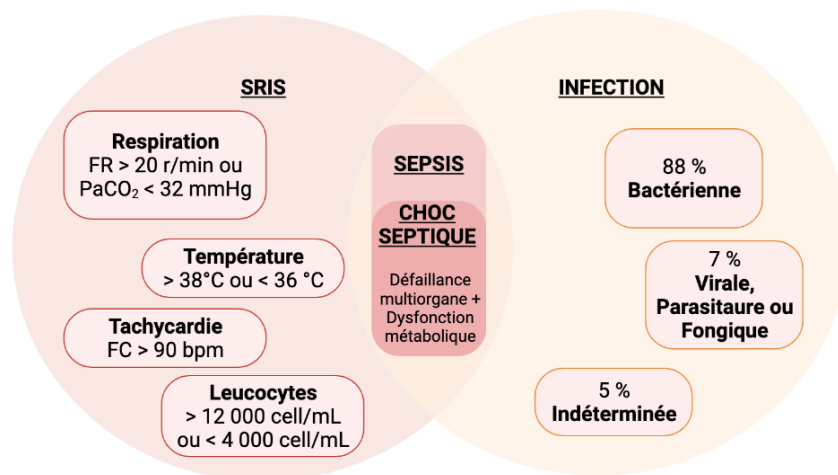


Figure 11 : Définition du sepsis et du choc septique adapté d'après Martin, 2012 (G. S. Martin 2012) issus de la thèse de Marine Ferron 2017.

FC : fréquence cardiaque, *FR* : fréquence respiratoire, *PaCO₂* : pression partielle en dioxyde de carbone artériel, *r/min* : respiration par minute, *SRIS* : syndrome de réponse inflammatoire systémique.

Actuellement, les traitements de référence du choc septique sont : le contrôle de l'infection à l'origine du sepsis par l'administration d'antibiotiques et la correction de l'hypotension par un remplissage vasculaire, associé ou non, à l'administration de vasopresseurs, afin de maintenir une

pression artérielle moyenne suffisante pour assurer une bonne perfusion des organes (Singer et al. 2016). Il existe une notion de la “Golden Hour” basée sur le taux de survie des patients ayant reçu une antibiothérapie dans la première heure de prise en charge. Le taux de survie est de 79,9 % mais diminue de 7,6 % à chaque heure qui passe. Le délai de la prise en charge est donc un déterminant primordial pour la survie des patients (Kumar et al. 2006).

b) Le choc hémorragique

Le choc hémorragique est à l'origine de la moitié des décès après un traumatisme grave. Le choc hémorragique correspond à une perte brutale ou rapide de sang entraînant une perfusion insuffisante des tissus entraînant un déséquilibre entre la demande en oxygène tissulaire et la capacité de l'organisme à en fournir. On distingue classiquement quatre catégories de choc : hypovolémique, cardiogénique, obstructif et distributif. Le choc hypovolémique se produit lorsqu'il y a une diminution du volume intravasculaire au point de compromettre le système cardiovasculaire. Il peut être causé par une déshydratation sévère ou une perte de sang.

Lors d'un choc hémorragique, une augmentation de la fréquence cardiaque et de la contractilité causée la perte de volume sanguin se produit. Cela entraîne une activation du système nerveux sympathique et une vasoconstriction périphérique. En général, on observe une légère augmentation de la pression artérielle diastolique avec un rétrécissement de la pression du pouls. Comme le remplissage ventriculaire diastolique continue à diminuer et que le débit cardiaque diminue, la pression artérielle systolique baisse. Par conséquent, le sang est détourné des membres périphériques pour préserver les organes vitaux tels que le cœur et le cerveau. Ce phénomène a pour finalité de priver les autres tissus d'oxygène, ce qui augmente la production d'acide lactique et aggrave l'acidose. En l'absence de correction ou de prise en charge, l'hypoxémie et l'acidose peuvent entraîner la mort du patient (O'Brien et al. 2020).

La réanimation initiale consiste en priorité à contrôler la source de l'hémorragie ou de la déshydratation puis les dommages. La prise en charge consiste à réaliser un remplissage vasculaire par une réanimation hémostatique. L'utilisation précoce de produits sanguins est préconisée. Une réanimation par cristalloïde est également possible.

La précocité de prise en charge des patients en état de choc est un élément clé pour améliorer la survie des patients. Une augmentation aiguë de la glycémie est fréquemment observée dans les situations de choc. Le stress provoqué par le choc induit une hyperglycémie qui active la voie de biosynthèse des hexosamines. Ce phénomène adaptatif a été rapporté comme améliorant la survie cellulaire en conditions de stress. Par conséquent, il existe un besoin de nouveaux traitements métaboliques dans l'objectif d'améliorer la survie des patients en état de choc. Deux études menées sur le choc septique et hémorragique ont permis d'améliorer la survie des animaux à des temps précoces lors de la combinaison des traitements de références avec des inhibiteurs pharmacologiques de l'enzyme OGA (S. Yang et al. 2006; Ferron, Cadiet, et al. 2019; Denis et al. 2021).

La stimulation de la O-GlcNAcylation des protéines apparaît donc comme une cible thérapeutique pertinente dans les pathologies aiguës. Une des méthodes pour permettre de stimuler les niveaux de O-GlcNAcylation est l'administration d'inhibiteurs enzymatiques de l'enzyme OGA. Au cours des dernières décennies, de nombreuses molécules ont été développées.

Partie 2 : Une voie de recherche thérapeutique pour la prise en charge de ces pathologies aiguës à l'aide de différents inhibiteurs enzymatiques de l'OGA.

I) Les caractéristiques pharmacodynamiques d'un inhibiteur enzymatique de OGA

A) Généralités sur l'utilisation des inhibiteurs de l'OGA in vitro

L'activité basale de l'enzyme OGA est régie par la concentration de substrat disponible. Les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines augmentent jusqu'à atteindre un équilibre. Or, lors de l'ajout d'un inhibiteur compétitif de l'enzyme OGA, l'activité de l'OGA diminue et le K_m (apparent) augmente. Cependant, l'enzyme OGT continue de fonctionner et les niveaux de O-GlcNAcylation vont continuer d'augmenter jusqu'à atteindre un nouvel équilibre (**Figure 12**).

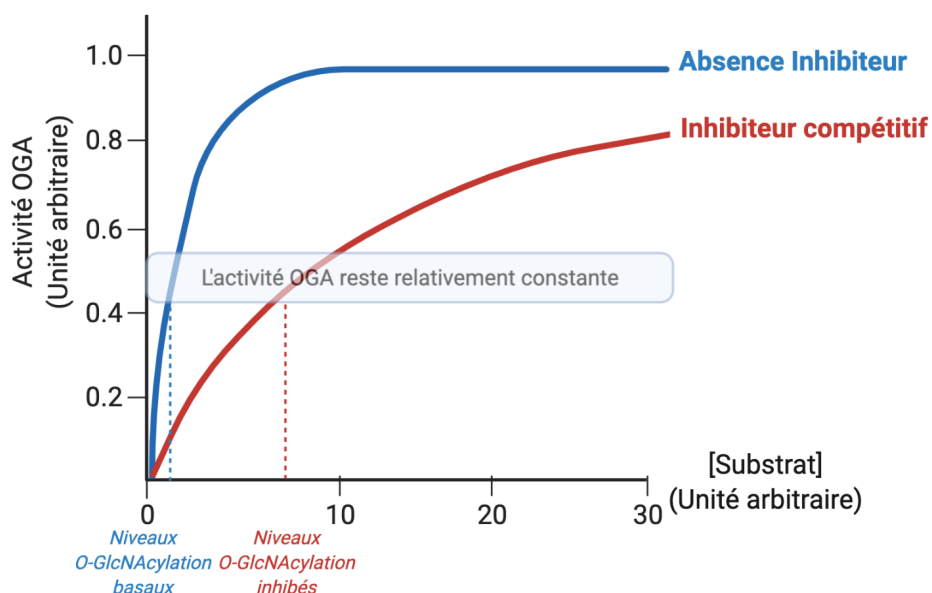


Figure 12 : Cinétique basale et inhibée de l'activité de l'enzyme OGA en fonction de la concentration de substrats selon (Macauley and Vocadlo 2010).

Une étude protéomique quantitative a montré qu'une augmentation de 1,5 à 40 fois des niveaux de O-GlcNAcylation sur les protéines lors du traitement des cellules avec un inhibiteur d'OGA (Khidekel et al. 2007).

B) Les divers inhibiteurs enzymatiques de l'enzyme OGA

De nos jours, de nombreux outils ont été développés pour moduler les niveaux O-GlcNAcylation des protéines. Si les animaux transgéniques KO OGT ou OGA décèdent *in utero* (Shafi et al. 2000; Ida et al. 2017) ou rapidement après l'induction du KO (Y. R. Yang et al. 2012; Keembiyehetty et al. 2015), les inhibiteurs pharmacologiques d'OGT/OGA permettent quant à eux d'étudier la O-GlcNAcylation. Cependant leur développement a été compliqué car ils exercent des effets sur d'autres voies de signalisation. Les inhibiteurs d'OGA ont bénéficié d'un développement plus rapide, ils sont pour la plupart plus solubles dans des solvants compatibles avec le vivant. À ce jour, comme aucune donnée de structure complète de l'OGA humaine n'a été découverte le développement d'inhibiteurs est limité et ils présentent souvent un manque de sélectivité. Les molécules développées présentent une demi-vie très courte (de l'ordre de la dizaine de minutes) et induisent une réponse rapide et réversible sur la fonction de l'enzyme OGA. Les petites molécules développées ont été très largement utilisées pour induire une augmentation des niveaux totaux de la O-GlcNAcylation des protéines au sein de cellules en culture ou chez les animaux pour l'analyse des effets phénotypiques (Elbatrawy, Kim, and Nam 2020).

Parmi les inhibiteurs de l'enzyme OGA développés, une grande majorité a une structure à base de carbohydrates. Historiquement, l'enzyme OGA est inhibée chimiquement à l'aide d'analogues du motif GlcNAc comme la molécule de PUGNAc (D. L. Dong and Hart 1994). Du fait du manque de sélectivité pour l'enzyme OGA (Gao et al. 2001; Mehdy et al. 2012) et la toxicité pour les cellules eucaryotes (Pathak et al. 2008), des dérivés du PUGNAc ont vu le jour comme la GlcNAcstatine (Dorfmueller et al. 2011), la GlcNAc-Thiazoline (Knapp et al. 2007) ou encore l'hybride PUGNAc-imidazole. De nos jours, le NButGT et Thiamet G sont les inhibiteurs de OGA les plus puissants et les plus efficaces (Macauley et al. 2005; Yuzwa et al. 2008) (**Figure 13**). D'autres molécules inhibitrices ont été développées mais ne seront pas présentées en détail. Cependant, certaines molécules inhibant l'OGA ne sont pas basées sur une structure à base d'hydrates de carbone (**Annexe 3**).

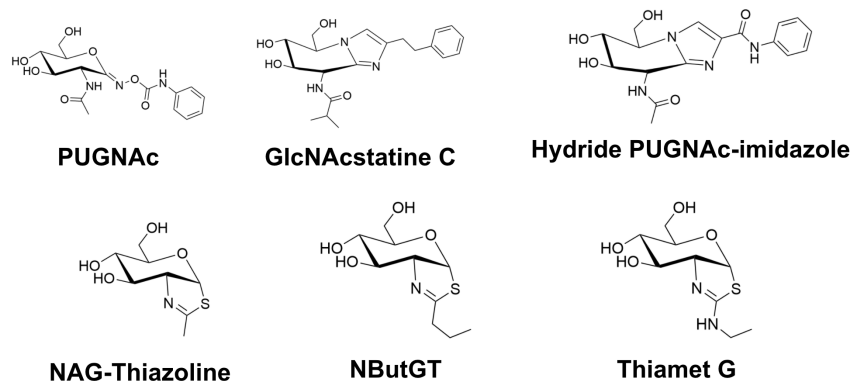


Figure 13 : Quelques inhibiteurs connus de l'OGA humaine (Cekic et al. 2016).

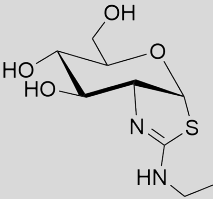
1) Les inhibiteurs à base de carbohydrates

Les inhibiteurs à base d'hydrates de carbone ont suscité un grand intérêt pour l'étude du rôle physiologique de la O-GlcNAcylation (Lillelund et al. 2002). Parmi ces inhibiteurs, nous allons nous intéresser préférentiellement à la molécule de Thiamet G.

a) *Le Thiamet G*

Dans l'objectif d'améliorer la stabilité chimique de la molécule de NButGT, la molécule de Thiamet G, [(3aR,5R,6S,7R,7aR)-2-ethylaminO-3a,6,7,7a-tetrahydrO-5- (hydroxymethyl)-5H-pyrano(3,2-d)thiazole-6,7-diol], a été développée. Le Thiamet G (TG), inhibiteur compétitif d'OGA, est stable dans une solution aqueuse, il présente une affinité de liaison avec l'enzyme OGA 30 fois supérieure à celle du NButGT. Sa sélectivité pour l'enzyme est 37 000 fois supérieure à celle de l'HEXB (Yuzwa et al. 2008). Cet inhibiteur est plus efficace en culture cellulaire pour l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation (CE50 = 30 nM) (Macauley and Vocadlo 2010). La molécule de TG a été administrée par voie intraveineuse (IV), intrapéritonéale (IP) ou par voie orale (VO) dans l'eau de boisson pour les modèles animaux et elle traverse la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Yuzwa et al. 2008; 2014) (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Résumé des données pharmacologiques sur la molécule de Thiamet G (Yuzwa et al. 2008)

	CE50 (nM)	Ki (hOGA) (nM)	Sélectivité
Thiamet G	30	21	37 000

Lors de l'interaction du TG avec l'homologue bactérien de l'enzyme OGA (*Bacteroides thetaiotaomicron* (BtOGA)), il existe des différences importantes avec la molécule de NButGT ce qui pourrait expliquer l'augmentation de sa puissance. En effet, le groupement amine exocyclique permet de rapprocher le TG par une légère contraction du site actif (Yuzwa et al. 2008).

L'étude des paramètres pharmacocinétiques du TG réalisée chez le rat montre que le TG présente une demi-vie ($T_{1/2}$) améliorée par rapport au NButGT (30 min vs 1,4 h) et une distribution tissulaire (V_d) faible. La biodisponibilité (F) du TG est relativement faible (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Paramètres pharmacocinétique du Thiamet G chez le rat mâle (Selnick et al. 2019)

Composé	Fraction libre (% r/h)	Dose IV/VO (mg/kg)	AUC orale ($\mu\text{M.h.kg/mg}$)	Clairance IV ($\text{mL.min}^{-1}.\text{kg}^{-1}$)	$T_{1/2}$ IV (h)	V_d (L/kg)	F (%)
Thiamet G	73/76	1/20	0,8	25,0	1,40	1,50	30,0

AUC : Aire sous la courbe ; *F* : biodisponibilité ; *IV* : intraveineuse ; *r/h* : rat/humain ; *Vd* : Volume de distribution, *VO* : voie orale.

L'inhibiteur TG a été utilisé par de nombreuses équipes de recherche pour étudier l'effet de la stimulation des niveaux de O-GlcNAcylation dans les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer), dans les pathologies cancéreuses ainsi que dans des modèles animaux d'épilepsie (Yu et al. 2012; Borghgraef et al. 2013; C. Kim et al. 2013; Graham et al. 2014; Yuzwa et al. 2014; Ding et al. 2014; Sanchez et al. 2018). McEachern et ses collaborateurs ont déterminé les paramètres pharmacodynamiques de la molécule de TG dans le cerveau du rat après une dose orale unique (Selnick et al. 2019). L'inhibiteur TG a entraîné une augmentation de 85 % des protéines

cérébrales O-GlcNAcylées par rapport au groupe contrôle après 8 heures. Les niveaux des protéines O-GlcNAcylées cérébrales sont restés élevés à 75% après 24 h. La perméabilité apparente (Papp) du TG est relativement faible et sa vitesse de diffusion à travers la BHE est relativement lente, ce qui permet l'accumulation des effets de l'inhibiteur pendant les 8 premières heures (Selnick et al. 2019).

À ce jour, aucune donnée n'est disponible sur la cinétique d'internalisation de la molécule de TG dans les compartiments subcellulaires et en particulier dans la mitochondrie.

À travers tous les inhibiteurs développés à ce jour, il est apparu que des modifications chimiques subtiles de la structure des inhibiteurs affectent de manière importante l'affinité de liaison au sein du site actif de l'enzyme. Il existe un besoin urgent de disposer d'une bibliothèque plus importante d'inhibiteurs de l'enzyme OGA dont des molécules qui agiraient spécifiquement au niveau des protéines mitochondriales O-GlcNAcylées.

II) Le développement d'un nouvel inhibiteur pharmacologique de l'OGA

Les outils d'étude de la modification des protéines sont limités à ce jour. Une grande question reste à investiguer : “Comment la O-GlcNAcylation des protéines peut influencer la localisation spécifique et modifier le rôle des protéines en réponse à diverses conditions physiopathologiques ?”. L'équipe de recherche de Benjamin Lauzier travaille en collaboration avec le laboratoire CEISAM à Nantes. À partir de la structure chimique de la molécule de Thiamet G précédemment décrite, le développement d'inhibiteurs optimisés de la molécule de Thiamet G ciblant la mitochondrie a été réalisé. À terme, l'objectif est de développer une molécule utilisable dans les pathologies aiguës.

A) Le développement d'un inhibiteur de l'enzyme OGA mito-ciblé

1) L'impact du traitement Thiamet G sur les mitochondries cardiaques

Il est désormais reconnu que la O-GlcNAcylation existe de manière dynamique dans les mitochondries, et que cette modification post-traductionnelle module la fonction mitochondriale.

Lors de l'analyse des cœurs de rats traités au Thiamet G à de fortes concentrations en comparaison à ceux non traités, le traitement aigu augmente les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines mitochondriales cardiaques (J. Ma et al. 2015). De plus, le Thiamet G induit une augmentation de la consommation mitochondriale d'oxygène et la production d'ATP. Ce traitement a aussi permis de lever le seuil d'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (*mitochondrial Permeability Transition Pore* mPTP). Une surcharge calcique intracellulaire, un stress oxydant ou une irradiation ionisante, ouvre le mPTP. Il crée un pore dans la membrane mitochondriale et permet la libération dans le cytoplasme du cytochrome C qui provoque l'apoptose de la cellule (J. Ma et al. 2015).

En 2019, Chatham et ses collaborateurs ont étudié l'impact du Thiamet G sur des lignées de cardiomyocytes humains (AC16). Ils ont constaté que l'augmentation aiguë des niveaux de O-GlcNAc par un traitement Thiamet G pendant 6 heures a entraîné une diminution des activités des complexes I, II et IV de transport des électrons mitochondriaux. Le nombre de mitochondries est resté stable, tandis qu'une augmentation de l'expression des protéines du complexe a été observée. Ces variations ont été associées à une accumulation de protéines mitochondriales ubiquitinées. De plus, il est intéressant de noter que l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation des protéines était associée à une diminution de l'expression de la protéase mitochondriale Lon homologue 1 (LonP1). La protéine LonP1 est connue pour cibler les sous-unités du complexe IV et d'autres protéines mitochondriales. Ces données suggèrent que l'altération de la bioénergétique mitochondriale pourrait être due à une altération du renouvellement des protéines du complexe mitochondrial dépendant de LonP1 (Wright et al. 2019).

D'autres études ont évalué l'impact de la O-GlcNAcylation sur la fonction mitochondriale. Lors d'une étude réalisée sur des mitochondries cardiaques isolées, plus d'une centaine de protéines O-GlcNAcylation ont été identifiées notamment les protéines de la phosphorylation oxydative. Une hyper-O-GlcNAcylation mitochondriale aiguë induite *in vitro* par un traitement au NButGT ou au Thiamet G pendant 30 minutes a engendré une diminution importante de la libération des espèces radicalaires oxygénées (*reactive oxygen species* ROS), notamment de peroxyde d'hydrogène. Ce mécanisme semble médié par une activité augmentée du complexe I.

La O-GlcNAcylation des protéines mitochondriales semble jouer un rôle central dans les mécanismes d'adaptation rapide de la fonction mitochondriale (Dontaine et al. 2021).

Du fait de toutes ces observations, il existe un intérêt majeur à développer une molécule agissant spécifiquement sur les protéines mitochondriales.

2) La molécule de TPP-Thiamet G

L'amélioration des connaissances sur les protéines mitochondriales O-GlcNAcylées a poussé l'équipe de recherche de Benjamin Lauzier, dans laquelle j'ai effectué mon stage de master 2, à proposer le développement d'une molécule mito-ciblée pour moduler les niveaux de O-GlcNAcylation mitochondriaux. À partir de la structure chimique du Thiamet G et des travaux de Zielonka et ses collaborateurs publiés en 2017, un analogue du Thiamet G a été développé. Il comporte un linker et un groupement cationique triphénylphosphonium (TPP⁺) (**Figure 14**) permettant de vectoriser la molécule dans la mitochondrie. Le cation TPP⁺ est stabilisé avec un ion triflate ou trifluorométhylsulfonate en solution. Grâce à ce procédé, il est théoriquement possible d'obtenir une concentration de la molécule au niveau de la matrice mitochondriale 100 à 1 000 fois supérieure à celle présente au niveau cytoplasmique (Zielonka et al. 2017). Cette optimisation chimique devrait également pouvoir diminuer les effets délétères de la molécule de Thiamet G au niveau des autres compartiments intracellulaire.

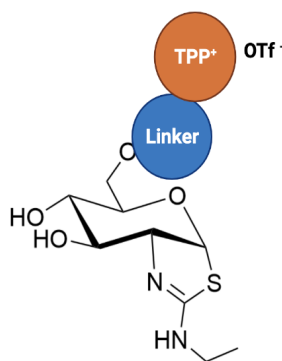


Figure 14 : Structure chimique de la molécule de Triphénylphosphonium-Thiamet G.

TPP : triphénylphosphonium ; *OTf* : triflate ou trifluorométhylsulfonate.

III) Matériels et méthodes

A) Les inhibiteurs pharmacologiques

Dans le cadre du projet ANR-ASTRID hErOiSmE, l'équipe de recherche de Benjamin Lauzier à l'Institut du Thorax, travaille en collaboration avec une équipe de chimiste du laboratoire CEISAM pour la synthèse des inhibiteurs enzymatique de l'enzyme OGA.

Au cours de cette étude, trois inhibiteurs pharmacologiques de l'enzyme OGA ont été utilisés : NButGT (1,2-dideoxy-2'-propyl-alpha-D-glucopyranoso-[2,1-D]-Delta-2'-thiazoline), Thiamet G [(3aR,5R,6S,7R,7aR)-2-éthylamino-3a,6,7,7a-tétrahydrp-5-(hydroxyméthyl)-5H-pyrano(3,2-d)thiazole-6,7-diol] et TPP-Thiamet G. Les cellules ont été traitées à des concentrations de Thiamet G et TPP-Thiamet G allant de 10^{-9} à 10^{-5} M pendant 6 heures.

B) Culture cellulaire

1) La lignée de cardiomyocytes atriaux de souris

Les cellules HL-1 sont une lignée cellulaire de cardiomyocytes, dérivées à partir de cardiomyocytes atriaux de souris (Claycomb et al. 1998). Les cellules HL-1 ont été cultivées avec du milieu spécifique : le milieu de Claycomb (Sigma) enrichi en sérum foetal bovin, L-glutamine, pénicilline, streptomycine et norépinéphrine (Sigma) préparée dans l'acide ascorbique.

C) Analyse protéique

1) Extraction des protéines cellulaires

Les protéines cellulaires issues des cellules HL-1 ont été extraites après l'application d'un tampon de lyse, à pH physiologique. Le tampon de lyse est adapté aux cellules cultivées et contient du SDS (sodium dodécyl sulfate) et du sodium désoxycholate afin de solubiliser les protéines cellulaires totales.

2) Dosage des protéines

Le dosage protéique est un dosage colorimétrique à 560 nm. Il est réalisé à l'aide d'une gamme étalon d'albumine bovine sérique (BSA) d'une concentration de 0 à 1 mg/mL. Le dosage protéique des échantillons permettra de limiter les cycles de congélation-décongélation de la solution mère pouvant modifier les niveaux des différentes modifications post-traductionnelles.

D) Western-blot

Afin d'étudier les variations des niveaux de O-GlcNAcylation des protéines et les niveaux d'expression de la protéine mitochondriale ACSS1, MCU et ATP5A et des protéines cellulaires GAPDH et α -tubuline, des western-blots sont réalisés sur des extraits protéiques des cellules HL-1. L'analyse densitométrique des échantillons protéiques est réalisée par western-blot (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Caractéristiques des anticorps utilisés pour les western-blots

Protéine étudiée	Anticorps primaire			Anticorps secondaire	
	Anticorps		Dilution	Anticorps	Dilution
O-GlcNAc	Ac-RL2-HRP IgG monoclonal de souris	201995 Abcam	1/10 000 [#]	/	/
ACSS1	Ac-ACSS1 IgG monoclonal de lapin	171338-1-AP Protein tech	1/1 000*	Ac-HRP IgG de lapin Cell signaling	1/10 000*
MCU	Ac anti-MCU Polyclonal de lapin	12499 Abcam	1/2 000*	Ac-HRP IgG de lapin Cell signaling	1/10 000*
ATP5A	Ac anti-ATP5A IgG2b kappa monoclonal de souris	14748 Abcam	1/5 000*	Ac-HRP IgG de souris Cell signaling	1/10 000*
GAPDH	Ac anti-GAPDH IgG2b monoclonal de souris	sc-166574	1/5 000*	Ac-HRP IgG de souris Cell signaling	1/10 000*

α-tubuline	Ac anti- α -tubuline monoclonal de souris	T9026	1/10 000*	Ac-HRP IgG de souris Cell signaling	1/10 000*
-------------------------------------	--	-------	-----------	--	-----------

[#] : les dilutions sont effectuées dans une solution de BSA à 3 % ; ^{*} : les dilutions sont effectuées dans une solution de lait à 5 %. Ac : Anticorps, HRP : peroxydase de raifort (horseradish peroxidase).

Pour chaque échantillon, la densité de la bande correspondant à la protéine d'intérêt est rapportée à celle de la moyenne d'intensité des bandes de l'échantillon révélées en stain-free.

E) Dosage l'activité enzymatique OGA par spectrophotométrie

L'activité de la O-GlcNAcase (OGA) *in vitro* est déterminée avec un substrat synthétique, le p-nitrophényl N-acetylglucosaminide (pNP-GlcNAc) (Natasha E. Zachara, Vosseller, and Hart 2011). Lorsque l'enzyme OGA est active, elle clive le pNP-GlcNAc en p-nitrophényl (pNP) et GlcNAc. Le pNP présente un pic d'absorption entre 400 et 415 nm à pH alcalin. Le N-Acétyle-Galactosamine (GalNAc) est inclus dans la réaction pour inhiber les hexosaminidases A et B qui sont présentes dans la préparation enzymatique. Le GalNAc à 50 mM n'a pas d'influence sur l'activité de la O-GlcNAcase. L'activité de OGA est mesurée par spectrophotométrie à 37°C à 2 heures. La réaction enzymatique est arrêtée par le carbonate de sodium (Na₂CO₃) qui augmente le pH (>9,0). Une réaction à blanc sans enzyme est incluse pour déterminer le bruit de fond des différents tampons de la réaction.

La concentration du composé GlcNAc libéré est calculée par la formule suivante :

$$\text{GlcNAc libéré} = \frac{A_{415nm}}{(17,4 \times \text{longueur du trajet optique})}$$

Le coefficient d'extinction molaire de la p-NP est de 17,4 x 10 mM⁻¹.cm⁻¹ à pH 10. La longueur du trajet optique pour 200 µL est de 0,71 cm. L'activité enzymatique finale de l'enzyme OGA est obtenue par la soustraction de l'activité enzymatique totale (contrôle, sans traitement) à l'activité enzymatique en présence des différents inhibiteurs enzymatiques.

IV) Résultats

A) Validation des effets de l'inhibiteur enzymatique mito-ciblé

1) L'inhibiteur pharmacologique TPP-Thiamet G diminue l'activité de l'enzyme OGA

L'activité enzymatique de l'enzyme OGA est mesurée à partir des protéines cellulaires totales extraites des cellules HL-1 après 2 heures d'incubation avec les molécules de Thiamet G et de TPP-Thiamet G (0,1 et 1 μ M). La molécule de Thiamet G induit une diminution de 24 % et 66 % aux concentrations de 0,1 et 1 μ M, respectivement. La molécule de TPP-Thiamet G induit un effet similaire à 1 μ M (-75 %). Cependant, la concentration de 0,1 μ M ne semble pas avoir d'effet sur l'activité de OGA (**Figure 15**).

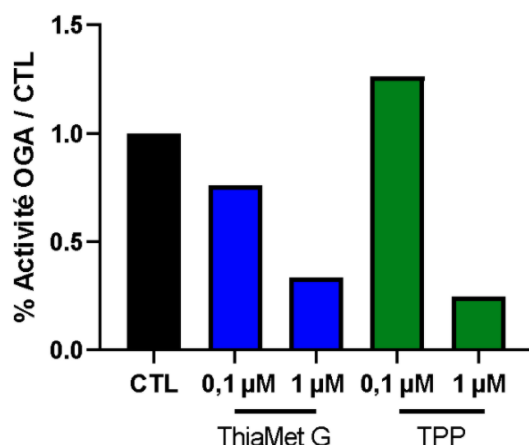


Figure 15 : Variations de l'activité enzymatique de l'enzyme OGA des cellules HL-1 en fonction de différentes concentrations de Thiamet G ou de TPP-Thiamet G

Evaluation par spectrophotométrie de l'activité de l'OGA des protéines cellulaires totales mesurée à 2h. Les cellules sont traitées avec du Thiamet G (0,1 μ M et 1 μ M – en bleu) ou du TPP-Thiamet G (0,1 μ M et 1 μ M – en vert) et comparées aux cellules non traitées (en noir). La quantification de l'activité de OGA est normalisée par rapport à la condition contrôle (CTL). n = 1 (triplicat technique).

2) La molécule de TPP-Thiamet G conserve une efficacité et une puissance sur l'enzyme OGA

Afin d'évaluer l'efficacité et la puissance des inhibiteurs, des courbes concentration-réponse observant les niveaux de O-GlcNAc des protéines cellulaires ont été réalisées. L'apposition du groupement mito-ciblé peut éventuellement affecter les paramètres mesurés. Des cellules HL-1 ont été traitées avec des concentrations croissantes de Thiamet G et TPP-Thiamet G.

L'efficacité maximale ($E_{\max}$) est appréciée sur une courbe concentration-réponse comme la valeur maximale au niveau du plateau de la courbe et reflète l'efficacité d'un inhibiteur pharmacologique. La CE50 correspond à la concentration nécessaire pour observer 50 % de l'effet maximal et reflète la puissance de la molécule. La valeur de CE50 est généralement utilisée pour définir la concentration d'agoniste nécessaire pour provoquer une réponse semi-maximale. Ce terme est parfois aussi utilisé pour définir la concentration d'inhibiteur qui, en bloquant l'action d'une enzyme, produit une réponse semi-maximale dans un test cellulaire. Dans le cas des inhibiteurs de l'OGA, le test consiste généralement à surveiller les niveaux globaux de O-GlcNAc par western blot (Yuzwa et al. 2008; Macauley et al. 2008). La puissance *in vitro*, mesurée par le K_i ou la CI50, ne se traduit pas nécessairement par la puissance *in vitro* ou *in vivo*, qui est mieux reflétée par la CE50.

Le Thiamet G a un $E_{\max}$ de 2,6 UA et une CE50 de 9,9 nM (**Figure 16**).

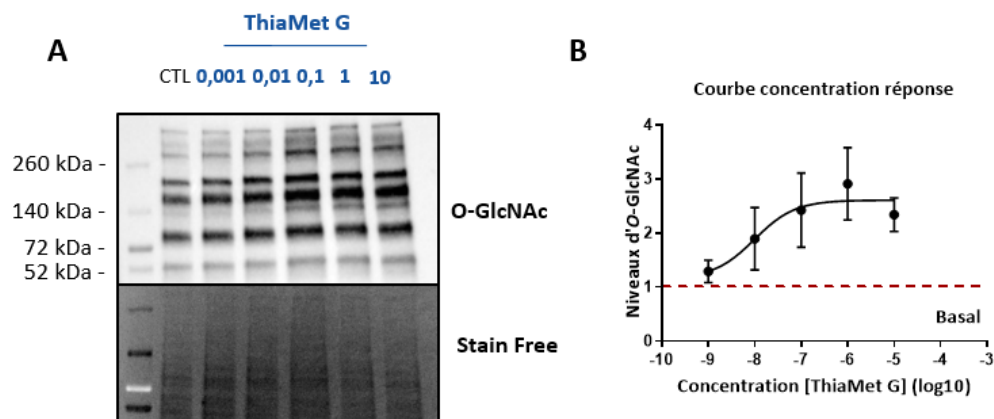


Figure 16 : Effet de concentration croissante de Thiamet G sur les niveaux de O-GlcNAcylation cellulaires

Evaluation des niveaux de O-GlcNAcylation de protéines extraites à partir de cellules HL-1 traitées à différentes concentrations (10^{-9} à 10^{-5} M) de Thiamet G. Quantification par rapport au stain free (A). Courbe concentration réponse des niveaux de O-GlcNAcylation cellulaires en fonction des concentrations de Thiamet G (B). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, $n = 3$.

Le TPP-Thiamet G a une efficacité maximale ($E_{\max}$) de 2,5 UA et une CE50 de 0,45 μ M (**Figure 17**).

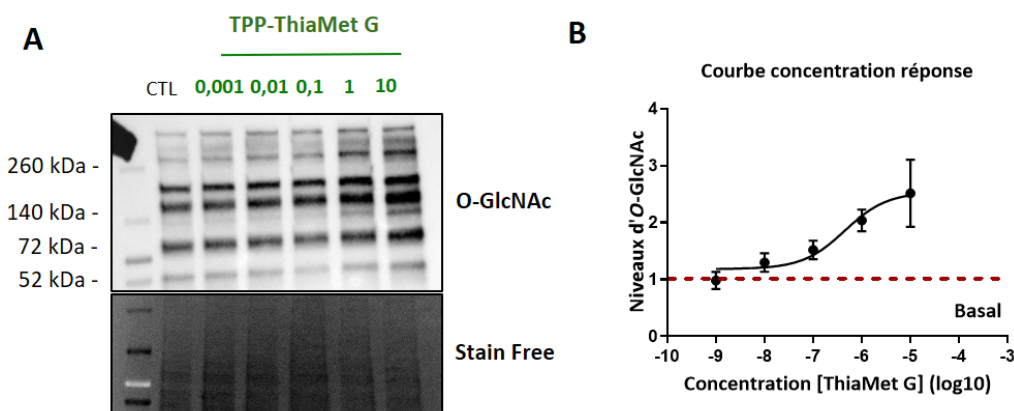


Figure 17 : Effet de concentration croissante de TPP-Thiamet G sur les niveaux de O-GlcNAcylation cellulaires

Evaluation des niveaux de O-GlcNAcylation sur des protéines extraites de cellules HL-1 traitées à différentes concentrations (10^{-9} à 10^{-5} M) de TPP-Thiamet G. Quantification par rapport au stain free (A). Courbe concentration réponse des niveaux de O-GlcNAcylation cellulaires en fonction des concentrations de TPP-Thiamet G (B). Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM, $n = 3$.

Ces résultats démontrent que les deux inhibiteurs enzymatiques ont une efficacité similaire, mais le TPP-Thiamet G possède une puissance plus faible (**Figure 16** et **Figure 17**).

B) Impact de la O-GlcNAcylation sur une protéine mitochondriale du métabolisme cardiaque

Au cours d'une étude de O-GlcNAcylation cardiaque sur des rats septiques et au cours du développement, un tiers des protéines identifiées comme O-GlcNAcylées étaient impliquées dans le métabolisme dont certaines étaient d'origine mitochondriale. Parmi ces dernières, la protéine ACSS1 mitochondriale a été identifiée comme O-GlcNAcylée.

1) Le TPP-Thiamet G augmente spécifiquement l'expression de l'enzyme ACSS1

Les cellules HL-1 ont un phénotype cardiaque. Connaissant le rôle de l'enzyme mitochondriale ACSS1 au niveau du métabolisme cellulaire cardiaque, une étude de ses niveaux d'expression a été réalisée en fonction de différentes concentrations croissantes de la molécule de Thiamet G et de son dérivé mito-ciblée.

Lors d'un traitement au Thiamet G, les niveaux d'expression de l'enzyme semblent stables (**Figure 18**). Cependant, la molécule de TPP-Thiamet G semble avoir un effet sur son expression. En effet, l'expression de l'enzyme semble augmenter de manière concentration dépendante avec le TPP-Thiamet G (**Figure 18**).

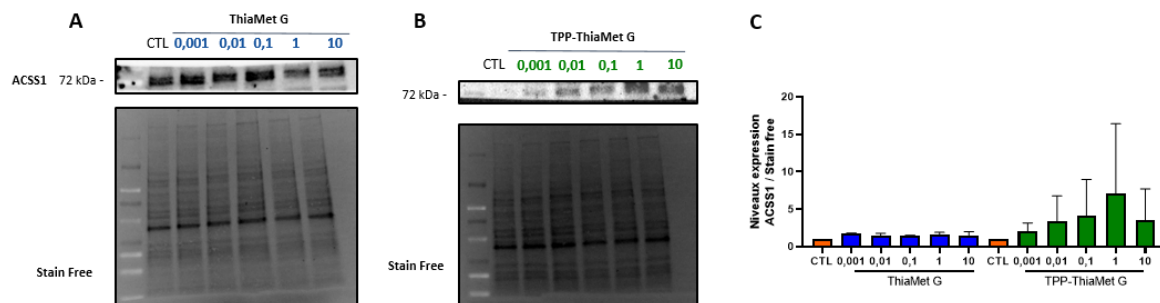


Figure 18 : Variations des niveaux d'expression de l'enzyme ACSS1 de cellules HL-1 traitées au Thiamet G ou TPP-Thiamet G

Evaluation par western-blot des niveaux d'expression de la protéine ACSS1 au sein des cellules HL-1 traitées avec du Thiamet G (bleu (A)) ou du TPP-Thiamet G (vert (B)) à différentes concentrations (10^{-9} à 10^{-5} M) et comparés aux cellules non traitées (orange) (C). Quantification par rapport au stain free. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ SEM. $n = 3$.

V) Conclusion

La O-GlcNAcylation (O-GlcNAc) est une modification post-traductionnelle ubiquitaire découverte en 1984. La O-GlcNAc fait partie intégrante des processus qui contrôlent la transcription des gènes, le métabolisme, la fonction et la croissance cellulaire. Le cycle de la O-GlcNAc est essentiel à de nombreux mécanismes physiologiques, dont le fonctionnement normal du système cardiovasculaire et est impliqué dans divers processus pathologiques. Toutes les découvertes au sujet de la O-GlcNAcylation montrent un rôle complexe de son équilibre. Par conséquent, les altérations des niveaux de O-GlcNAc sont régies par un ensemble de facteurs. Les niveaux de O-GlcNAcylation peuvent participer à divers processus pathologiques chronique comme le diabète ou le cancer. La O-GlcNAcylation peut agir en synergie ou entrer en compétition notamment avec la phosphorylation des protéines au niveau des résidus sérines et thréonines. Une stimulation des niveaux de O-GlcNAcylation des protéines a montré des effets cardioprotecteurs à court terme sur les pathologies aiguës tels que les chocs septiques ou hémorragiques. Lors des études de O-GlcNAcylo-mique, les protéines mitochondriales sont avérées O-GlcNAcylées. La O-GlcNAcylation joue un rôle bénéfique dans la réponse au stress cellulaire. Au fil des années, des outils biochimiques, pharmacologiques et génétiques sont développés pour faciliter l'étude de sa fonction biologique. Un certain nombre d'études ont exploré des approches thérapeutiques conçues soit pour diminuer les niveaux de O-GlcNAc, soit pour les augmenter de manière aiguë. Le Thiamet G est un inhibiteur de l'enzyme OGA, qui permet le retrait du motif GlcNAc sur les protéines. La molécule inhibitrice est efficace et puissante pour augmenter l'O-GlcNAc, aucune donnée n'étant disponible sur sa cinétique d'internalisation et de persistance dans la mitochondrie. L'intérêt de mon stage de master 2 est de développer et de caractériser pharmacologiquement une molécule de Thiamet G optimisée chimiquement, TPP-Thiamet G, pour agir spécifiquement sur les protéines mitochondriales. Cet outil pharmacologique permet d'investiguer l'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation mitochondriaux dans différents contextes physiopathologiques *in vitro* et *in vivo*.

L'amélioration des connaissances sur cette modification post-traductionnelle est un point clé nécessitant d'être exploré afin d'améliorer la prise en charge des patients. Le développement de nouvelles thérapies modulant les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines est donc une voie de recherche en pleine expansion.

VI) Discussion

Lors de mon stage de Master 2, j'ai cherché à caractériser deux inhibiteurs de l'enzyme OGA (Thiamet G et TPP-Thiamet G) afin de moduler les niveaux de O-GlcNAcylation particulièrement au niveau mitochondrial *via* une optimisation moléculaire du Thiamet G en TPP-Thiamet G. La molécule de TPP-Thiamet G à une concentration de 1 μ M diminue l'activité enzymatique de l'enzyme OGA. Malgré une diminution de sa puissance, la molécule reste aussi efficace sur les niveaux d'O-GlcNAc. Nous démontrons pour la première fois que la modulation mitochondriale de l'activité d'OGA module spécifiquement l'expression d'ACSS1.

A) Le TPP-Thiamet G inhibe efficacement OGA

Au cours de cette étude, la molécule de Thiamet G a été choisie pour être optimisée. Le Thiamet G est l'inhibiteur de OGA le plus sélectif pour l'enzyme (Yuzwa et al. 2008). Afin de stimuler spécifiquement les niveaux de O-GlcNAcylation des protéines mitochondriales, une molécule mito-ciblée comportant une structure avec un cation lipophile (TPP⁺) a été développée (Murphy 2008; Zielonka et al. 2017). Une comparaison de l'inhibition de ces molécules à différentes concentrations (0,1 et 1 μ M) sur des protéines cellulaires totales de la lignée de cardiomyocytes atriaux murins. Le TPP-Thiamet G conserve bien son efficacité mais avec une puissance plus faible avec une diminution de l'activité enzymatique d'OGA à 1 μ M. À une concentration de 0,1 μ M, alors que le Thiamet G inhibe déjà l'activité d'OGA, le TPP-Thiamet G ne semble pas avoir d'effet. Ceci pourrait s'expliquer par l'encombrement stérique induit par le groupement de vectorisation (TPP⁺) au niveau du site actif de l'enzyme. Cette structure comporte 3 phényles de taille imposante en comparaison à la molécule de Thiamet G. Selon le modèle clé-serrure, la molécule de TPP-Thiamet G aurait plus de difficultés à s'insérer et interagir avec les aspartates du site actif et nécessaire à l'inhibition enzymatique (Gloster and Vocadlo 2010).

Au niveau des protéines cellulaires totales, l'efficacité maximale ($E_{\max}$) observée pour les deux molécules inhibitrices est similaire. La molécule de Thiamet G conserve une puissance (CE_{50}) de l'ordre du nanomolaire comme décrit dans la littérature ($CE_{50} = 30$ nM selon (Yuzwa 2008). Or, la molécule mito-ciblée montre une diminution de sa puissance par rapport au Thiamet G.

Au vu de ces résultats, nous pouvons conclure que le TPP-Thiamet G module bien les niveaux de O-GlcNAc et semble diminuer l'activité de OGA, nous devons maintenant caractériser son effet au niveau mitochondrial.

B) Influence des inhibiteurs de OGA sur une protéine du métabolisme cardiaque

L'équipe a identifié plusieurs protéines impliquées dans le métabolisme cardiaque par une approche d'O-GlcNAcylo-mique. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'enzyme ACSS1 pour son rôle clé du métabolisme. La première étape était d'évaluer l'impact de la modulation mito-ciblée des niveaux de O-GlcNAc sur cette protéine.

L'enzyme ACSS1 ou Acétyl-CoA synthetase 2-like (ACS2L) clive l'acétate ou les acides gras à chaînes courtes en acétyl-CoA au niveau de la matrice mitochondriale. Nos résultats permettent d'observer que la stimulation des niveaux de O-GlcNAcylation des protéines semblent augmenter l'expression de l'enzyme ACSS1 de manière concentration dépendante uniquement avec l'inhibiteur mito-ciblé. Pour essayer de comprendre les mécanismes de régulation de l'expression de cette protéine et le lien avec la O-GlcNAcylation, nous nous sommes intéressés aux sites potentiels de O-GlcNAcylation. Selon une base de données appelée "ying-yang 1.2", la protéine ACSS1 mitochondriale comprend 7 sites potentiels de O-GlcNAcylation (« YinOYang 1.2 Server »). Un seul site d'acétylation (lysine 642) a été décrit dans la littérature comme diminuant l'activité d'ACSS1 et la synthèse de l'acétyl-CoA mitochondrial (Schwer et al. 2006).

VII) Limites

Les résultats de mon stage présentent de nombreuses limites. En effet, bien que les expériences aient toutes été réalisées avec des replicats techniques, il manque des replicats biologiques pour permettre de confirmer statistiquement les effets observés. De ce fait, les données présentées sont à interpréter avec précaution et nous réaliserons des analyses statistiques seulement après avoir augmenté le nombre de replicats dans nos expériences.

Traditionnellement, les niveaux de O-GlcNAcylation totaux sont détectés par des analyses en western blot utilisant quelques anticorps développés contre une quantité limitée de protéines O-GlcNAcylées. Une hypothèse clé est que les niveaux de O-GlcNAcylation de ces protéines représentent les niveaux globaux de O-GlcNAcylation de la plupart des autres protéines cellulaires (Arnold et al. 1996; Comer et al. 2001). Les antigènes utilisés pour générer des anticorps anti-O-GlcNAc proviennent de protéines abondantes dans la cellule. Cela ne donne que des informations limitées sur les niveaux de O-GlcNAcylation globaux.

Durant ce stage, je me suis appliquée à mettre dans le laboratoire, la technique de dosage de l'activité enzymatique de OGA par spectrophotométrie décrite dans la littérature (Natasha E. Zachara, Vosseller, and Hart 2011). Nous pourrions utiliser une nouvelle technique de dosage enzymatique par fluorimétrie, qui est plus sensible (Pagesy et al. 2019). De plus, l'observation des effets pharmacologiques de la molécule de TPP-Thiamet G doit être réalisée sur les protéines mitochondriales et cellulaires lors de la même expérience. L'enrichissement des mitochondries à partir de culture cellulaire doit être amélioré. Il serait intéressant de purifier l'enzyme OGA à partir des extraits cellulaires pour mesurer son activité.

VIII) Perspectives

A) Les différentes méthodes de mesure de l'activité enzymatique de l'OGA

Un des objectifs de l'équipe est de valider pharmacologiquement la molécule inhibitrice de l'OGA mito-ciblée, le TPP-Thiamet G. Durant mon stage, je me suis appliquée à mettre au point la technique de dosage de l'activité enzymatique de OGA par spectrophotométrie décrite dans la littérature (Natasha E. Zachara, Vosseller, and Hart 2011). Lors de la poursuite de ce projet, l'équipe sera en mesure de doser l'activité enzymatique de OGA par fluorimétrie, qui permet d'étudier la cinétique dans le temps (Pagesy et al. 2019). L'activité de l'OGA peut être déterminée à l'aide d'un substrat fluorogène, le 4-méthylumbelliferyl-N-acétyl- β -D-glucosaminide (4MU-GlcNAc). Le 4-méthylumbelliféryl (4MU) a des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 360 et 450 nm, respectivement. Lorsqu'il est conjugué au GlcNAc (4MU-GlcNAc), la fluorescence est éteinte. Après élimination du GlcNAc par l'enzyme OGA, la fluorescence du 4MU peut être

quantifiée, représentant alors l'activité de l'enzyme. Tout comme les réactions spectrophotométriques, elles doivent contenir un excès physiologique de GalNAc pour inhiber l'action des hexosaminidases lysosomales.

B) Impact de la O-GlcNAcylation sur les protéines cellulaires et mitochondriales

L'enrichissement des mitochondries à partir de culture cellulaire permet d'enrichir la préparation en mitochondries en les séparant du reste du contenu cellulaire pour récupérer *in fine* principalement des mitochondries à l'aide de centrifugations différentielles et de variations de gradient de sucrose. Le kit ThermoFisher™ m'a permis d'obtenir un enrichissement des mitochondries de qualité issue des cellules HL-1 (**Figure 19**).

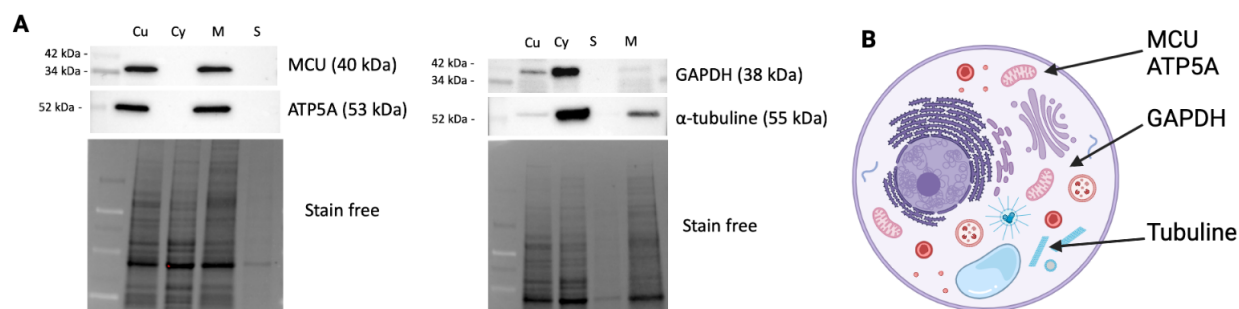


Figure 19 : Variations des niveaux d'expression des protéines caractéristiques d'un compartiment cellulaire après un enrichissement mitochondrial (A) et représentation schématique de la localisation des différentes protéines (B).

Évaluation par western-blot des niveaux d'expression de des protéines MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter), ATP5A (mitochondrial ATP synthase alpha-subunit), GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) et α-tubuline au sein des cellules HL-1 traitées. Les compartiments cellulaires observés sont le culot cellulaire (Cu) contenant des cellules entières ou des débris cellulaires, le cytosol (Cy), les mitochondries enrichies (M) et les surnageants des centrifugations différentielles (S). n = 1

Cette étape représente un contrôle qualité de l'enrichissement mitochondrial. En effet, une expression majoritaire des protéines MCU et APT5A est observée au sein de la fraction mitochondriale. Quant à la protéine GAPDH, elle se retrouve principalement au sein du cytosol. La protéine α-tubuline, essentielle au cytosquelette, est présente dans le cytosol et une faible proportion au sein de la fraction mitochondriale. Chacune des fractions n'est pas pure car cette

expérimentation est un enrichissement et non une purification. Une étape supplémentaire de purification des mitochondries serait nécessaire.

La suite des recherches consisterait à mesurer les niveaux de O-GlcNAcylation totaux des protéines par western-blot en fonction des différents compartiments (noyau/cytoplasme vs mitochondrie) à différents temps de traitement par la molécule de Thiamet G et TPP-Thiamet G. L'objectif étant d'obtenir une cinétique d'augmentation des niveaux de O-GlcNAcylation au sein de la mitochondrie en fonction de la potentielle internalisation du TPP-Thiamet G par rapport à la molécule de Thiamet G.

C) Les différentes techniques d'imagerie intracellulaire pour marquer le motif O-GlcNAc

La localisation intracellulaire des motifs O-GlcNAc est un élément critique pour le bon fonctionnement des protéines. Nous utilisons une analyse densitométrique par western-blot pour apprécier les niveaux de O-GlcNAcylation globaux à l'aide de l'anticorps RL2. Cependant, d'autres techniques ont été développées. En 2008, Clark et ses collaborateurs décrivent une technique qui permet de détecter la O-GlcNAcylation globale des protéines (P. M. Clark et al. 2008). Le FRET et BRET sont deux autres techniques utilisées pour détecter la localisation de protéines O-GlcNAcylées (Carrillo, Froemming, and Mahal 2011; Lin, Gao, and Chen 2015; Doll et al. 2016; C. Hu et al. 2019; Al-Mukh et al. 2020). Ces méthodes peuvent aider à déterminer s'il y a une modulation de la O-GlcNAcylation dans des compartiments cellulaires spécifiques.

D) L'étude de l'influence de la O-GlcNAcylation sur l'enzyme ACSS1

Il serait intéressant également, à l'aide de protéines recombinantes, d'étudier l'activité enzymatique, le rôle dans la survie cellulaire, ainsi que l'influence des sites potentiels de O-GlcNAcylation et de phosphorylation de l'enzyme identifiée comme O-GlcNAcylée : ACSS1. Ainsi, nous étendrons nos analyses des sites potentiels à une étude répertoriée sur tous les sites de bases de données sur la O-GlcNAcylation des protéines. L'objectif est de découvrir l'impact de la

O-GlcNAcylation sur les mécanismes de régulation et le rôle de la O-GlcNAcylation sur cette protéine clé du métabolisme cellulaire cardiaque.

À ce jour, il existe encore des limites importantes dans la compréhension de la biologie de la O-GlcNAcylation. Ces limites sont régies par le manque d'outils efficaces pour quantifier les niveaux précis de O-GlcNAcylation des protéines, ainsi que pour quantifier la localisation intracellulaire des protéines O-GlcNAcylées *in vivo* par exemple.

Au cours de ce projet, je me suis concentrée sur le développement d'outils permettant d'apprécier l'impact de l'inhibition de l'OGA au sein de la mitochondrie. Après la caractérisation de ces inhibiteurs pharmacologiques, leur évaluation plus poussée dans des modèles animaux sera nécessaire. La stimulation des niveaux de O-GlcNAcylation semble être un élément clé pour le développement de thérapie dans les pathologies aiguës. Les efforts de la recherche sont essentiels pour améliorer nos connaissances sur la O-GlcNAcylation et l'impact de ses perturbations dans le développement et la progression de certaines maladies.

IX) Références

- Abdel-Magid, Ahmed F. 2014. 'Inhibition of O -GlcNAcase (OGA): A Potential Therapeutic Target to Treat Alzheimer's Disease'. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 5 (12): 1270–71. <https://doi.org/10.1021/ml500450c>.
- Abdul-Ghani, Muhammad A. 2013. 'Type 2 Diabetes and the Evolving Paradigm in Glucose Regulation'. *The American Journal of Managed Care* 19 (3 Suppl): S43-50.
- Akan, Ilhan, Stephanie Olivier-Van Stichelen, Michelle R. Bond, and John A. Hanover. 2018. 'Nutrient-Driven O -GlcNAc in Proteostasis and Neurodegeneration'. *Journal of Neurochemistry* 144 (1): 7–34. <https://doi.org/10.1111/jnc.14242>.
- Al-Mukh, Hasanain, Léa Baudoin, Abdelouahab Bouaboud, José-Luis Sanchez-Salgado, Nabih Maraqa, Mostafa Khair, Patrick Pagesy, Georges Bismuth, Florence Niedergang, and Tarik Issad. 2020. 'LPS Induces GFAT2 Expression to Promote O-GlcNAcylation and Attenuate Inflammation in Macrophages'. Preprint. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.22.002303>.
- Alteen, Matthew G., Verena Oehler, Ivana Nemčovičová, Iain B. H. Wilson, David J. Vocadlo, and Tracey M. Gloster. 2016. 'Mechanism of Human Nucleocytoplasmic Hexosaminidase D'. *Biochemistry* 55 (19): 2735–47. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01285>.
- Andrali, Sreenath S., Qingwen Qian, and Sabire Ozcan. 2007. 'Glucose Mediates the Translocation of NeuroD1 by O-Linked Glycosylation'. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (21): 15589–96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701762200>.
- Andrés-Bergós, Jessica, Lidia Tardio, Ane Larranaga-Vera, Rodolfo Gómez, Gabriel Herrero-Beaumont, and Raquel Largo. 2012. 'The Increase in O-Linked N-Acetylglucosamine Protein Modification Stimulates Chondrogenic Differentiation Both in Vitro and in Vivo'. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (40): 33615–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.354241>.
- Angelova, Magdalena, Rodrigo F. Ortiz-Meoz, Suzanne Walker, and David M. Knipe. 2015. 'Inhibition of O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase Reduces Replication of Herpes Simplex Virus and Human Cytomegalovirus'. *Journal of Virology* 89 (16): 8474–83. <https://doi.org/10.1128/JVI.01002-15>.
- Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M. R. Pinsky. 2001. 'Epidemiology of Severe Sepsis in the United States: Analysis of Incidence, Outcome, and Associated Costs of Care'. *Critical Care Medicine* 29 (7): 1303–10. <https://doi.org/10.1097/00003246-200107000-00002>.
- Aoyagi, Takaaki, Hiroyuki Suda, Kazumichi Uotani, Fukiko Kojima, Takayuki Aoyama, Kayo Horiguchi, Masa Hamada, and Tomio Takeuchi. 1992. 'Nagstatin, a New Inhibitor of N-Acetyl-BETA.-D-Glucosaminidase, Produced by Streptomyces Amakusaensis MG846-FF3. Taxonomy, Production, Isolation, Physico-Chemical Properties and Biological Activities.' *The Journal of Antibiotics* 45 (9): 1404–8. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.45.1404>.
- Arnold, C. Shane, Gail V. W. Johnson, Robert N. Cole, Dennis L.-Y. Dong, Michael Lee, and Gerald W. Hart. 1996. 'The Microtubule-Associated Protein Tau Is Extensively Modified with O-Linked N-Acetylglucosamine'. *Journal of Biological Chemistry* 271 (46): 28741–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.28741>.
- Banerjee, Partha S., Junfeng Ma, and Gerald W. Hart. 2015. 'Diabetes-Associated Dysregulation of O -GlcNAcylation in Rat Cardiac Mitochondria'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (19): 6050–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424017112>.
- Banerjee, Sulagna, Phillips W Robbins, and John Samuelson. 2009. 'Molecular Characterization of Nucleocytosolic O-GlcNAc Transferases of Giardia Lamblia and Cryptosporidium Parvum'. *Glycobiology* 19 (4): 331–36. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn107>.
- Barkovskaya, Anna, Kotryna Seip, Bylgja Hilmarisdottir, Gunhild M. Maelandsmo, Siver A. Moestue, and Harri M. Ikonen. 2019. 'O-GlcNAc Transferase Inhibition Differentially Affects Breast Cancer Subtypes'. *Scientific Reports* 9 (1): 5670. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42153-6>.

- Bartolomé-Nebreda, Jose M., Andrés A. Trabanco, Adriana Ingrid Velter, and Peter Buijnsters. 2021. 'O-GlcNAcase Inhibitors as Potential Therapeutics for the Treatment of Alzheimer's Disease and Related Tauopathies: Analysis of the Patent Literature'. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, July, 1–38. <https://doi.org/10.1080/13543776.2021.1947242>.
- Beer, Dieter, Jean-Luc Maloisel, Dora M. Rast, and Andrea Vasella. 1990. 'Synthesis of 2-Acetamido-2-deoxy-D-gluconhydroximolactone- and Chitobionhydroximolactone-Derived N-Phenylcarbamates, Potential Inhibitors of α -N-Acetylglucosaminidase'. *Helvetica Chimica Acta* 73 (7): 1918–22. <https://doi.org/10.1002/hlca.19900730714>.
- Bennett, R. A., and A. E. Pegg. 1981. 'Alkylation of DNA in Rat Tissues Following Administration of Streptozotocin'. *Cancer Research* 41 (7): 2786–90.
- Bertram, L., D. Blacker, K. Mullin, D. Keeney, J. Jones, S. Basu, S. Yhu, et al. 2000. 'Evidence for Genetic Linkage of Alzheimer's Disease to Chromosome 10q'. *Science (New York, N.Y.)* 290 (5500): 2302–3. <https://doi.org/10.1126/science.290.5500.2302>.
- Blatch, G. L., and M. Lässle. 1999. 'The Tetratricopeptide Repeat: A Structural Motif Mediating Protein-Protein Interactions'. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 21 (11): 932–39. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199911\)21:11<932::AID-BIES5>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199911)21:11<932::AID-BIES5>3.0.CO;2-N).
- Bond, Michelle R., and John A. Hanover. 2015. 'A Little Sugar Goes a Long Way: The Cell Biology of O-GlcNAc'. *Journal of Cell Biology* 208 (7): 869–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.201501101>.
- Borghgraef, Peter, Clément Menuet, Clara Theunis, Justin V. Louis, Herman Devijver, Hervé Maurin, Caroline Smet-Nocca, et al. 2013. 'Increasing Brain Protein O-GlcNAc-Ylation Mitigates Breathing Defects and Mortality of Tau.P301L Mice'. Edited by Tsuneya Ikezu. *PLoS ONE* 8 (12): e84442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084442>.
- Borodkin, Vladimir S., Marianne Schimpl, Mehmet Gundogdu, Karim Rafie, Helge C. Dorfmueller, David A. Robinson, and Daan M. F. van Aalten. 2014. 'Bisubstrate UDP-Peptide Conjugates as Human O-GlcNAc Transferase Inhibitors'. *The Biochemical Journal* 457 (3): 497–502. <https://doi.org/10.1042/BJ20131272>.
- Braidman, I., M. Carroll, N. Dance, and D. Robinson. 1974. 'Characterisation of Human N -Acetyl- β -Hexosaminidase C'. *FEBS Letters* 41 (2): 181–84. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(74\)81206-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(74)81206-8).
- Broschat, Kay O., Christine Gorka, Jimmy D. Page, Cynthia L. Martin-Berger, Michael S. Davies, Horng-chih Huang, Eric A. Gulve, William J. Salsgiver, and Thomas P. Kasten. 2002. 'Kinetic Characterization of Human Glutamine-Fructose-6-Phosphate Amidotransferase I'. *Journal of Biological Chemistry* 277 (17): 14764–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201056200>.
- Brown, David A., Justin B. Perry, Mitchell E. Allen, Hani N. Sabbah, Brian L. Stauffer, Saame Raza Shaikh, John G. F. Cleland, et al. 2017. 'Mitochondrial Function as a Therapeutic Target in Heart Failure'. *Nature Reviews Cardiology* 14 (4): 238–50. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.203>.
- Brownlee, Michael. 2001. 'Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications'. *Nature* 414 (6865): 813–20. <https://doi.org/10.1038/414813a>.
- Butkinaree, Chutikarn, Win D. Cheung, Sungjin Park, Kyoungsook Park, Megan Barber, and Gerald W. Hart. 2008. 'Characterization of Beta-N-Acetylglucosaminidase Cleavage by Caspase-3 during Apoptosis'. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (35): 23557–66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804116200>.
- Caldwell, S. A., S. R. Jackson, K. S. Shahriari, T. P. Lynch, G. Sethi, S. Walker, K. Vosseller, and M. J. Reginato. 2010. 'Nutrient Sensor O-GlcNAc Transferase Regulates Breast Cancer Tumorigenesis through Targeting of the Oncogenic Transcription Factor FoxM1'. *Oncogene* 29 (19): 2831–42. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.41>.
- Calhoun, D. H., D. F. Bishop, H. S. Bernstein, M. Quinn, P. Hantzopoulos, and R. J. Desnick. 1985. 'Fabry Disease: Isolation of a cDNA Clone Encoding Human Alpha-Galactosidase A.' *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (21): 7364–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.21.7364>.
- 'Cardiovascular diseases (CVDs)'. n.d. Accessed 8 September 2021. [https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
- Carrillo, Luz D., Joshua A. Froemming, and Lara K. Mahal. 2011. 'Targeted in Vivo O-GlcNAc Sensors Reveal Discrete Compartment-Specific Dynamics during Signal Transduction'. *Journal of Biological Chemistry* 286 (8): 6650–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.191627>.

- Cekic, N., J. E. Heinonen, K. A. Stubbs, C. Roth, Y. He, A. J. Bennet, E. J. McEachern, G. J. Davies, and D. J. Vocadlo. 2016. 'Analysis of Transition State Mimicry by Tight Binding Aminothiazoline Inhibitors Provides Insight into Catalysis by Human O-GlcNAcase'. *Chemical Science* 7 (6): 3742–50. <https://doi.org/10.1039/C6SC00370B>.
- Cervantes-Madrid, Diana, Yair Romero, and Alfonso Dueñas-González. 2015. 'Reviving Lonidamine and 6-Diazo-5-Oxo-L-Norleucine to Be Used in Combination for Metabolic Cancer Therapy'. *BioMed Research International* 2015: 1–13. <https://doi.org/10.1155/2015/690492>.
- Cetinbaş, Naniye, Matthew S. Macauley, Keith A. Stubbs, Robert Drapala, and David J. Vocadlo. 2006. 'Identification of Asp174 and Asp175 as the Key Catalytic Residues of Human O-GlcNAcase by Functional Analysis of Site-Directed Mutants'. *Biochemistry* 45 (11): 3835–44. <https://doi.org/10.1021/bi052370b>.
- Chang, Qing, Kaihong Su, John R. Baker, Xiaoyong Yang, Andrew J. Paterson, and Jeffrey E. Kudlow. 2000. 'Phosphorylation of Human Glutamine:Fructose-6-Phosphate Amidotransferase by CAMP-Dependent Protein Kinase at Serine 205 Blocks the Enzyme Activity'. *Journal of Biological Chemistry* 275 (29): 21981–87. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001049200>.
- Chatham, John C., and Richard B. Marchase. 2010. 'Protein O-GlcNAcylation: A Critical Regulator of the Cellular Response to Stress'. *Current Signal Transduction Therapy* 5 (1): 49–59. <https://doi.org/10.2174/157436210790226492>.
- Cheng, Xiaogang, and Gerald W. Hart. 2001. 'Alternative O-Glycosylation/O-Phosphorylation of Serine-16 in Murine Estrogen Receptor β '. *Journal of Biological Chemistry* 276 (13): 10570–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010411200>.
- Chou, T. Y., G. W. Hart, and C. V. Dang. 1995. 'C-Myc Is Glycosylated at Threonine 58, a Known Phosphorylation Site and a Mutational Hot Spot in Lymphomas'. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (32): 18961–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.32.18961>.
- Chumakov, I. M., P. Rigault, I. Le Gall, C. Bellanné-Chantelot, A. Billault, S. Guillou, P. Soularue, G. Guasconi, E. Poullier, and I. Gros. 1995. 'A YAC Contig Map of the Human Genome'. *Nature* 377 (6547 Suppl): 175–297. <https://doi.org/10.1038/377175a0>.
- Clark, Peter M., Jessica F. Dweck, Daniel E. Mason, Courtenay R. Hart, Suzanne B. Buck, Eric C. Peters, Brian J. Agnew, and Linda C. Hsieh-Wilson. 2008. 'Direct In-Gel Fluorescence Detection and Cellular Imaging of O-GlcNAc-Modified Proteins'. *Journal of the American Chemical Society* 130 (35): 11576–77. <https://doi.org/10.1021/ja8030467>.
- Clark, Raymond J., Patrick M. McDonough, Eric Swanson, Susanne U. Trost, Misa Suzuki, Minoru Fukuda, and Wolfgang H. Dillmann. 2003. 'Diabetes and the Accompanying Hyperglycemia Impairs Cardiomyocyte Calcium Cycling through Increased Nuclear O-GlcNAcylation'. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (45): 44230–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303810200>.
- Claycomb, W. C., N. A. Lanson, B. S. Stallworth, D. B. Egeland, J. B. Delcarpio, A. Bahinski, and N. J. Izzo. 1998. 'HL-1 Cells: A Cardiac Muscle Cell Line That Contracts and Retains Phenotypic Characteristics of the Adult Cardiomyocyte'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (6): 2979–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2979>.
- Cole, Robert N., and Gerald W. Hart. 2002. 'Glycosylation Sites Flank Phosphorylation Sites on Synapsin I: O-Linked N-Acetylglucosamine Residues Are Localized Within Domains Mediating Synapsin I Interactions'. *Journal of Neurochemistry* 73 (1): 418–28. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0730418.x>.
- Comer, Frank I., Keith Vosseller, Lance Wells, Mary Ann Accavitti, and Gerald W. Hart. 2001. 'Characterization of a Mouse Monoclonal Antibody Specific for O-Linked N-Acetylglucosamine'. *Analytical Biochemistry* 293 (2): 169–77. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5132>.
- Comtesse, N., E. Maldener, and E. Meese. 2001. 'Identification of a Nuclear Variant of MGEA5, a Cytoplasmic Hyaluronidase and a Beta-N-Acetylglucosaminidase'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283 (3): 634–40. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4815>.
- Dassanayaka, Sujith, Robert E. Brainard, Lewis J. Watson, Bethany W. Long, Kenneth R. Brittan, Angelica M. DeMartino, Allison L. Aird, et al. 2017. 'Cardiomyocyte Ogt Limits Ventricular Dysfunction in Mice Following Pressure Overload without Affecting Hypertrophy'. *Basic Research in Cardiology* 112 (3): 23. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0612-7>.

- DeHaven, J. E., K. A. Robinson, B. A. Nelson, and M. G. Buse. 2001. 'A Novel Variant of Glutamine: Fructose-6-Phosphate Amidotransferase-1 (GFAT1) mRNA Is Selectively Expressed in Striated Muscle'. *Diabetes* 50 (11): 2419–24. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2419>.
- Dehennaut, Vanessa, Tony Lefebvre, Chantal Sellier, Yves Leroy, Benjamin Gross, Suzanne Walker, René Cacan, Jean-Claude Michalski, Jean-Pierre Vilain, and Jean-François Bodart. 2007. 'O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase Inhibition Prevents G2/M Transition in *Xenopus Laevis* Oocytes'. *Journal of Biological Chemistry* 282 (17): 12527–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700444200>.
- Delacour, Delphine, Valérie Gouyer, Emmanuelle Leteurtre, Tounsia Ait-Slimane, Hervé Drobecq, Christelle Lenoir, Odile Moreau-Hannedouche, Germain Trugnan, and Guillemette Huet. 2003. '1-Benzyl-2-Acetamido-2-Deoxy- α -D-Galactopyranoside Blocks the Apical Biosynthetic Pathway in Polarized HT-29 Cells'. *Journal of Biological Chemistry* 278 (39): 37799–809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305755200>.
- Delannoy, Philippe, Isabelle Kim, Nathalie Emery, Carmen de Bolos, Andre Verbert, Pierre Degand, and Guillemette Huet. 1996. 'Benzyl-N-Acetyl- α -D-Galactosaminide Inhibits the Sialylation and the Secretion of Mucins by a Mucin Secreting HT-29 Cell Subpopulation'. *Glycoconjugate Journal* 13 (5): 717–26. <https://doi.org/10.1007/BF00702335>.
- Denis, Manon, Thomas Dupas, Antoine Persello, Justine Dontaine, Laurent Bultot, Charlotte Betus, Thomas Pelé, et al. 2021. 'An O-GlcNAcylic Approach Reveals ACLY as a Potential Target in Sepsis in the Young Rat'. *International Journal of Molecular Sciences* 22 (17): 9236. <https://doi.org/10.3390/ijms22179236>.
- Dennis, Rebecca J., Edward J. Taylor, Matthew S. Macauley, Keith A. Stubbs, Johan P. Turkenburg, Samuel J. Hart, Gary N. Black, David J. Vocadlo, and Gideon J. Davies. 2006. 'Structure and Mechanism of a Bacterial Beta-Glucosaminidase Having O-GlcNAcase Activity'. *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (4): 365–71. <https://doi.org/10.1038/nsmb1079>.
- Dephoure, Noah, Chunshui Zhou, Judit Villén, Sean A. Beausoleil, Corey E. Bakalarski, Stephen J. Elledge, and Steven P. Gygi. 2008. 'A Quantitative Atlas of Mitotic Phosphorylation'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (31): 10762–67. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805139105>.
- Dhainaut, J. F., M. F. Huyghebaert, J. F. Monsallier, G. Lefevre, J. Dall'Ava-Santucci, F. Brunet, D. Villemant, A. Carli, and D. Raichvarg. 1987. 'Coronary Hemodynamics and Myocardial Metabolism of Lactate, Free Fatty Acids, Glucose, and Ketones in Patients with Septic Shock'. *Circulation* 75 (3): 533–41. <https://doi.org/10.1161/01.cir.75.3.533>.
- Dias, Wagner B., and Gerald W. Hart. 2007. 'O-GlcNAc Modification in Diabetes and Alzheimer's Disease'. *Molecular BioSystems* 3 (11): 766–72. <https://doi.org/10.1039/b704905f>.
- Ding, Ning, Lingyan Ping, Yunfei Shi, Lixia Feng, Xiaohui Zheng, Yuqin Song, and Jun Zhu. 2014. 'Thiamet-G-Mediated Inhibition of O-GlcNAcase Sensitizes Human Leukemia Cells to Microtubule-Stabilizing Agent Paclitaxel'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 453 (3): 392–97. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.09.097>.
- Doll, Franziska, Annette Buntz, Anne-Katrin Späte, Verena F. Schart, Alexander Timper, Waldemar Schrimpf, Christof R. Hauck, Andreas Zumbusch, and Valentin Wittmann. 2016. 'Visualization of Protein-Specific Glycosylation inside Living Cells'. *Angewandte Chemie International Edition* 55 (6): 2262–66. <https://doi.org/10.1002/anie.201503183>.
- Dong, D. L., and G. W. Hart. 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): 19321–30.
- Dong, Lili, Shengqiang Shen, Wei Chen, Dongdong Xu, Qing Yang, Huizhe Lu, and Jianjun Zhang. 2019. 'Discovery of Novel Inhibitors Targeting Human O-GlcNAcase: Docking-Based Virtual Screening, Biological Evaluation, Structural Modification, and Molecular Dynamics Simulation'. *Journal of Chemical Information and Modeling* 59 (10): 4374–82. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00479>.
- Dong, Lili, Shengqiang Shen, Yefei Xu, Leng Wang, Ruirui Feng, Jianjun Zhang, and Huizhe Lu. 2019. 'Computational Studies on the Potency and Selectivity of PUGNAc Derivatives Against GH3, GH20, and GH84 β -N-Acetyl-D-Hexosaminidases'. *Frontiers in Chemistry* 7: 235. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00235>.

- Donovan, Kelly, Oleg Alekseev, Xin Qi, William Cho, and Jane Azizkhan-Clifford. 2014. 'O-GlcNAc Modification of Transcription Factor Sp1 Mediates Hyperglycemia-Induced VEGF-A Upregulation in Retinal Cells'. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55 (12): 7862–73. <https://doi.org/10.1167/iov.14-14048>.
- Dontaine, Justine, Asma Bouali, Frederic Daussin, Laurent Bultot, Didier Vertommen, Manon Martin, Rahulan Rathagirishnan, et al. 2021. 'The Intra-Mitochondrial O-GlcNAcylation System Acutely Regulates OXPHOS Capacity and ROS Dynamics in the Heart'. Preprint. In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-690671/v1>.
- Dorfmueller, Helge C., and Daan M.F. van Aalten. 2010. 'Screening-Based Discovery of Drug-like O -GlcNAcase Inhibitor Scaffolds'. *FEBS Letters* 584 (4): 694–700. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.020>.
- Dorfmueller, Helge C., Vladimir S. Borodkin, David E. Blair, Shalini Pathak, Iva Navratilova, and Daan M. F. van Aalten. 2011. 'Substrate and Product Analogues as Human O-GlcNAc Transferase Inhibitors'. *Amino Acids* 40 (3): 781–92. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0688-y>.
- Dorfmueller, Helge C., Vladimir S. Borodkin, Marianne Schimpl, Sharon M. Shepherd, Natalia A. Shpiro, and Daan M. F. van Aalten. 2006. 'GlcNAcstatin: A Picomolar, Selective O -GlcNAcase Inhibitor That Modulates Intracellular O -GlcNAcylation Levels'. *Journal of the American Chemical Society* 128 (51): 16484–85. <https://doi.org/10.1021/ja066743n>.
- Dupas, Thomas, Manon Denis, Justine Dontaine, Antoine Persello, Laurent Bultot, Angélique Erraud, Didier Vertommen, et al. 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): e13566. <https://doi.org/10.1111/apha.13566>.
- Eguchi, Satoshi, Noriko Oshiro, Takafumi Miyamoto, Ken-ichi Yoshino, Sumiko Okamoto, Takamasa Ono, Ushio Kikkawa, and Kazuyoshi Yonezawa. 2009. 'AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylates Glutamine : Fructose-6-Phosphate Amidotransferase 1 at Ser243 to Modulate Its Enzymatic Activity'. *Genes to Cells* 14 (2): 179–89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01260.x>.
- Elbatrawy, Ahmed A., Eun Ju Kim, and Ghilsoo Nam. 2020. 'O -GlcNAcase: Emerging Mechanism, Substrate Recognition and Small-Molecule Inhibitors'. *ChemMedChem* 15 (14): 1244–57. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000077>.
- Ferron, Marine, Julien Cadiet, Antoine Persello, Valentine Prat, Manon Denis, Angélique Erraud, Virginie Aillerie, et al. 2019. 'O-GlcNAc Stimulation: A New Metabolic Approach to Treat Septic Shock'. *Scientific Reports* 9 (1): 18751. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55381-7>.
- Ferron, Marine, Manon Denis, Antoine Persello, Raahulan Rathagirishnan, and Benjamin Lauzier. 2019. 'Protein O-GlcNAcylation in Cardiac Pathologies: Past, Present, Future'. *Frontiers in Endocrinology* 9 (January): 819. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00819>.
- Ficko-Blean, E., K. A. Stubbs, O. Nemirovsky, D. J. Vocadlo, and A. B. Boraston. 2008. 'Structural and Mechanistic Insight into the Basis of Mucopolysaccharidosis IIIB'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (18): 6560–65. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711491105>.
- Filhoulaud, Gaëlle, Ghislaine Guillemain, and Raphaël Scharfmann. 2009. 'The Hexosamine Biosynthesis Pathway Is Essential for Pancreatic Beta Cell Development'. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (36): 24583–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.025288>.
- Forsythe, Michele E., Dona C. Love, Brooke D. Lazarus, Eun Ju Kim, William A. Prinz, Gilbert Ashwell, Michael W. Krause, and John A. Hanover. 2006. 'Caenorhabditis Elegans Ortholog of a Diabetes Susceptibility Locus: Oga-1 (O-GlcNAcase) Knockout Impacts O-GlcNAc Cycling, Metabolism, and Dauer'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (32): 11952–57. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601931103>.
- Frank, L.A., M.L. Sutton-McDowall, H.M. Brown, D.L. Russell, R.B. Gilchrist, and J.G. Thompson. 2014. 'Hyperglycaemic Conditions Perturb Mouse Oocyte in Vitro Developmental Competence via Beta-O-Linked Glycosylation of Heat Shock Protein 90'. *Human Reproduction* 29 (6): 1292–1303. <https://doi.org/10.1093/humrep/deu066>.
- Fülöp, Norbert, Richard B. Marchase, and John C. Chatham. 2007. 'Role of Protein O-Linked N-Acetyl-Glucosamine in Mediating Cell Function and Survival in the Cardiovascular System'. *Cardiovascular Research* 73 (2): 288–97. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.07.018>.

- Fülöp, Norbert, Zhenghao Zhang, Richard B. Marchase, and John C. Chatham. 2007. 'Glucosamine Cardioprotection in Perfused Rat Hearts Associated with Increased O -Linked N -Acetylglucosamine Protein Modification and Altered P38 Activation'. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 292 (5): H2227–36. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01091.2006>.
- Gandy, Johanna C., Abigail E. Rountree, and Gautam N. Bijur. 2006. 'Akt1 Is Dynamically Modified with O-GlcNAc Following Treatments with PUGNAc and Insulin-like Growth Factor-1'. *FEBS Letters* 580 (13): 3051–58. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.051>.
- Gao, Yuan, Jun-ichi Miyazaki, and Gerald W. Hart. 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): 155–63. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(03\)00234-0](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(03)00234-0).
- Gao, Yuan, Lance Wells, Frank I. Comer, Glendon J. Parker, and Gerald W. Hart. 2001. 'Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins'. *Journal of Biological Chemistry* 276 (13): 9838–45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010420200>.
- Gloster, Tracey M., and David J. Vocadlo. 2010. 'Mechanism, Structure, and Inhibition of O-GlcNAc Processing Enzymes'. *Current Signal Transduction Therapy* 5 (1): 74–91. <https://doi.org/10.2174/157436210790226537>.
- Gloster, Tracey M., Wesley F. Zandberg, Julia E. Heinonen, David L. Shen, Lehua Deng, and David J. Vocadlo. 2011. 'Hijacking a Biosynthetic Pathway Yields a Glycosyltransferase Inhibitor within Cells'. *Nature Chemical Biology* 7 (3): 174–81. <https://doi.org/10.1038/nchembio.520>.
- Graack, Hanns-Rüdiger, Ursula Cinque, and Horst Kress. 2001. 'Functional Regulation of Glutamine:Fructose-6-Phosphate Aminotransferase 1 (GFAT1) of Drosophila Melanogaster in a UDP-N-Acetylglucosamine and CAMP-Dependent Manner'. *Biochemical Journal* 360 (2): 401–12. <https://doi.org/10.1042/bj3600401>.
- Graham, Danielle L., Audrey J. Gray, John A. Joyce, Dongzi Yu, Jill O'Moore, George A. Carlson, Mark S. Shearman, Tammy L. Dellovade, and Heike Hering. 2014. 'Increased O-GlcNAcylation Reduces Pathological Tau without Affecting Its Normal Phosphorylation in a Mouse Model of Tauopathy'. *Neuropharmacology* 79 (April): 307–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.11.025>.
- Greis, Kenneth D., and Gerald W. Hart. 1998. 'Analytical Methods for the Study of O-GlcNAc Glycoproteins and Glycopeptides'. In *Glycoanalysis Protocols*, by Elizabeth F. Hounsell, 76:19–34. New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-355-4:19>.
- Gross, Benjamin J., Brian C. Kraybill, and Suzanne Walker. 2005. 'Discovery of O-GlcNAc Transferase Inhibitors'. *Journal of the American Chemical Society* 127 (42): 14588–89. <https://doi.org/10.1021/ja0555217>.
- Gutternigg, Martin, Dubravko Rendić, Regina Voglauer, Thomas Iskratsch, and Iain B. H. Wilson. 2009. 'Mammalian Cells Contain a Second Nucleocytoplasmic Hexosaminidase'. *Biochemical Journal* 419 (1): 83–90. <https://doi.org/10.1042/BJ20081630>.
- Hajdуч, Jan, Ghilsoo Nam, Eun Ju Kim, Roland Fröhlich, John A. Hanover, and Kenneth L. Kirk. 2008. 'A Convenient Synthesis of the C-1-Phosphonate Analogue of UDP-GlcNAc and Its Evaluation as an Inhibitor of O-Linked GlcNAc Transferase (OGT)'. *Carbohydrate Research* 343 (2): 189–95. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.10.027>.
- Haltiwanger, R. S., M. A. Blomberg, and G. W. Hart. 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): 9005–13.
- Hanover, J. A., C. K. Cohen, M. C. Willingham, and M. K. Park. 1987. 'O-Linked N-Acetylglucosamine Is Attached to Proteins of the Nuclear Pore. Evidence for Cytoplasmic and Nucleoplasmic Glycoproteins'. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (20): 9887–94.
- Hanover, John A., Michael W. Krause, and Dona C. Love. 2010. 'The Hexosamine Signaling Pathway: O-GlcNAc Cycling in Feast or Famine'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 (2): 80–95. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.017>.
- Hart, G W, R S Haltiwanger, G D Holt, and W G Kelly. 1989. 'Glycosylation in the Nucleus and Cytoplasm'. *Annual Review of Biochemistry* 58 (1): 841–74. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.004205>.

- Hart, Gerald W., Chad Slawson, Genaro Ramirez-Correa, and Olof Lagerlof. 2011a. 'Cross Talk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease'. *Annual Review of Biochemistry* 80: 825–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060608-102511>.
- . 2011b. 'Cross Talk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription, and Chronic Disease'. *Annual Review of Biochemistry* 80: 825–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060608-102511>.
- He, Yuan, Abigail K. Bubb, Keith A. Stubbs, Tracey M. Gloster, and Gideon J. Davies. 2011. 'Inhibition of a Bacterial O-GlcNAcase Homologue by Lactone and Lactam Derivatives: Structural, Kinetic and Thermodynamic Analyses'. *Amino Acids* 40 (3): 829–39. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0700-6>.
- Heckel, D., N. Comtesse, N. Brass, N. Blin, K. D. Zang, and E. Meese. 1998. 'Novel Immunogenic Antigen Homologous to Hyaluronidase in Meningioma'. *Human Molecular Genetics* 7 (12): 1859–72. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.12.1859>.
- Hennebicq-Reig, S., T. Lesuffleur, C. Capon, C. De Bolos, I. Kim, O. Moreau, C. Richet, et al. 1998. 'Permanent Exposure of Mucin-Secreting HT-29 Cells to Benzyl-N-Acetyl-Alpha-D-Galactosaminide Induces Abnormal O-Glycosylation of Mucins and Inhibits Constitutive and Stimulated MUC5AC Secretion'. *The Biochemical Journal* 334 (Pt 1) (August): 283–95. <https://doi.org/10.1042/bj3340283>.
- Holt, G D, and G W Hart. 1986. 'The Subcellular Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Moieties. Localization of a Novel Protein-Saccharide Linkage, O-Linked GlcNAc.' *Journal of Biological Chemistry* 261 (17): 8049–57. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)57510-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)57510-X).
- Holt, G D, C M Snow, A Senior, R S Haltiwanger, L Gerace, and G W Hart. 1987. 'Nuclear Pore Complex Glycoproteins Contain Cytoplasmically Disposed O-Linked N-Acetylglucosamine.' *The Journal of Cell Biology* 104 (5): 1157–64. <https://doi.org/10.1083/jcb.104.5.1157>.
- Hu, Chia-Wei, Matthew Worth, Hao Li, and Jiaoyang Jiang. 2019. 'Chemical and Biochemical Strategies To Explore the Substrate Recognition of O -GlcNAc-Cycling Enzymes'. *ChemBioChem* 20 (3): 312–18. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800481>.
- Hu, Ping, Shino Shimoji, and Gerald W. Hart. 2010. 'Site-Specific Interplay between O-GlcNAcylation and Phosphorylation in Cellular Regulation'. *FEBS Letters* 584 (12): 2526–38. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.044>.
- Hu, Yong, Jorge Suarez, Eduardo Fricovsky, Hong Wang, Brian T. Scott, Sunia A. Trauger, Wenlong Han, Ying Hu, Mary O. Oyeleye, and Wolfgang H. Dillmann. 2009. 'Increased Enzymatic O-GlcNAcylation of Mitochondrial Proteins Impairs Mitochondrial Function in Cardiac Myocytes Exposed to High Glucose'. *The Journal of Biological Chemistry* 284 (1): 547–55. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808518200>.
- 'HUPO - Home'. n.d. Accessed 14 April 2021. <https://hupo.org/>.
- Ida, Shogo, Katsutaro Morino, Osamu Sekine, Natsuko Ohashi, Shinji Kume, Tokuhiko Chano, Kanako Iwasaki, et al. 2017. 'Diverse Metabolic Effects of O-GlcNAcylation in the Pancreas but Limited Effects in Insulin-Sensitive Organs in Mice'. *Diabetologia* 60 (9): 1761–69. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4327-y>.
- Igual, Michelle O., Paulo S.G. Nunes, Rafael M. da Costa, Susimaira P. Mantoani, Rita C. Tostes, and Ivone Carvalho. 2019. 'Novel Glucopyranoside C2-Derived 1,2,3-Triazoles Displaying Selective Inhibition of O-GlcNAcase (OGA)'. *Carbohydrate Research* 471 (January): 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2018.10.007>.
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. 'Finishing the Euchromatic Sequence of the Human Genome'. *Nature* 431 (7011): 931–45. <https://doi.org/10.1038/nature03001>.
- James, L. R., D. Tang, A. Ingram, H. Ly, K. Thai, L. Cai, and J. W. Scholey. 2002. 'Flux Through the Hexosamine Pathway Is a Determinant of Nuclear Factor B- Dependent Promoter Activation'. *Diabetes* 51 (4): 1146–56. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.4.1146>.
- Jensen, Rebekka, Ioanna Andreadou, Derek Hausenloy, and Hans Bøtker. 2019. 'The Role of O-GlcNAcylation for Protection against Ischemia-Reperfusion Injury'. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (2): 404. <https://doi.org/10.3390/ijms20020404>.
- Jiang, Jiaoyang, Michael B. Lazarus, Lincoln Pasquina, Piotr Sliz, and Suzanne Walker. 2011. 'A Neutral Diphosphate Mimic Crosslinks the Active Site of Human O-GlcNAc Transferase'. *Nature Chemical Biology* 8 (1): 72–77. <https://doi.org/10.1038/nchembio.711>.

- Jiang, Meng, Shu Yu, Zhui Yu, Huaxin Sheng, Ying Li, Shuai Liu, David S. Warner, Wulf Paschen, and Wei Yang. 2017. 'XBP1 (X-Box-Binding Protein-1)-Dependent O-GlcNAcylation Is Neuroprotective in Ischemic Stroke in Young Mice and Its Impairment in Aged Mice Is Rescued by Thiamet-G'. *Stroke* 48 (6): 1646–54. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.016579>.
- Jones, Steven P., Natasha E. Zachara, Gladys A. Ngoh, Bradford G. Hill, Yasushi Teshima, Aruni Bhatnagar, Gerald W. Hart, and Eduardo Marbán. 2008. 'Cardioprotection by N -Acetylglucosamine Linkage to Cellular Proteins'. *Circulation* 117 (9): 1172–82. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.730515>.
- Jung, Hyun Jun, Woo Sang Sung, Soo-Hwan Yeo, Hyun Soo Kim, In-Seon Lee, Eun-Rhan Woo, and Dong Gun Lee. 2006. 'Antifungal Effect of Amentoflavone Derived From *Selaginella Tamariscina*'. *Archives of Pharmacal Research* 29 (9): 746–51. <https://doi.org/10.1007/BF02974074>.
- Junod, A., A. E. Lambert, L. Orci, R. Pictet, A. E. Gonet, and A. E. Renold. 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): 201–5. <https://doi.org/10.3181/00379727-126-32401>.
- Kakade, Poonam S., Srikanth Budnar, Rajiv D. Kalraiya, and Milind M. Vaidya. 2016. 'Functional Implications of O-GlcNAcylation-Dependent Phosphorylation at a Proximal Site on Keratin 18'. *Journal of Biological Chemistry* 291 (23): 12003–13. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.728717>.
- Kang, Eun-Sil, Dohyun Han, Jungeun Park, Tae Kyoung Kwak, Min-A. Oh, Sin-Ae Lee, Suyong Choi, Zee Yong Park, Youngsoo Kim, and Jung Weon Lee. 2008. 'O-GlcNAc Modulation at Akt1 Ser473 Correlates with Apoptosis of Murine Pancreatic Beta Cells'. *Experimental Cell Research* 314 (11–12): 2238–48. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.04.014>.
- Kazemi, Zahra, Hana Chang, Sarah Haserodt, Cathrine McKen, and Natasha E. Zachara. 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): 39096–107. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.131102>.
- Keembiyehetty, Chithra, Dona C. Love, Katryn R. Harwood, Oksana Gavrilova, Marcella E. Comly, and John A. Hanover. 2015. 'Conditional Knock-out Reveals a Requirement for O-Linked N-Acetylglucosaminase (O-GlcNAcase) in Metabolic Homeostasis'. *The Journal of Biological Chemistry* 290 (11): 7097–7113. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.617779>.
- Khidekel, Nelly, Scott B Ficarro, Peter M Clark, Marian C Bryan, Danielle L Swaney, Jessica E Rexach, Yi E Sun, Joshua J Coon, Eric C Peters, and Linda C Hsieh-Wilson. 2007. 'Probing the Dynamics of O-GlcNAc Glycosylation in the Brain Using Quantitative Proteomics'. *Nature Chemical Biology* 3 (6): 339–48. <https://doi.org/10.1038/nchembio881>.
- Kim, Chaeyoung, Dong Woo Nam, Sang Yoon Park, Hyundong Song, Hyun Seok Hong, Jung Hyun Boo, Eun Sun Jung, et al. 2013. 'O-Linked β -N-Acetylglucosaminidase Inhibitor Attenuates β -Amyloid Plaque and Rescues Memory Impairment'. *Neurobiology of Aging* 34 (1): 275–85. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.03.001>.
- Kim, Eun J., Benjamin Amorelli, Mohannad Abdo, Craig J. Thomas, Dona C. Love, Spencer Knapp, and John A. Hanover. 2007. 'Distinctive Inhibition of O-GlcNAcase Isoforms by an Alpha-GlcNAc Thiolsulfonate'. *Journal of the American Chemical Society* 129 (48): 14854–55. <https://doi.org/10.1021/ja076038u>.
- Kim, Eun Ju, Dae Ook Kang, Dona C. Love, and John A. Hanover. 2006. 'Enzymatic Characterization of O-GlcNAcase Isoforms Using a Fluorogenic GlcNAc Substrate'. *Carbohydrate Research* 341 (8): 971–82. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.03.004>.
- Kim, Eun Ju, Dona C. Love, Etzer Darout, Mohannad Abdo, Brian Rempel, Stephen G. Withers, Paul R. Rablen, John A. Hanover, and Spencer Knapp. 2010. 'OGA Inhibition by GlcNAc-Selenazoline'. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18 (19): 7058–64. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.08.010>.
- Kim, Eun Ju, Melissa Perreira, Craig J. Thomas, and John A. Hanover. 2006. 'An O-GlcNAcase-Specific Inhibitor and Substrate Engineered by the Extension of the N-Acetyl Moiety'. *Journal of the American Chemical Society* 128 (13): 4234–35. <https://doi.org/10.1021/ja0582915>.

- Knapp, Spencer, Mohannad Abdo, Kehinde Ajayi, Richard A. Huhn, Thomas J. Emge, Eun Ju Kim, and John A. Hanover. 2007. 'Tautomeric Modification of GlcNAc-Thiazoline'. *Organic Letters* 9 (12): 2321–24. <https://doi.org/10.1021/ol0706814>.
- Konrad, Robert J., Irina Mikolaenko, Joseph F. Tolar, Kan Liu, and Jeffrey E. Kudlow. 2001. 'The Potential Mechanism of the Diabetogenic Action of Streptozotocin: Inhibition of Pancreatic β -Cell O-GlcNAc-Selective N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase'. *Biochemical Journal* 356 (1): 31–41. <https://doi.org/10.1042/bj3560031>.
- Konrad, Robert J., Fengxue Zhang, John E. Hale, Michael D. Knierman, Gerald W. Becker, and Jeffrey E. Kudlow. 2002. 'Alloxan Is an Inhibitor of the Enzyme O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (1): 207–12. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00200-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00200-0).
- Krejzová, Jana, Petr Šimon, Lubica Kalachova, Natallia Kulik, Pavla Bojarová, Petr Marhol, Helena Pelantová, et al. 2014. 'Inhibition of GlcNAc-Processing Glycosidases by C-6-Azido-NAG-Thiazoline and Its Derivatives'. *Molecules* 19 (3): 3471–88. <https://doi.org/10.3390/molecules19033471>.
- Kreppel, L. K., M. A. Blomberg, and G. W. Hart. 1997. 'Dynamic Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins. Cloning and Characterization of a Unique O-GlcNAc Transferase with Multiple Tetratricopeptide Repeats'. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (14): 9308–15. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9308>.
- Kreppel, L. K., and G. W. Hart. 1999. 'Regulation of a Cytosolic and Nuclear O-GlcNAc Transferase. Role of the Tetratricopeptide Repeats'. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (45): 32015–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32015>.
- Kröncke, Klaus-D., Karin Fehsel, Alexa Sommer, Maria-L. Rodriguez, and Victoria Kolb-Bachofen. 1995. 'Nitric Oxide Generation during Cellular Metabolization of the Diabetogenic N-Mefhyl-N-Nitroso-Urea Streptozotocin Contributes to Islet Cell DNA Damage'. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 376 (3): 179–86. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1995.376.3.179>.
- Kumar, Anand, Daniel Roberts, Kenneth E. Wood, Bruce Light, Joseph E. Parrillo, Satendra Sharma, Robert Suppes, et al. 2006. 'Duration of Hypotension before Initiation of Effective Antimicrobial Therapy Is the Critical Determinant of Survival in Human Septic Shock'. *Critical Care Medicine* 34 (6): 1589–96. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>.
- Laczy, Boglarka, Susan A. Marsh, Charlye A. Brocks, Istvan Wittmann, and John C. Chatham. 2010. 'Inhibition of O-GlcNAcase in Perfused Rat Hearts by NAG-Thiazolines at the Time of Reperfusion Is Cardioprotective in an O-GlcNAc-Dependent Manner'. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 299 (5): H1715–27. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00337.2010>.
- Lamb, John R, Stuart Tugendreich, and Phil Hieter. 1995. 'Tetratricopeptide Repeat Interactions: To TPR or Not to TPR?' *Trends in Biochemical Sciences* 20 (7): 257–59. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)89037-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)89037-4).
- Lazarus, Michael B., Yunsun Nam, Jiaoyang Jiang, Piotr Sliz, and Suzanne Walker. 2011. 'Structure of Human O-GlcNAc Transferase and Its Complex with a Peptide Substrate'. *Nature* 469 (7331): 564–67. <https://doi.org/10.1038/nature09638>.
- Lee, Thomas N., William E. Alborn, Michael D. Knierman, and Robert J. Konrad. 2006. 'Alloxan Is an Inhibitor of O-GlcNAc-Selective N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 350 (4): 1038–43. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.155>.
- Lefebvre, Tony, Sébastien Pinte, Cateline Guérardel, Sophie Deltour, Nathalie Martin-Soudant, Marie-Christine Slomianny, Jean-Claude Michalski, and Dominique Leprince. 2004. 'The Tumor Suppressor HIC1 (Hypermethylated in Cancer 1) Is O-GlcNAc Glycosylated: O-Glycosylation of HIC1'. *European Journal of Biochemistry* 271 (19): 3843–54. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04316.x>.
- Lehman, D. M., D.-J. Fu, A. B. Freeman, K. J. Hunt, R. J. Leach, T. Johnson-Pais, J. Hamlington, et al. 2005. 'A Single Nucleotide Polymorphism in MGEA5 Encoding O-GlcNAc-Selective N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Is Associated With Type 2 Diabetes in Mexican Americans'. *Diabetes* 54 (4): 1214–21. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.4.1214>.
- Lemieux, M. Joanne, Brian L. Mark, Maia M. Cherney, Stephen G. Withers, Don J. Mahuran, and Michael N. G. James. 2006. 'Crystallographic Structure of Human Beta-Hexosaminidase A: Interpretation of Tay-Sachs

- Mutations and Loss of GM2 Ganglioside Hydrolysis'. *Journal of Molecular Biology* 359 (4): 913–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.004>.
- Lenzen, Sigurd. 2008. 'Oxidative Stress: The Vulnerable Beta-Cell'. *Biochemical Society Transactions* 36 (Pt 3): 343–47. <https://doi.org/10.1042/BST0360343>.
- Li, Jing, Cai-luan Huang, Lian-wen Zhang, Lin Lin, Zhong-hua Li, Fu-wu Zhang, and Peng Wang. 2010. 'Isoforms of Human O-GlcNAcase Show Distinct Catalytic Efficiencies'. *Biochemistry. Biokhimiia* 75 (7): 938–43. <https://doi.org/10.1134/s0006297910070175>.
- Li, Yanyan, Céline Roux, Sylvie Lazereg, Jean-Pierre LeCaer, Olivier Laprèvote, Bernard Badet, and Marie-Ange Badet-Denisot. 2007. 'Identification of a Novel Serine Phosphorylation Site in Human Glutamine:Fructose-6-Phosphate Amidotransferase Isoform 1'. *Biochemistry* 46 (45): 13163–69. <https://doi.org/10.1021/bi700694c>.
- Lillelund, Vinni H., Henrik H. Jensen, Xifu Liang, and Mikael Bols. 2002. 'Recent Developments of Transition-State Analogue Glycosidase Inhibitors of Non-Natural Product Origin'. *Chemical Reviews* 102 (2): 515–54. <https://doi.org/10.1021/cr000433k>.
- Lima, Victor V., Fernanda R. Giachini, Fernando S. Carneiro, Zidonia N. Carneiro, Mohamed A. Saleh, David M. Pollock, Zuleica B. Fortes, et al. 2010. 'O-GlcNAcylation Contributes to Augmented Vascular Reactivity Induced by Endothelin 1'. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)* 55 (1): 180–88. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.143818>.
- Lin, Wei, Ling Gao, and Xing Chen. 2015. 'Protein-Specific Imaging of O-GlcNAcylation in Single Cells'. *ChemBioChem* 16 (18): 2571–75. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500544>.
- Liu, J, Y Pang, T Chang, P Bounelis, J Chatham, and R Marchase. 2006. 'Increased Hexosamine Biosynthesis and Protein O-GlcNAc Levels Associated with Myocardial Protection against Calcium Paradox and Ischemia'. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 40 (2): 303–12. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2005.11.003>.
- Liu, Kan, Andrew J Paterson, Robert J Konrad, A.F Parlow, Shiro Jimi, Meejeon Roh, Edward Chin, and Jeffrey E Kudlow. 2002. 'Streptozotocin, an O-GlcNAcase Inhibitor, Blunts Insulin and Growth Hormone Secretion'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 194 (1–2): 135–46. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00155-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00155-7).
- Liu, Tai-Wei, Wesley F. Zandberg, Tracey M. Gloster, Lehua Deng, Kelsey D. Murray, Xiaoyang Shan, and David J. Vocadlo. 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): 7644–48. <https://doi.org/10.1002/anie.201803254>.
- Liu, Yubo, Yang Ren, Yu Cao, Huang Huang, Qiong Wu, Wenli Li, Sijin Wu, and Jianing Zhang. 2017. 'Discovery of a Low Toxicity O-GlcNAc Transferase (OGT) Inhibitor by Structure-Based Virtual Screening of Natural Products'. *Scientific Reports* 7 (1): 12334. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12522-0>.
- Lombard, Vincent, Hemalatha Golaconda Ramulu, Elodie Drula, Pedro M. Coutinho, and Bernard Henrissat. 2014. 'The Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy) in 2013'. *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue): D490–495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1178>.
- Love, Dona C., Jarema Kochan, R. Lamont Cathey, Sang-Hoon Shin, John A. Hanover, and Jarema Kochran. 2003. 'Mitochondrial and Nucleocytoplasmic Targeting of O-Linked GlcNAc Transferase'. *Journal of Cell Science* 116 (Pt 4): 647–54. <https://doi.org/10.1242/jcs.00246>.
- Lozano, Liliana, Roberto Lara-Lemus, Edgar Zenteno, and Noé Alvarado-Vásquez. 2014. 'The Mitochondrial O-Linked N-Acetylglucosamine Transferase (MOGT) in the Diabetic Patient Could Be the Initial Trigger to Develop Alzheimer Disease'. *Experimental Gerontology* 58 (October): 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.08.008>.
- Lubas, W. A., D. W. Frank, M. Krause, and J. A. Hanover. 1997. 'O-Linked GlcNAc Transferase Is a Conserved Nucleocytoplasmic Protein Containing Tetratricopeptide Repeats'. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (14): 9316–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9316>.
- Lunde, Ida G., Jan Magnus Aronsen, Heidi Kvaløy, Eirik Qvigstad, Ivar Sjaastad, Theis Tønnessen, Geir Christensen, Line M. Grønning-Wang, and Cathrine R. Carlson. 2012. 'Cardiac O-GlcNAc Signaling Is

- Increased in Hypertrophy and Heart Failure'. *Physiological Genomics* 44 (2): 162–72. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00016.2011>.
- Ma, Junfeng, Partha Banerjee, Stephen A. Whelan, Ting Liu, An-Chi Wei, Genaro Ramirez-Correa, Mark E. McComb, et al. 2016. 'Comparative Proteomics Reveals Dysregulated Mitochondrial O-GlcNAcylation in Diabetic Hearts'. *Journal of Proteome Research* 15 (7): 2254–64. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00250>.
- Ma, Junfeng, Ting Liu, An-Chi Wei, Partha Banerjee, Brian O'Rourke, and Gerald W. Hart. 2015. 'O-GlcNAc Profiling Identifies Widespread O-Linked β -N-Acetylglucosamine Modification (O-GlcNAcylation) in Oxidative Phosphorylation System Regulating Cardiac Mitochondrial Function'. *Journal of Biological Chemistry* 290 (49): 29141–53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.691741>.
- Ma, Zhiyuan, David J. Vocadlo, and Keith Vosseller. 2013. 'Hyper-O-GlcNAcylation Is Anti-Apoptotic and Maintains Constitutive NF- κ B Activity in Pancreatic Cancer Cells'. *The Journal of Biological Chemistry* 288 (21): 15121–30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.470047>.
- Ma, Zhiyuan, and Keith Vosseller. 2014. 'Cancer Metabolism and Elevated O-GlcNAc in Oncogenic Signaling'. *Journal of Biological Chemistry* 289 (50): 34457–65. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.577718>.
- Macauley, Matthew S., Abigail K. Bubbs, Carlos Martinez-Fleites, Gideon J. Davies, and David J. Vocadlo. 2008. 'Elevation of Global O-GlcNAc Levels in 3T3-L1 Adipocytes by Selective Inhibition of O-GlcNAcase Does Not Induce Insulin Resistance'. *Journal of Biological Chemistry* 283 (50): 34687–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804525200>.
- Macauley, Matthew S., Keith A. Stubbs, and David J. Vocadlo. 2005. 'O-GlcNAcase Catalyzes Cleavage of Thioglycosides without General Acid Catalysis'. *Journal of the American Chemical Society* 127 (49): 17202–3. <https://doi.org/10.1021/ja0567687>.
- Macauley, Matthew S., and David J. Vocadlo. 2009. 'Enzymatic Characterization and Inhibition of the Nuclear Variant of Human O-GlcNAcase'. *Carbohydrate Research* 344 (9): 1079–84. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.04.017>.
- . 2010. 'Increasing O-GlcNAc Levels: An Overview of Small-Molecule Inhibitors of O-GlcNAcase'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800 (2): 107–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.07.028>.
- Macauley, Matthew S., Garrett E. Whitworth, Aleksandra W. Debowski, Danielle Chin, and David J. Vocadlo. 2005. 'O-GlcNAcase Uses Substrate-Assisted Catalysis: Kinetic Analysis and Development of Highly Selective Mechanism-Inspired Inhibitors'. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (27): 25313–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413819200>.
- Manning, G., D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam. 2002. 'The Protein Kinase Complement of the Human Genome'. *Science (New York, N.Y.)* 298 (5600): 1912–34. <https://doi.org/10.1126/science.1075762>.
- Mansford, K.R.L., and Lionel Opie. 1968. 'COMPARISON OF METABOLIC ABNORMALITIES IN DIABETES MELLITUS INDUCED BY STREPTOZOTOCIN OR BY ALLOXAN'. *The Lancet* 291 (7544): 670–71. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(68\)92103-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(68)92103-X).
- Marin, Douglas Popp, Anaysa Paola Bolin, Rita de Cássia Santos Macedo, Sandra Coccuzzo Sampaio, and Rosemari Otton. 2011. 'ROS Production in Neutrophils from Alloxan-Induced Diabetic Rats Treated in Vivo with Astaxanthin'. *International Immunopharmacology* 11 (1): 103–9. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.10.013>.
- Mark, Brian L., Don J. Mahuran, Maia M. Cherney, Dalian Zhao, Spencer Knapp, and Michael N. G. James. 2003. 'Crystal Structure of Human Beta-Hexosaminidase B: Understanding the Molecular Basis of Sandhoff and Tay-Sachs Disease'. *Journal of Molecular Biology* 327 (5): 1093–1109. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00216-x](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00216-x).
- Marsh, Susan A., Helen E. Collins, and John C. Chatham. 2014. 'Protein O-GlcNAcylation and Cardiovascular (Patho)Physiology'. *Journal of Biological Chemistry* 289 (50): 34449–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.585984>.

- Marshall, S., V. Bacote, and R. R. Traxinger. 1991a. '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): 4706–12.
- . 1991b. 'Complete Inhibition of Glucose-Induced Desensitization of the Glucose Transport System by Inhibitors of MRNA Synthesis. Evidence for Rapid Turnover of Glutamine:Fructose-6-Phosphate Amidotransferase'. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (16): 10155–61.
- Martin, Greg S. 2012. 'Sepsis, Severe Sepsis and Septic Shock: Changes in Incidence, Pathogens and Outcomes'. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 10 (6): 701–6. <https://doi.org/10.1586/eri.12.50>.
- Martin, Sara E. S., Zhi-Wei Tan, Harri M. Itkonen, Damien Y. Duveau, Joao A. Paulo, John Janetzko, Paul L. Boutz, et al. 2018. 'Structure-Based Evolution of Low Nanomolar O-GlcNAc Transferase Inhibitors'. *Journal of the American Chemical Society* 140 (42): 13542–45. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b07328>.
- Mayr, Florian B, Sachin Yende, and Derek C Angus. 2014. 'Epidemiology of Severe Sepsis'. *Virulence* 5 (1): 4–11. <https://doi.org/10.4161/viru.27372>.
- McClain, D. A., and E. D. Crook. 1996. 'Hexosamines and Insulin Resistance'. *Diabetes* 45 (8): 1003–9. <https://doi.org/10.2337/diab.45.8.1003>.
- McClain, Donald A. 2002. 'Hexosamines as Mediators of Nutrient Sensing and Regulation in Diabetes'. *Journal of Diabetes and Its Complications* 16 (1): 72–80. [https://doi.org/10.1016/S1056-8727\(01\)00188-X](https://doi.org/10.1016/S1056-8727(01)00188-X).
- Mehdy, Ali, Willy Morelle, Claire Rosnoblet, Dominique Legrand, Tony Lefebvre, Sandrine Duvet, and François Foulquier. 2012. 'PUGNAc Treatment Leads to an Unusual Accumulation of Free Oligosaccharides in CHO Cells'. *Journal of Biochemistry* 151 (4): 439–46. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs012>.
- Moffett, John R., Narayanan Puthillathu, Ranjini Vengilote, Diane M. Jaworski, and Aryan M. Namboodiri. 2020. 'Acetate Revisited: A Key Biomolecule at the Nexus of Metabolism, Epigenetics and Oncogenesis—Part 1: Acetyl-CoA, Acetogenesis and Acyl-CoA Short-Chain Synthetases'. *Frontiers in Physiology* 11 (November): 580167. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.580167>.
- Mu, Yongxin, Houzhi Yu, Tongbin Wu, Jianlin Zhang, Sylvia M. Evans, and Ju Chen. 2020. 'O-Linked β -N-Acetylglucosamine Transferase Plays an Essential Role in Heart Development through Regulating Angiopoietin-1'. Edited by Anthony B. Firulli. *PLOS Genetics* 16 (4): e1008730. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008730>.
- Murata, Koichiro, Katsutaro Morino, Shogo Ida, Natsuko Ohashi, Mengistu Lemechea, Shi-Young Park, Atsushi Ishikado, et al. 2018. 'Lack of O-GlcNAcylation Enhances Exercise-Dependent Glucose Utilization Potentially through AMP-Activated Protein Kinase Activation in Skeletal Muscle'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495 (2): 2098–2104. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.081>.
- Murphy, Michael P. 2008. 'Targeting Lipophilic Cations to Mitochondria'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1777 (7–8): 1028–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2008.03.029>.
- Niranjan, Tejasvi S., Cindy Skinner, Melanie May, Tychele Turner, Rebecca Rose, Roger Stevenson, Charles E. Schwartz, and Tao Wang. 2015. 'Affected Kindred Analysis of Human X Chromosome Exomes to Identify Novel X-Linked Intellectual Disability Genes'. Edited by Barbara Bardoni. *PLOS ONE* 10 (2): e0116454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116454>.
- Nolte, Dagmar, and Ulrich Müller. 2002. 'Human O-GlcNAc Transferase (OGT): Genomic Structure, Analysis of Splice Variants, Fine Mapping in Xq13.1'. *Mammalian Genome* 13 (1): 62–64. <https://doi.org/10.1007/s00335-001-2108-9>.
- Obici, Silvana, and Luciano Rossetti. 2003. 'Minireview: Nutrient Sensing and the Regulation of Insulin Action and Energy Balance'. *Endocrinology* 144 (12): 5172–78. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0999>.
- O'Brien, Connor, William Beaubien-Souligny, Myriam Amsallem, André Denault, and François Haddad. 2020. 'Cardiogenic Shock: Reflections at the Crossroad Between Perfusion, Tissue Hypoxia, and Mitochondrial Function'. *Canadian Journal of Cardiology* 36 (2): 184–96. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2019.11.020>.
- O'Donnell, Niall, Natasha E. Zachara, Gerald W. Hart, and Jamey D. Marth. 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): 1680–90. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.4.1680-1690.2004>.

- O'Dowd, B. F., F. Quan, H. F. Willard, A. M. Lamhonwah, R. G. Korneluk, J. A. Lowden, R. A. Gravel, and D. J. Mahuran. 1985. 'Isolation of cDNA Clones Coding for the Beta Subunit of Human Beta-Hexosaminidase.' *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (4): 1184–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.4.1184>.
- 'O-GlcNAc Database'. n.d. Accessed 14 April 2021. <https://oglcnac.org/>.
- Oki, Tohru, Kazuto Yamazaki, Junro Kuromitsu, Masayuki Okada, and Isao Tanaka. 1999. 'cDNA Cloning and Mapping of a Novel Subtype of Glutamine:Fructose-6-Phosphate Amidotransferase (GFAT2) in Human and Mouse'. *Genomics* 57 (2): 227–34. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5785>.
- Olsen, Jesper V., Michiel Vermeulen, Anna Santamaria, Chanchal Kumar, Martin L. Miller, Lars J. Jensen, Florian Gnad, et al. 2010. 'Quantitative Phosphoproteomics Reveals Widespread Full Phosphorylation Site Occupancy during Mitosis'. *Science Signaling* 3 (104): ra3. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000475>.
- Olson, Aaron K., Bertrand Bouchard, Wei Zhong Zhu, John C. Chatham, and Christine Des Rosiers. 2020. 'First Characterization of Glucose Flux through the Hexosamine Biosynthesis Pathway (HBP) in Ex Vivo Mouse Heart'. *The Journal of Biological Chemistry* 295 (7): 2018–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010565>.
- Olszewski, Neil E., Christopher M. West, Slim O. Sassi, and Lynn M. Hartweck. 2010. 'O-GlcNAc Protein Modification in Plants: Evolution and Function'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1800 (2): 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.11.016>.
- Ortiz-Meoz, Rodrigo F., Jiaoyang Jiang, Michael B. Lazarus, Marina Orman, John Janetzko, Chenguang Fan, Damien Y. Dubeau, Zhi-Wei Tan, Craig J. Thomas, and Suzanne Walker. 2015. 'A Small Molecule That Inhibits OGT Activity in Cells'. *ACS Chemical Biology* 10 (6): 1392–97. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00004>.
- Overdijk, B., W. M. Van der Kroef, G. J. Van Steijn, and J. J. Lisman. 1981. 'Isolation and Further Characterization of Bovine Brain Hexosaminidase C'. *Biochimica Et Biophysica Acta* 659 (2): 255–66. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(81\)90052-8](https://doi.org/10.1016/0005-2744(81)90052-8).
- Pagesy, Patrick, Caroline Tachet, Ali Mostefa-Kara, Etienne Larger, and Tarik Issad. 2019. 'Increased OGA Expression and Activity in Leukocytes from Patients with Diabetes: Correlation with Inflammation Markers'. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 127 (08): 517–23. <https://doi.org/10.1055/a-0596-7337>.
- Pantaleon, Marie, Hwee Y. Tan, Georgia R. Kafer, and Peter L. Kaye. 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): 751–58. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.076661>.
- Park, Seung Yoon, Jiwon Ryu, and Wan Lee. 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): 220–29. <https://doi.org/10.1038/emmm.2005.30>.
- Pathak, Shalini, Helge C. Dorfmüller, Vladimir S. Borodkin, and Daan M. F. van Aalten. 2008. 'Chemical Dissection of the Link between Streptozotocin, O-GlcNAc, and Pancreatic Cell Death'. *Chemistry & Biology* 15 (8): 799–807. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.06.010>.
- Patsos, Georgios, Virginie Hebbe-Viton, Catherine Robbe-Masselot, David Masselot, Raul San Martin, Rosemary Greenwood, Christos Paraskeva, et al. 2009. 'O-Glycan Inhibitors Generate Aryl-Glycans, Induce Apoptosis and Lead to Growth Inhibition in Colorectal Cancer Cell Lines'. *Glycobiology* 19 (4): 382–98. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwn149>.
- Pei, Jen-Sheng, Chia-Chi Liu, Yuan-Nian Hsu, Li-Ling Lin, Shou-Cheng Wang, Jing-Gung Chung, Da-Tian Bau, and Song-Shei Lin. 2012. 'Amentoflavone Induces Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells via Mitochondria-Dependent Pathway'. *In Vivo (Athens, Greece)* 26 (6): 963–70.
- Pekkurnaz, Gulcin, Jonathan C. Trinidad, Xinnan Wang, Dong Kong, and Thomas L. Schwarz. 2014. 'Glucose Regulates Mitochondrial Motility via Milton Modification by O-GlcNAc Transferase'. *Cell* 158 (1): 54–68. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.007>.
- Perez-Cervera, Yobana, Vanessa Dehennaut, Moyira Aquino Gil, Katia Guedri, Carlos Josué Solórzano Mata, Stéphanie Olivier-Van Stichelen, Jean-Claude Michalski, François Foulquier, and Tony Lefebvre. 2013. 'Insulin Signaling Controls the Expression of O-GlcNAc Transferase and Its Interaction with Lipid Microdomains'. *The FASEB Journal* 27 (9): 3478–86. <https://doi.org/10.1096/fj.12-217984>.

- Pozo, Kieran Brickley Karine, and F. Anne Stephenson. 2011. 'N-Acetylglucosamine Transferase Is an Integral Component of a Kinesin-Directed Mitochondrial Trafficking Complex'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813 (1): 269–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.011>.
- Pravata, Veronica M., Mehmet Gundogdu, Sergio G. Bartual, Andrew T. Ferenbach, Marios Stavridis, Katrin Öunap, Sander Pajusalu, Riina Žordania, Monica H. Wojcik, and Daan M. F. Aalten. 2020. 'A Missense Mutation in the Catalytic Domain of O-GlcNAc Transferase Links Perturbations in Protein O-GlcNAcylation to X-linked Intellectual Disability'. *FEBS Letters* 594 (4): 717–27. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13640>.
- Pravata, Veronica M., Villo Muha, Mehmet Gundogdu, Andrew T. Ferenbach, Poonam S. Kakade, Vasudha Vandadi, Ariane C. Wilmes, et al. 2019. 'Catalytic Deficiency of O-GlcNAc Transferase Leads to X-Linked Intellectual Disability'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (30): 14961–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1900065116>.
- Pravata, Veronica M., Michaela Omelková, Marios P. Stavridis, Chelsea M. Desbiens, Hannah M. Stephen, Dirk J. Lefeber, Jozef Gecz, et al. 2020. 'An Intellectual Disability Syndrome with Single-Nucleotide Variants in O-GlcNAc Transferase'. *European Journal of Human Genetics* 28 (6): 706–14. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0589-9>.
- Qian, Yimin, Mushtaq Ahmad, Shaoqing Chen, Paul Gillespie, Nam Le, Frank Mennona, Steven Mischke, et al. 2011. 'Discovery of 1-Arylcarbonyl-6,7-Dimethoxyisoquinoline Derivatives as Glutamine Fructose-6-Phosphate Amidotransferase (GFAT) Inhibitors'. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21 (21): 6264–69. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.09.009>.
- Qin, Zhen, Yibei Xiao, Xinbin Yang, Jeroen R. Mesters, Shaoqing Yang, and Zhengqiang Jiang. 2015. 'A Unique GCN5-Related Glucosamine N-Acetyltransferase Region Exist in the Fungal Multi-Domain Glycoside Hydrolase Family 3 β -N-Acetylglucosaminidase'. *Scientific Reports* 5 (December): 18292. <https://doi.org/10.1038/srep18292>.
- Quenot, Jean-Pierre, Christine Biquet, Fady Kara, Olivier Martinet, Frederique Ganster, Jean-Christophe Navellou, Vincent Castelain, et al. 2013. 'The Epidemiology of Septic Shock in French Intensive Care Units: The Prospective Multicenter Cohort EPISS Study'. *Critical Care (London, England)* 17 (2): R65. <https://doi.org/10.1186/cc12598>.
- Rafie, Karim, Andrii Gorelik, Riccardo Trapannone, Vladimir S. Borodkin, and Daan M. F. van Aalten. 2018. 'Thio-Linked UDP-Peptide Conjugates as O-GlcNAc Transferase Inhibitors'. *Bioconjugate Chemistry* 29 (6): 1834–40. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00194>.
- Ramirez-Correa, Genaro A., Wenhai Jin, Zihao Wang, Xin Zhong, Wei Dong Gao, Wagner B. Dias, Cecilia Vecoli, Gerald W. Hart, and Anne M. Murphy. 2008. 'O-Linked GlcNAc Modification of Cardiac Myofilament Proteins: A Novel Regulator of Myocardial Contractile Function'. *Circulation Research* 103 (12): 1354–58. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.184978>.
- Rao, Francesco V., Helge C. Dorfmueller, Fabrizio Villa, Matthew Allwood, Ian M. Eggleston, and Daan M. F. van Aalten. 2006. 'Structural Insights into the Mechanism and Inhibition of Eukaryotic O-GlcNAc Hydrolysis'. *The EMBO Journal* 25 (7): 1569–78. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601026>.
- Rigbolt, Kristoffer T. G., Tatyana A. Prokhorova, Vyacheslav Akimov, Jeanette Henningsen, Pia T. Johansen, Irina Kratchmarova, Moustapha Kassem, Matthias Mann, Jesper V. Olsen, and Blagoy Blagoev. 2011. 'System-Wide Temporal Characterization of the Proteome and Phosphoproteome of Human Embryonic Stem Cell Differentiation'. *Science Signaling* 4 (164): rs3. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001570>.
- Roos, M. D., and J. A. Hanover. 2000. 'Structure of O-Linked GlcNAc Transferase: Mediator of Glycan-Dependent Signaling'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271 (2): 275–80. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2600>.
- Rosse, Gerard. 2019. 'Diazaspiroonane Inhibitors of O-GlcNAc Hydrolase for the Treatment of Central Nervous System Diseases'. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 10 (2): 147–147. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.8b00653>.
- Rudd, Kristina E, Sarah Charlotte Johnson, Kareha M Agesa, Katya Anne Shackelford, Derrick Tsoi, Daniel Rhodes Kievlan, Danny V Colombara, et al. 2020. 'Global, Regional, and National Sepsis Incidence and Mortality,

- 1990–2017: Analysis for the Global Burden of Disease Study'. *The Lancet* 395 (10219): 200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7).
- Sacco, Francesca, Livia Perfetto, Luisa Castagnoli, and Gianni Cesareni. 2012. 'The Human Phosphatase Interactome: An Intricate Family Portrait'. *FEBS Letters* 586 (17): 2732–39. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.05.008>.
- Sanchez, Richard G., R. Ryley Parrish, Megan Rich, William M. Webb, Roxanne M. Lockhart, Kazuhito Nakao, Lara Ianov, et al. 2018. 'Human and Rodent Temporal Lobe Epilepsy Is Characterized by Changes in O-GlcNAc Homeostasis That Can Be Reversed to Dampen Epileptiform Activity'. Preprint. Neuroscience. <https://doi.org/10.1101/330738>.
- Schindler, M., M. Hogan, R. Miller, and D. DeGaetano. 1987. 'A Nuclear Specific Glycoprotein Representative of a Unique Pattern of Glycosylation'. *The Journal of Biological Chemistry* 262 (3): 1254–60.
- Schirm, M., M. Kalmokoff, A. Aubry, P. Thibault, M. Sandoz, and S. M. Logan. 2004. 'Flagellin from *Listeria Monocytogenes* Is Glycosylated with Beta-O-Linked N-Acetylglucosamine'. *Journal of Bacteriology* 186 (20): 6721–27. <https://doi.org/10.1128/JB.186.20.6721-6727.2004>.
- Schnedl, W. J., S. Ferber, J. H. Johnson, and C. B. Newgard. 1994. 'STZ Transport and Cytotoxicity: Specific Enhancement in GLUT2-Expressing Cells'. *Diabetes* 43 (11): 1326–33. <https://doi.org/10.2337/diab.43.11.1326>.
- Schultz, Jörg, and Birgit Pils. 2002. 'Prediction of Structure and Functional Residues for O-GlcNAcase, a Divergent Homologue of Acetyltransferases'. *FEBS Letters* 529 (2–3): 179–82. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03322-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03322-7).
- Schwer, Bjoern, Jakob Bunkenborg, Regis O. Verdin, Jens S. Andersen, and Eric Verdin. 2006. 'Reversible Lysine Acetylation Controls the Activity of the Mitochondrial Enzyme Acetyl-CoA Synthetase 2'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (27): 10224–29. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603968103>.
- Selnick, Harold G., J. Fred Hess, Cuyue Tang, Kun Liu, Joel B. Schachter, Jeanine E. Ballard, Jacob Marcus, et al. 2019. 'Discovery of MK-8719, a Potent O-GlcNAcase Inhibitor as a Potential Treatment for Tauopathies'. *Journal of Medicinal Chemistry* 62 (22): 10062–97. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01090>.
- Selvam, C., and Sanjay M. Jachak. 2004. 'A Cyclooxygenase (COX) Inhibitory Biflavonoid from the Seeds of *Semecarpus Anacardium*'. *Journal of Ethnopharmacology* 95 (2–3): 209–12. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.07.026>.
- Selvan, Nithya, Daniel Mariappa, Henk W. P. van den Toorn, Albert J. R. Heck, Andrew T. Ferenbach, and Daan M. F. van Aalten. 2015. 'The Early Metazoan *Trichoplax Adhaerens* Possesses a Functional O-GlcNAc System'. *The Journal of Biological Chemistry* 290 (19): 11969–82. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.628750>.
- Shafi, R., S. P. Iyer, L. G. Ellies, N. O'Donnell, K. W. Marek, D. Chui, G. W. Hart, and J. D. Marth. 2000. 'The O-GlcNAc Transferase Gene Resides on the X Chromosome and Is Essential for Embryonic Stem Cell Viability and Mouse Ontogeny'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (11): 5735–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.100471497>.
- Shanmugasundaram, Bhagavathy, Aleksandra W. Debowski, Rebecca J. Dennis, Gideon J. Davies, David J. Vocadlo, and Andrea Vasella. 2006. 'Inhibition of O-GlcNAcase by a Gluco-Configured Nagstatin and a PUGNAc–Imidazole Hybrid Inhibitor'. *Chem. Commun.*, no. 42: 4372–74. <https://doi.org/10.1039/B612154C>.
- Shen, Shengqiang, Wei Chen, Lili Dong, Qing Yang, Huizhe Lu, and Jianjun Zhang. 2018. 'Design and Synthesis of Naphthalimide Group-Bearing Thioglycosides as Novel β -N-Acetylhexosaminidases Inhibitors'. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 33 (1): 445–52. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1419217>.
- Shi, Hao, Alexander Munk, Thomas S. Nielsen, Morgan R. Daughtry, Louise Larsson, Shize Li, Kasper F. Høyer, et al. 2018. 'Skeletal Muscle O-GlcNAc Transferase Is Important for Muscle Energy Homeostasis and Whole-Body Insulin Sensitivity'. *Molecular Metabolism* 11 (May): 160–77. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.02.010>.

- Singer, Mervyn, Clifford S. Deutschman, Christopher Warren Seymour, Manu Shankar-Hari, Djillali Annane, Michael Bauer, Rinaldo Bellomo, et al. 2016. 'The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)'. *JAMA* 315 (8): 801. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.
- Soesanto, Yudi A., Bai Luo, Deborah Jones, Rodrick Taylor, J. Scott Gabrielsen, Glendon Parker, and Donald A. McClain. 2008. 'Regulation of Akt Signaling by O -GlcNAc in Euglycemia'. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295 (4): E974–80. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90366.2008>.
- Srinivasan, Vedantham, Narasimhan Sandhya, Rangasamy Sampathkumar, Syed Farooq, Viswanathan Mohan, and Muthuswamy Balasubramanyam. 2007. 'Glutamine Fructose-6-Phosphate Amidotransferase (GFAT) Gene Expression and Activity in Patients with Type 2 Diabetes: Inter-Relationships with Hyperglycaemia and Oxidative Stress'. *Clinical Biochemistry* 40 (13–14): 952–57. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.05.002>.
- Starr, C. M., and J. A. Hanover. 1990. 'Glycosylation of Nuclear Pore Protein P62. Reticulocyte Lysate Catalyzes O-Linked N-Acetylglucosamine Addition in Vitro'. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (12): 6868–73.
- Stubbs, Keith A., Matthew S. Macauley, and David J. Vocadlo. 2009. 'A Selective Inhibitor Gal-PUGNAc of Human Lysosomal Beta-Hexosaminidases Modulates Levels of the Ganglioside GM2 in Neuroblastoma Cells'. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 48 (7): 1300–1303. <https://doi.org/10.1002/anie.200804583>.
- Stubbs, Keith A., Nelson Zhang, and David J. Vocadlo. 2006. 'A Divergent Synthesis of 2-Acyl Derivatives of PUGNAc Yields Selective Inhibitors of O-GlcNAcase'. *Organic & Biomolecular Chemistry* 4 (5): 839–45. <https://doi.org/10.1039/b516273d>.
- Suh, Han Na, Yu Jin Lee, Mi Ok Kim, Jung Min Ryu, and Ho Jae Han. 2014. 'Glucosamine-Induced Sp1 O-GlcNAcylation Ameliorates Hypoxia-Induced SGLT Dysfunction in Primary Cultured Renal Proximal Tubule Cells'. *Journal of Cellular Physiology* 229 (10): 1557–68. <https://doi.org/10.1002/jcp.24599>.
- Tatsuta, Kuniaki, and Shozo Miura. 1995. 'Total Synthesis of Nagstatin, an N-Acetyl-β-D-Glucosaminidase Inhibitor'. *Tetrahedron Letters* 36 (37): 6721–24. [https://doi.org/10.1016/00404-0399\(50\)1361-K](https://doi.org/10.1016/00404-0399(50)1361-K).
- Terinek, Miroslav, and Andrea Vasella. 2005. 'Synthesis Of N-Acetylglucosamine-Derived Nagstatin Analogues and Their Evaluation as Glycosidase Inhibitors'. *Helvetica Chimica Acta* 88 (1): 10–22. <https://doi.org/10.1002/hlca.200490286>.
- Toleman, Clifford, Andrew J. Paterson, Thomas R. Whisenhunt, and Jeffrey E. Kudlow. 2004. 'Characterization of the Histone Acetyltransferase (HAT) Domain of a Bifunctional Protein with Activable O-GlcNAcase and HAT Activities'. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (51): 53665–73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410406200>.
- Torres, C. R., and G. W. Hart. 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): 3308–17.
- Trapannone, Riccardo, Karim Rafie, and Daan M. F. van Aalten. 2016. 'O-GlcNAc Transferase Inhibitors: Current Tools and Future Challenges'. *Biochemical Society Transactions* 44 (1): 88–93. <https://doi.org/10.1042/BST20150189>.
- Traxinger, R.R., and S. Marshall. 1991. 'Coordinated Regulation of Glutamine:Fructose-6-Phosphate Amidotransferase Activity by Insulin, Glucose, and Glutamine. Role of Hexosamine Biosynthesis in Enzyme Regulation'. *Journal of Biological Chemistry* 266 (16): 10148–54. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)99202-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)99202-1).
- Trinidad, Jonathan C., David T. Barkan, Brittany F. Gullledge, Agnes Thalhammer, Andrej Sali, Ralf Schoepfer, and Alma L. Burlingame. 2012. 'Global Identification and Characterization of Both O-GlcNAcylation and Phosphorylation at the Murine Synapse'. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 11 (8): 215–29. <https://doi.org/10.1074/mcp.O112.018366>.
- Vaidyanathan, Krithika, Tejasvi Niranjana, Nithya Selvan, Chin Fen Teo, Melanie May, Sneha Patel, Brent Weatherly, et al. 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'. *Journal of Biological Chemistry* 292 (21): 8948–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.771030>.
- Vaidyanathan, Krithika, and Lance Wells. 2014. 'Multiple Tissue-Specific Roles for the O-GlcNAc Post-Translational Modification in the Induction of and Complications Arising from Type II Diabetes'. *The Journal of Biological Chemistry* 289 (50): 34466–71. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.591560>.
- Varki, Ajit, Richard D. Cummings, Jeffrey D. Esko, Hudson H. Freeze, Pamela Stanley, Carolyn R. Bertozzi, Gerald W. Hart, and Marilyn E. Etzler, eds. 2009. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>.
- Walter, Lisa A., Yu Hsuan Lin, Christopher J. Halbrook, Kelly N. Chuh, Lina He, Nichole J. Pedowitz, Anna R. Batt, et al. 2020. 'Inhibiting the Hexosamine Biosynthetic Pathway Lowers O-GlcNAcylation Levels and Sensitizes Cancer to Environmental Stress'. *Biochemistry* 59 (34): 3169–79. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00560>.
- Wang, Shuai, Xun Huang, Danni Sun, Xianliang Xin, Qiuming Pan, Shuying Peng, Zhongjie Liang, et al. 2012. 'Extensive Crosstalk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Akt Signaling'. Edited by Kaustubh Datta. *PLoS ONE* 7 (5): e37427. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037427>.
- Wang, Xiaohai, Wenping Li, Jacob Marcus, Michelle Pearson, Lixin Song, Karen Smith, Giuseppe Terracina, et al. 2020. 'MK-8719, a Novel and Selective O -GlcNAcase Inhibitor That Reduces the Formation of Pathological Tau and Ameliorates Neurodegeneration in a Mouse Model of Tauopathy'. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 374 (2): 252–63. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.266122>.
- Wang, Zihao, Namrata D. Udeshi, Meaghan O'Malley, Jeffrey Shabanowitz, Donald F. Hunt, and Gerald W. Hart. 2010. 'Enrichment and Site Mapping of O-Linked N-Acetylglucosamine by a Combination of Chemical/Enzymatic Tagging, Photochemical Cleavage, and Electron Transfer Dissociation Mass Spectrometry'. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 9 (1): 153–60. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900268-MCP200>.
- Watson, Lewis J., Hebert T. Facundo, Gladys A. Ngoh, Mohamed Ameen, Robert E. Brainard, Kewakebt M. Lemma, Bethany W. Long, Sumanth D. Prabhu, Yu-Ting Xuan, and Steven P. Jones. 2010. 'O-Linked β -N -Acetylglucosamine Transferase Is Indispensable in the Failing Heart'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (41): 17797–802. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001907107>.
- Watson, Lewis J., Bethany W. Long, Angelica M. DeMartino, Kenneth R. Brittian, Ryan D. Readnower, Robert E. Brainard, Timothy D. Cummins, Lakshmanan Annamalai, Bradford G. Hill, and Steven P. Jones. 2014. 'Cardiomyocyte *Ogt* Is Essential for Postnatal Viability'. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 306 (1): H142–53. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00438.2013>.
- Wells, L. 2001. 'Glycosylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Signal Transduction and O-GlcNAc'. *Science* 291 (5512): 2376–78. <https://doi.org/10.1126/science.1058714>.
- Wells, Lance, Chad Slawson, and Gerald W. Hart. 2011. 'The E2F-1 Associated Retinoblastoma-Susceptibility Gene Product Is Modified by O-GlcNAc'. *Amino Acids* 40 (3): 877–83. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0709-x>.
- Whelan, Stephen A., Wagner B. Dias, Lakshmanan Thiruneelakantapillai, M. Daniel Lane, and Gerald W. Hart. 2010. 'Regulation of Insulin Receptor Substrate 1 (IRS-1)/AKT Kinase-Mediated Insulin Signaling by O-Linked β -N-Acetylglucosamine in 3T3-L1 Adipocytes'. *Journal of Biological Chemistry* 285 (8): 5204–11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.077818>.
- Whelan, Stephen A., M. Daniel Lane, and Gerald W. Hart. 2008. 'Regulation of the O-Linked Beta-N-Acetylglucosamine Transferase by Insulin Signaling'. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (31): 21411–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800677200>.
- Whisenhunt, Thomas R., Xiaoyong Yang, Damon B. Bowe, Andrew J. Paterson, Brian A. Van Tine, and Jeffrey E. Kudlow. 2006. 'Disrupting the Enzyme Complex Regulating O-GlcNAcylation Blocks Signaling and Development'. *Glycobiology* 16 (6): 551–63. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj096>.
- Whitworth, Garrett E., Matthew S. Macauley, Keith A. Stubbs, Rebecca J. Dennis, Edward J. Taylor, Gideon J. Davies, Ian R. Greig, and David J. Vocadlo. 2007. 'Analysis of PUGNAc and NAG-Thiazoline as Transition State Analogues for Human O-GlcNAcase: Mechanistic and Structural Insights into Inhibitor

- Selectivity and Transition State Poise'. *Journal of the American Chemical Society* 129 (3): 635–44. <https://doi.org/10.1021/ja065697o>.
- Willems, Anke P., Mehmet Gundogdu, Marlies J.E. Kempers, Jacques C. Giltay, Rolph Pfundt, Martin Elferink, Bettina F. Loza, et al. 2017. 'Mutations in N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) Transferase in Patients with X-Linked Intellectual Disability'. *Journal of Biological Chemistry* 292 (30): 12621–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.790097>.
- Woosley, Bryan, Min Xie, Lance Wells, Ron Orlando, Derek Garrison, Daniel King, and Carl Bergmann. 2006. 'Comprehensive Glycan Analysis of Recombinant *Aspergillus Niger* Endo-Polygalacturonase C'. *Analytical Biochemistry* 354 (1): 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.02.002>.
- Worth, Matthew, Chia-Wei Hu, Hao Li, Dacheng Fan, Arielis Estevez, Dongsheng Zhu, Ao Wang, and Jiaoyang Jiang. 2019. 'Targeted Covalent Inhibition of O -GlcNAc Transferase in Cells'. *Chemical Communications* 55 (88): 13291–94. <https://doi.org/10.1039/C9CC04560K>.
- Wrabl, J. O., and N. V. Grishin. 2001. 'Homology between O-Linked GlcNAc Transferases and Proteins of the Glycogen Phosphorylase Superfamily'. *Journal of Molecular Biology* 314 (3): 365–74. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5151>.
- Wright, JaLessa N., Gloria A. Benavides, Michelle S. Johnson, Willayat Wani, Xiaosen Ouyang, Luyun Zou, Helen E. Collins, Jianhua Zhang, Victor Darley-USmar, and John C. Chatham. 2019. 'Acute Increases in O -GlcNAc Indirectly Impair Mitochondrial Bioenergetics through Dysregulation of LonP1-Mediated Mitochondrial Protein Complex Turnover'. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 316 (6): C862–75. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00491.2018>.
- Wu, Guogan, Yu Sun, Wei Qu, Ying Huang, Ling Lu, Lun Li, and Weilan Shao. 2011. 'Application of GFAT as a Novel Selection Marker to Mediate Gene Expression'. Edited by Mick Tuite. *PLoS ONE* 6 (2): e17082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017082>.
- Wulff-Fuentes, Eugenia, Rex R. Berendt, Logan Massman, Laura Danner, Florian Malard, Jeet Vora, Robel Kahsay, and Stephanie Olivier-Van Stichelen. 2021. 'The Human O-GlcNAc Database and Meta-Analysis'. *Scientific Data* 8 (1): 25. <https://doi.org/10.1038/s41597-021-00810-4>.
- Xing, Dongqi, Wenguang Feng, Laszlo G. Nöt, Andrew P. Miller, Yun Zhang, Yiu-Fai Chen, Erum Majid-Hassan, John C. Chatham, and Suzanne Oparil. 2008. 'Increased Protein O -GlcNAc Modification Inhibits Inflammatory and Neointimal Responses to Acute Endoluminal Arterial Injury'. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 295 (1): H335–42. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01259.2007>.
- Xue-Franzén, Yongtao, Johan Henriksson, Thomas R. Bürglin, and Anthony P. H. Wright. 2013. 'Distinct Roles of the Gcn5 Histone Acetyltransferase Revealed during Transient Stress-Induced Reprogramming of the Genome'. *BMC Genomics* 14 (July): 479. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-479>.
- Yang, Shaolong, Lu-yun Zou, Pam Bounelis, Irshad Chaudry, John C. Chatham, and Richard B. Marchase. 2006. 'GLUCOSAMINE ADMINISTRATION DURING RESUSCITATION IMPROVES ORGAN FUNCTION AFTER TRAUMA HEMORRHAGE'. *SHOCK* 25 (6): 600–607. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000209563.07693.db>.
- Yang, Xiaoyong, Pat P. Ongusaha, Philip D. Miles, Joyce C. Havstad, Fengxue Zhang, W. Venus So, Jeffrey E. Kudlow, et al. 2008. 'Phosphoinositide Signalling Links O-GlcNAc Transferase to Insulin Resistance'. *Nature* 451 (7181): 964–69. <https://doi.org/10.1038/nature06668>.
- Yang, Xiaoyong, and Kevin Qian. 2017. 'Protein O-GlcNAcylation: Emerging Mechanisms and Functions'. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (7): 452–65. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.22>.
- Yang, Yong Ryoul, Minseok Song, Ho Lee, Yoon Jeon, Eun-Jeong Choi, Hyun-Jun Jang, Hyo Youl Moon, et al. 2012. 'O-GlcNAcase Is Essential for Embryonic Development and Maintenance of Genomic Stability'. *Aging Cell* 11 (3): 439–48. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00801.x>.
- Yehezkel, Galit, Liz Cohen, Adi Kliger, Esther Manor, and Isam Khalaila. 2012. 'O-Linked β -N-Acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) in Primary and Metastatic Colorectal Cancer Clones and Effect of N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Silencing on Cell Phenotype and Transcriptome'. *The Journal of Biological Chemistry* 287 (34): 28755–69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.345546>.

- Yu, Yang, Lan Zhang, Xiaojing Li, Xiaoqin Run, Zhihou Liang, Yi Li, Ying Liu, et al. 2012. 'Differential Effects of an O-GlcNAcase Inhibitor on Tau Phosphorylation'. *PloS One* 7 (4): e35277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035277>.
- Yuzwa, Scott A, Matthew S Macauley, Julia E Heinonen, Xiaoyang Shan, Rebecca J Dennis, Yuan He, Garrett E Whitworth, et al. 2008. 'A Potent Mechanism-Inspired O-GlcNAcase Inhibitor That Blocks Phosphorylation of Tau in Vivo'. *Nature Chemical Biology* 4 (8): 483–90. <https://doi.org/10.1038/nchembio.96>.
- Yuzwa, Scott A., Xiaoyang Shan, Bryan A. Jones, Gang Zhao, Melissa L. Woodward, Xiaojing Li, Yanping Zhu, et al. 2014. 'Pharmacological Inhibition of O-GlcNAcase (OGA) Prevents Cognitive Decline and Amyloid Plaque Formation in Bigenic Tau/APP Mutant Mice'. *Molecular Neurodegeneration* 9 (October): 42. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-42>.
- Zachara, N. 2004. 'O-GlcNAc a Sensor of Cellular State: The Role of Nucleocytoplasmic Glycosylation in Modulating Cellular Function in Response to Nutrition and Stress'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1673 (1–2): 13–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2004.03.016>.
- Zachara, Natasha E., and Gerald W. Hart. 2006. 'Cell Signaling, the Essential Role of O-GlcNAc!'. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761 (5–6): 599–617. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.04.007>.
- Zachara, Natasha E., Keith Vosseller, and Gerald W. Hart. 2011. 'Detection and Analysis of Proteins Modified by O-Linked N -Acetylglucosamine'. *Current Protocols in Molecular Biology* 95 (1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1706s95>.
- Zachara, Natasha Elizabeth, Win Den Cheung, and Gerald Warren Hart. 2004. 'Nucleocytoplasmic Glycosylation, O-GlcNAc: Identification and Site Mapping'. In *Signal Transduction Protocols*, by Robert C. Dickson and Michael D. Mendenhall, 284:175–94. New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-816-1:175>.
- Zanetta, J.-P., V. Gouyer, E. Maes, A. Pons, B. Hemon, A. Zweibaum, P. Delannoy, and G. Huet. 2000. 'Massive in Vitro Synthesis of Tagged Oligosaccharides in 1-Benzyl-2-Acetamido-2-Deoxy- -D-Galactopyranoside Treated HT-29 Cells'. *Glycobiology* 10 (6): 565–75. <https://doi.org/10.1093/glycob/10.6.565>.
- Zhang, Hong, Guixian Gao, and Ulf T. Brunk. 1992. 'Extracellular Reduction of Alloxan Results in Oxygen Radical-Mediated Attack on Plasma and Lysosomal Membranes'. *APMIS* 100 (1–6): 317–25. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1992.tb00878.x>.
- Zhang, Zhen, Ee Phie Tan, Nicole J. VandenHull, Kenneth R. Peterson, and Chad Slawson. 2014. 'O-GlcNAcase Expression Is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis'. *Frontiers in Endocrinology* 5: 206. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00206>.
- Zhao, Lin, Zhihui Feng, Xiaoyong Yang, and Jiankang Liu. 2016. 'The Regulatory Roles of O -GlcNAcylation in Mitochondrial Homeostasis and Metabolic Syndrome'. *Free Radical Research* 50 (10): 1080–88. <https://doi.org/10.1080/10715762.2016.1239017>.
- Zhou, Jianxin, John L. Neidigh, Rafael Espinosa, Michelle M. LeBeau, and Donald A. McClain. 1995. 'Human Glutamine: Fructose-6-Phosphate Amidotransferase: Characterization of MRNA and Chromosomal Assignment to 2p13'. *Human Genetics* 96 (1): 99–101. <https://doi.org/10.1007/BF00214194>.
- Zhu, W. 2001. 'Cytoplasmic O-Glycosylation Prevents Cell Surface Transport of E-Cadherin during Apoptosis'. *The EMBO Journal* 20 (21): 5999–6007. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5999>.
- Zhu, Wei-Zhong, Danny El-Nachef, Xiulan Yang, Dolena Ledee, and Aaron K. Olson. 2019. 'O-GlcNAc Transferase Promotes Compensated Cardiac Function and Protein Kinase A O-GlcNAcylation During Early and Established Pathological Hypertrophy From Pressure Overload'. *Journal of the American Heart Association* 8 (11). <https://doi.org/10.1161/JAHA.118.011260>.
- Zhu, Yanping, Xiaoyang Shan, Scott A. Yuzwa, and David J. Vocadlo. 2014. 'The Emerging Link between O-GlcNAc and Alzheimer Disease'. *The Journal of Biological Chemistry* 289 (50): 34472–81. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.601351>.
- Zielonka, Jacek, Joy Joseph, Adam Sikora, Micael Hardy, Olivier Ouari, Jeannette Vasquez-Vivar, Gang Cheng, Marcos Lopez, and Balaraman Kalyanaraman. 2017. 'Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-

Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications'. *Chemical Reviews* 117 (15): 10043–120. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00042>.

Zou, Luyun, Shaolong Yang, Shunhua Hu, Irshad H. Chaudry, Richard B. Marchase, and John C. Chatham. 2007. 'THE PROTECTIVE EFFECTS OF PUGNAC ON CARDIAC FUNCTION AFTER TRAUMA-HEMORRHAGE ARE MEDIATED VIA INCREASED PROTEIN O-GlcNAc LEVELS'. *Shock* 27 (4): 402–8. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000245031.31859.29>.

X) Annexes

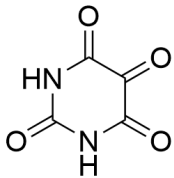
A) Annexe 1 : Tableau des inhibiteurs de l'enzyme GFAT

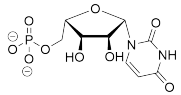
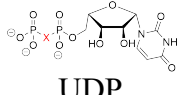
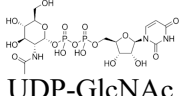
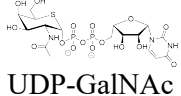
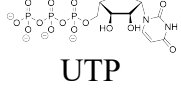
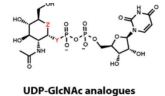
Tableau 5 : Résumé des molécules inhibitrices de l'enzyme GFAT

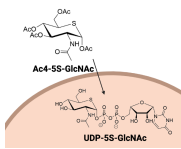
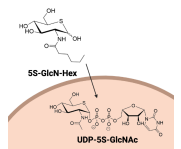
Molécules	Forces	Faiblesses	Références
DON Azasérine	Activité anti- néoplasique	Faible sélectivité Effets hors cible	(Cervantes-Madrid, Romero, and Dueñas- González 2015)
Dérivés d'isoquinoléine (RO0509347)	Puissant (CI50 = 1 µM) Réversible	Peu d'impact sur la O- GlcNAcylation des protéines	(Qian et al. 2011) (Walter et al. 2020)

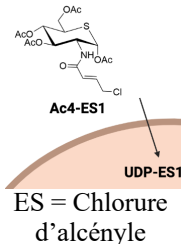
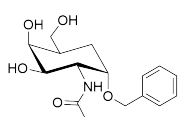
B) Annexe 2 : Tableau des inhibiteurs de l'enzyme OGT

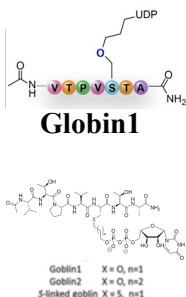
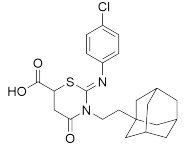
Tableau 6 : Résumé des molécules inhibitrices de l'enzyme OGT

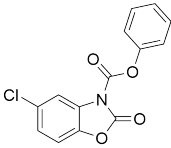
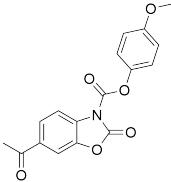
Composés	Structure chimique	Caractéristiques pharmacologiques	Forces	Faiblesses
<i>Analogue de l'Uracile</i> Alloxane		CI50 = 18 µM (H. Zhang, Gao, and Brunk 1992; Ferron, Denis, et al. 2019)	Internalisation par le transporteur GLUT2 des cellules β pancréatiques (Dorfmueller et al. 2011) <u>Double mécanisme inhibition :</u> 1) Compétition avec l'UDP-GlcNAc sur le site actif (Dorfmueller et al. 2011) 2) Oxydation un groupement thiol de la cystéine de l'enzyme OGT (Konrad et al. 2002)	Effets toxiques : génération de ROS (Marin et al. 2011; Lenzen 2008; Trapannone, Rafie, and van Aalten 2016) Instabilité à pH physiologique Demi-vie très courte (1,5 min) (H. Zhang, Gao, and Brunk 1992; Ferron, Denis, et al. 2019) Manque de sélectivité pour l'enzyme OGT (autres cibles : glucokinases dans les cellules β pancréatiques (H. Zhang, Gao, and Brunk 1992) et OGA (Lee et al. 2006))
<i>Dérivés de</i>		UDP :	<u>À fortes concentrations</u>	UDP est un substrat

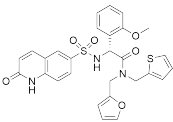
<i>l'Uracile</i> UMP UDP C-UDP UDP-GlcNAc UDP-GalNAc UTP	 UMP  UDP (X = O) C-UDP (X = C)  UDP-GlcNAc  UDP-GalNAc  UTP	CI50 = 1,8 μM C-UDP : CI50 = 9 μM (Dorfmueller et al. 2011)	<u>(200 nM)</u> : - UDP, UDP-GlcNAc et UTP sont de puissants inhibiteurs - UMP et UDP-GalNAc sont 100 fois moins puissants (Haltiwanger, Blomberg, and Hart 1992). UDP occupe une poche dans le domaine catalytique II à proximité du domaine catalytique I (Lazarus et al. 2011).	pour les autres glycosyltransférases UDP n'est pas internalisé par les cellules
<i>Analogue de l'UDP</i> UDP-5S-GlcNAc UDP-S-GlcNAc UDP-C-GlcNAc	 UDP-GlcNAc analogues UDP-5S-GlcNAc (Y = O, Z = S) UDP-S-GlcNAc (Y = S, Z = O) UDP-C-GlcNAc (Y = C, Z = O)	UDP-S-GlcNAc : CI50 (hOGT) = 93 μM UDP-C-GlcNAc : CI50 (hOGT) = 41 μM (Dorfmueller et al. 2011) UDP-5S-GlcNAc : CI50 = 11 μM	UDP-S-GlcNAc, UDP-C-GlcNAc et UDP-5S-GlcNAc sont non hydrolysables (oxygène anomérique de l'UDP-GlcNAc est remplacé par un atome de soufre ou une fonction méthylène) UDP-C-GlcNAc est un inhibiteur faible de hOGT (Hajduch et al. 2008)	UDP-S-GlcNAc et UDP-C-GlcNAc ne sont pas internalisés dans les cellules. Épimérisation de l'UDP-5S-GlcNAc en l'UDP-5S-GalNAc. UDP-5S-GalNAc est utilisé par les glycosyltransférases cellulaires. Manque de sélectivité. Diminution des lectines (érythroagglutinine de <i>Phaseolus vulgaris</i>, agglutinine de <i>Lens culinaris</i> ou Jacanlin) (Ortiz-Meoz et al. 2015)

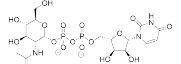
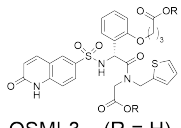
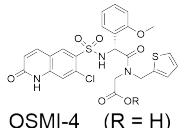
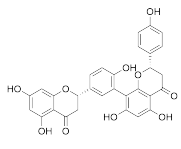
Ac4-5S-GlcNAc		Ac4-5S-GlcNAc : CE50 = 5 μM	Découverte en 2011 (Gloster et al. 2011) Internalisation dans les cellules Ac4-5S-GlcNAc détourne la VBH vers la production UDP-5S-GlcNAc Le précurseur 5S-GlcNAc n'inhibe pas l'OGT Effet temps et dose dépend sur les cellules COS7 (fibroblastes de singe), hépatocytes, neurones et lignées cellulaires utilisés en cancérologie. <u>Etude rétinopathie diabétique</u> : Modulation de la O-GlcNAcylation du facteur de transcription Sp1 régulant négativement la transcription du facteur pro-angiogénique du facteur de croissance endothéliale vasculaire A (VEGF-A) impliqué dans la vascularisation de la rétine (Donovan et al. 2014) <u>Etude rôle de l'OGT dans la réponse à l'insuline</u> : O-GlcNAcylation impacte les cascades de signalisation insulino-dépendantes (Perez-Cervera et al. 2013) au sein des radeaux lipidiques. Étude de l'apoptose (Z. Ma, Voadlo, and Vosseller 2013).	Manque de sélectivité (inhibition des autres glycosyltransférases, N-glycosylation et la synthèse des glycanes) (Ortiz-Meoz et al. 2015) Absence d'étude <i>in vivo</i> d'efficacité et de sécurité Hydrosolubilité limitée
5S-GlcN-Hex (2-Désoxy-2-N-hexanamide-5-thio-D-glucose)			Internalisation de la molécule dans les cellules : phosphorylée par GlcNAc kinase (GNK) puis désacétylée par N-acétylglucosamine-6-phosphate-N-acétylase (NAGA) qui produit 2-amino-2-désoxy-	

pyranose)			5-thioglucopyranose-6-phosphate. Le 2-amino-2-désoxy-5-thioglucopyranose-6-phosphate entre dans la VHB et entraîne la synthèse UDP-5S-GlcNAc. Meilleure hydrosolubilité grâce au substituant N-hexanoyle hydrophobe (balance entre la lipophilie et hydrophilie) Effet dose et temps dépendant <i>in vivo</i> <u>Etudes :</u> Réduction des niveaux d'expression du facteur de transcription Sp1 et de la leptine par le traitement (T.-W. Liu et al. 2018)	
Analogue de l'UDP-5S-GlcNAc Ac4-ES1	 ES = Chlorure d'alcényle	Efficacité d'inhibition (kinact/Ki) = 0,06 $\mu\text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$ (Worth et al. 2019).	Internalisation dans les cellules Ac4-ES1 est peracétylé et converti en UDP-ES1 en intracellulaire (IC) Inhibition compétitive et irréversible : le groupement ES1 cible le domaine catalytique II et liaison covalente de l'UDP-ES1 avec la cystéine 917 du site actif de la hOGT Faible impact sur les lectines (meilleure sélectivité) Activité la plus puissante envers hOGT (Worth et al. 2019).	
Dérivé de GalNAc BADGP			Internalisation dans les cellules <u>Etudes dans le diabète :</u>	Manque de sélectivité et nombreux effets hors cible : - Action mimétique de la GalNAc-α-1-O-

(Benzyl-2-acetimido-2-alpha-D-galactopynoside)			Réduction des effets toxiques induits par l'augmentation de la O-GlcNAcylation des cellules dans un contexte d'hyperglycémie (James et al. 2002; Pantaleon et al. 2010; Frank et al. 2014)	sérine/théonine. Le BADGP est converti en IC en un dissaccharide (Gal-β1-3GalNAc-α-O-benzyl) (Patsos et al. 2009) ; - Inhibition de la O-glycosylation dans différentes lignées cellulaires par blocage compétitif de la β-1,3-galactosyltransférase (Hennebicq-Reig et al. 1998; Zanetta et al. 2000; Delacour et al. 2003; Kang et al. 2008) ; - Affecte le transfert de l'acide sialique sur les glycanes des mucines. Déclète dans les mécanismes de défense de l'organisme contre les pathogènes (Delannoy et al. 1996; Varki et al. 2009). Mécanisme d'action non élucidé
Inhibiteurs bisubstrats Globin 1 Globin 2 S-Globin	 Globin 1 CI50 > 8 μM Globin 2 CI50 = 40 μM (Borodkin et al. 2014) S-Globin CI50 = 2 μM (Rafie et al. 2018)	Globin 1 CI50 > 8 μM Globin 2 CI50 = 40 μM (Borodkin et al. 2014) S-Globin CI50 = 2 μM (Rafie et al. 2018)	Meilleure sélectivité : Inhibition de l'enzyme et du peptide substrat (Borodkin et al. 2014). Amélioration de la puissance de la molécule avec le S-Globin Etude d'un orthologue OGT du <i>Trichoplax adhaerens in vitro</i> (Selvan et al. 2015)	Structure complexe (taille importante et nature ionique) : UDP est ancrée à la chaîne latérale de la sérine d'un peptide VTPVSTA. Difficulté d'internalisation des molécules : absence d'utilisation dans les modèles <i>in vivo</i>.
Criblage à haut débit ST045849 (3-(2-adamantanylethyl)-2-[(4-		CI50 (ncOGT) = 30 μM CI50 (sOGT) = 53 μM (Gross, Kraybill, and Walker 2005)	Inhibition compétitive Internalisation dans les cellules Compétition avec la liaison de l'UDP-GlcNAc Etude sur l'insuline :	

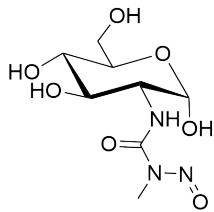
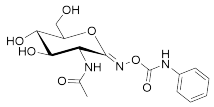
<i>chlorophenyl)-4-oxo-1,3-thiazaperhydroine-6-carboxylic acid)</i>			Réduction de la production d'insuline par le traitement (Filhoulaud, Guillemain, and Scharfmann 2009) Étude sur la stabilité des protéines (Suh et al. 2014). Étude du dysfonctionnement vasculaire associé à l'hypertension (Lima et al. 2010).	
<i>Criblage à haut débit</i> ST060266 ou BZX1 <i>(4-methoxyphenyl-6-acetyl-2-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazole-3-carboxylate)</i>		CI50 (ncOGT) = 10 μM CI50 (sOGT) = 27 μM	Internalisation dans les cellules Inhibition compétitive et irréversible par liaison à la Lysine 842 et Cystéine 917 en moins de 5 min (J. Jiang et al. 2011) Propriétés anti-prolifératif, anti-invasif dans le cancer (modulation du facteur de transcription FoxM1 et expression des protéines p27Kip1 et la métalloprotéinase matricielle-2 (MMP-2)) (Caldwell et al. 2010) et anti-virales.	Effets toxiques Impossibilité de l'utilisation en clinique
<i>Dérivé de Benzoxalnone</i> BZX2		CI50 < 10 μM	Internalisation dans les cellules Inhibition compétitive et irréversible Activité cellulaire augmentée par rapport au BZX1 (remplacement de l'atome de chlore par un substituant acétyle et p-méthoxy sur le cycle phényle) (J. Jiang et al. 2011) Étude sur la méiose (Dehennaut et al. 2007).	
<i>Dérivés de</i>			Inhibition compétitive	

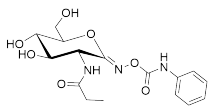
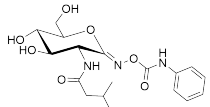
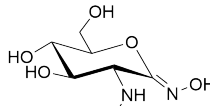
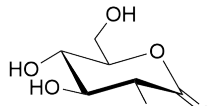
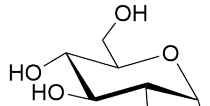
quinolinone-6-sulfonamide (Q6S)			Internalisation des dérivés dans les cellules (Ortiz-Meoz et al. 2015; S. E. S. Martin et al. 2018). Le groupement Q6S mime le groupement Uridine de l'UDP-GlcNAc et interagit avec Arginine 904, Alanine 896, Lysine 898) et liaison pi-stacking (Histidine 901) (S. E. S. Martin et al. 2018). Amélioration de la stabilité de l'inhibiteur	
OSMI-1 ((R)-N-(Furan-2-ylméthyl)-2-(2-méthoxyphényl)-2-(2-oxo-1,2-di hydroquinoline-6-sulfonamido)-N-(thiophen-2-ylméthyl) acétamide)	 Structure chimique : Noyau Q6S accolé à un groupement phénylglycine.	CI50 (ncOGT) = 2,7 μM (Ortiz-Meoz et al. 2015) E_{max} = 50 μM	Internalisation dans les cellules Inhibition compétitive Effet temps et concentration-dépendante dans les lignées cellulaires CHO (ovaires de hamster chinois) (Ortiz-Meoz et al. 2015) Effet temps dépendant : - Réduction importante de la O-GlcNAcylation globale des protéines après 2 heures de traitement (Ortiz-Meoz et al. 2015) - Réduction de l'expression de l'enzyme OGA Sélective sans perturbation des glycanes extracellulaires (Ortiz-Meoz et al. 2015) Etude de la réplication du virus de herpès simplex (HSV) (Angelova et al. 2015) Etude dans le cancer du sein triple-négative (Barkovskaya et al. 2019).	Faible hydrosolubilité (soluble dans le DMSO) Structure chimique complexe

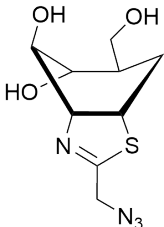
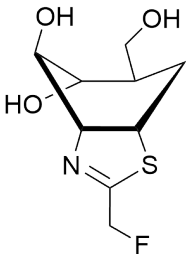
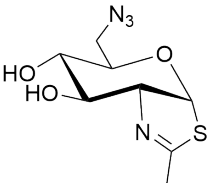
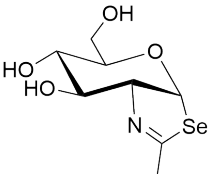
OSMI-2	 OSMI-2 (R = H) OSMI-2e (R = Me)	K_d = 140 nM (S. E. S. Martin et al. 2018)	Inhibition compétitive (en forme de U permet aux substituants amides de remplir l'espace au-dessus de la quinolinone et d'occuper entièrement un espace qui accueille l'Uridine et le segment peptidique au-dessus)	Internalisation dans les cellules sous forme estérifiée
OSMI-3	 OSMI-3 (R = H) OSMI-3e (R = Et)	K_d = 5 nM (S. E. S. Martin et al. 2018)	Inhibition compétitive	Internalisation dans les cellules sous forme estérifiée
OSMI-4	 OSMI-4 (R = H) OSMI-4e (R = Et)	OSMI-4 K_d = 8 nM OSMI-4e CE50 = 3 µM (S. E. S. Martin et al. 2018)	Inhibition compétitive	Internalisation dans les cellules sous forme estérifiée
<i>Criblage virtuel à haut débit</i> L01 <i>(2,3,2'',3''-tétrahydroa mentoflavone)</i>		CI50 (hOGT) = 21,8 µM <i>in vitro</i> (Y. Liu et al. 2017)	Produit naturel dérivé des biflavonoïdes (dérivé d'amentoflavone) Inhibition compétitive (en forme U) Meilleure fixation au site actif de l'enzyme que les dérivés Q6S (liaisons hydrogènes avec les résidus Lysine 842, Histidine 920, Thréonine 922 et une liaison supplémentaire Asparagine 557 qui n'est présente que lorsque l'UDP se lie au site actif) Sélective (impact faible sur les glycanes extracellulaires) Effets anti-inflammatoires (Selvam and Jachak 2004) et anti-fongiques (Jung et al. 2006) et anti-tumoraux (Pei et al. 2012)	Toxicité faible dans les modèles cellulaires et de Zebra-Fish

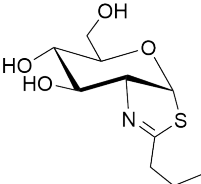
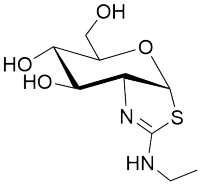
C) Annexe 3 : Tableau des inhibiteurs de l'enzyme OGA

Tableau 7 : Résumé des molécules inhibitrices de l'enzyme OGA

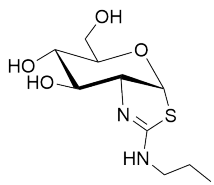
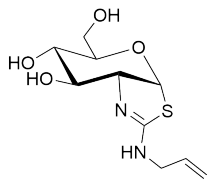
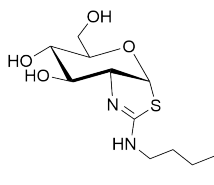
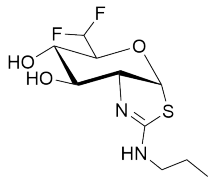
Composés	Structure chimique	Caractéristiques pharmacologiques (CI50 / CE50 / Ki)	Forces	Faiblesses
Inhibiteurs dérivés d'hydrates de carbone				
Dérivé de N-méthyl-N-nitrosouréido-D-glucosamine Streptozotocine	 Motif deoxyglucose lié à un motif N-méthyl-N-nitrosourée	CI50 (CpOGA) = 64 µM (Rao et al. 2006) Ki = 1,5 mM	Origine : <i>Streptomyces achromogenes</i> Induction du modèles animaux pour diabète de type 1 (destruction des îlots pancréatiques) Internalisation par le transporteur GLUT2 des cellules β pancréatiques (Schnedl et al. 1994) Inhibition irréversible sans preuve du mécanisme d'action (Konrad et al. 2001; K. Liu et al. 2002)	Manque de sélectivité (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 30) Toxicité cellulaire (alkylation de l'ADN) (Junod et al. 1967; Mansford and Opie 1968; Bennett and Pegg 1981; Kröncke et al. 1995) Pas adapté pour l'étude de la O-GlcNAcylation : Aucun mode de liaison au site actif n'a été montré sur CpOGA (Pathak et al. 2008) ou BtOGA (Konrad et al. 2001)
Dérivé du glyconohydroximolactone PUGNAc [2 α, O-(2-acéto-2-désoxy-d-glucopyrano-2-sylidène) amino-N-phényl carbamate]		CI50 (CpOGA) = 8,6 nM (Rao et al. 2006) CE50 = 3 µM Ki (hOGA) = 46 nM	Premier inhibiteur OGA développé Inhibition compétitive (dix liaisons hydrogènes à une poche présente à la surface de l'enzyme et la partie phényl-carbamate est dirigé vers le solvant). Le PUGNAc miment partiellement l'état de transition de l'enzyme OGA. Étude sur l'insuline : Désensibilisation et	Manque de sélectivité important (Sélectivité < 1) Effets hors cibles sur les hexosaminidases (HEXA et HEXB de la famille GH20 (Beer et al. 1990), GH3 (Qin et al. 2015; L. Dong et al. 2019) et α-N-acétylglucosaminidase de la famille 89 (Ficko-Blean et al. 2008)) Absence de passage de la BHE (Zou et al. 2007).

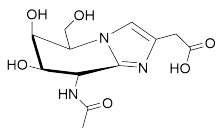
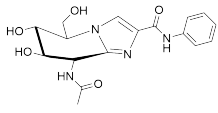
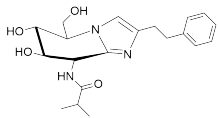
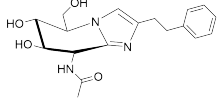
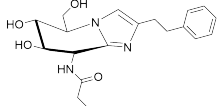
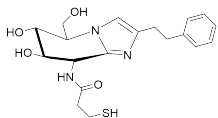
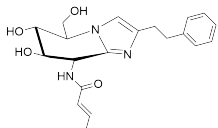
			résistance des adipocytes de rat à l'insuline après traitement (Park, Ryu, and Lee 2005). Etude traumatisme hémorragique : amélioration de la fonction cardiaque, perfusion des organes et diminution de l'inflammation (Zou et al. 2007).	
PUGNAc linéaire		Ki (hOGA) = 40 nM (Eun Ju Kim, Perreira, et al. 2006; Stubbs, Zhang, and Vocadlo 2006)	Meilleure sélectivité (Ki (hOGA)/Ki (HEX) = 6) que le PUGNAc	
PUGNAc isopentamide		Ki (hOGA) = 190 nM (Eun Ju Kim, Perreira, et al. 2006; Stubbs, Zhang, and Vocadlo 2006)	Meilleure sélectivité (Ki (hOGA)/Ki (HEX) > 6) que le PUGNAc	
<i>Dérivé de lactone oxime</i> LOGNAc		Ki (OGA rat) = 1,7 μM (D. L. Dong and Hart 1994) Ki (BtOGA) = 2 μM (He et al. 2011)		Manque de mimétisme du substrat UDP-GlcNAc et perte de l'état de transition pour l'enzyme OGA lors de l'interaction avec l'inhibiteur.
<i>Dérivé de Gluconolactam</i>		Ki (BtOGA) = 24 μM (He et al. 2011)		Manque de mimétisme du substrat ainsi qu'une perte de l'état de transition pour l'enzyme OGA lors de l'interaction avec l'inhibiteur.
NAG-Thiazoline <i>(1,2-didéoxy-2'-méthyl-α-D-glucopyrano-[2,1-d]-δ2'-thiazoline)</i>		Ki (hOGA) = 70 nM (Macauley et al. 2005)	Mode de liaison à la BtOGA : -NAG-Thiazoline ressemble fortement à l'intermédiaire oxazolinium (Whitworth et al. 2007) ; - trois hydroxyles en C3, C4 et C6 sur le cycle pyranose participent aux	Manque de sélectivité (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 1) Effets hors cible : inhibition des HexB (Mark et al. 2003) et HexA humains (Lemieux et al. 2006).

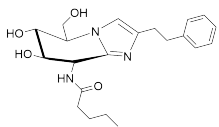
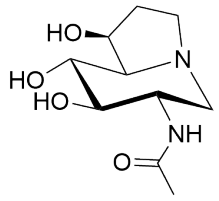
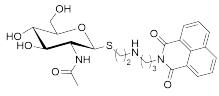
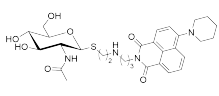
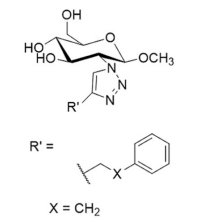
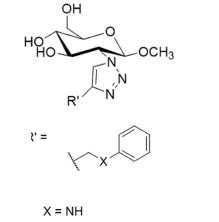
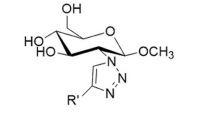
			liaisons avec les résidus à la surface de la BtOGA et avec l'azote de la thiazoline se liant à l'Aspartate 242 sur le domaine catalytique (Dennis et al. 2006).	
<i>Dérivé du NAG-Thiazoline</i>			Conformation bateau Sélectivité augmentée (K_i (OGA)/ K_i (HEX) = 82)	
<i>Dérivé du NAG-Thiazoline</i>			Conformation bateau Sélectivité augmentée (K_i (OGA)/ K_i (HEX) > 20)	
C6-azido-NGT		K_i (hOGA) = 19,3 nM	Inhibition des enzymes GH20 et GH84 dont l'enzyme OGA humaine est modérée (Krejzová et al. 2014)	
GlcNAc-sélénazoline		K_i (hOGA) = 0,7 nM	<u>Étude sur l'insuline :</u> Réduction de la translocation du glucose par GLUT4 dans les adipocytes 3T3 différenciés en lien avec un encombrement stérique dans le site actif de l'enzyme (Eun Ju Kim et al. 2010).	Faible inhibition pour l'activité enzymatique de OGA

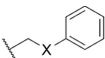
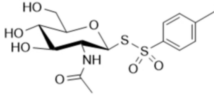
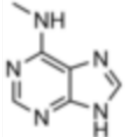
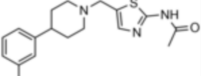
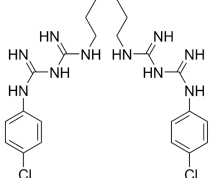
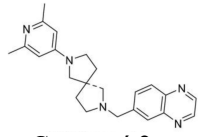
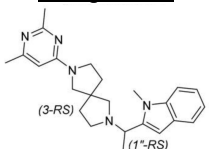
NButGT <i>(1,2- dideoxy-2'-propyl-α- D-glucopyransO-(2,1-d)-Delta2'-thiazoline)</i>		CI50 = 8 μM Ki (hOGA) = 230 nM Ki (HEX)/Ki(hOGA) = 1,500	Inhibition compétitive : le cycle thiazoline interagit avec une poche hydrophobe du site actif de l'enzyme. Cette poche permet d'accueillir des substituants volumineux et absent des enzymes GH20. Sélectivité améliorée (Ki (OGA)/ Ki (HEX) = 1,500) Absence de toxicité cellulaire (Macauley and Vocadlo 2010) <u>Étude sur l'insuline</u> : absence de résistance à l'insuline dans les adipocytes (Macauley et al. 2008) et aucune augmentation des niveaux de ganglioside GM2 dans les lysosomes neuronaux (Stubbs, Macauley, and Vocadlo 2009) Etude dans la maladie d'Alzheimer (C. Kim et al. 2013) et les chocs septiques avec une amélioration de la mortalité des animaux (Ferron, Cadiet, et al. 2019)	Manque de stabilité en solution (demi-clairance de 30 min) (Ferron, Denis, et al. 2019) pKa = 3,4 (Yuzwa et al. 2008) : NButGT est principalement sous forme déprotonée à pH physiologique → Incapacité de formation d'une interaction ionique favorable avec l'Aspartate 174 du site catalytique de l'enzyme.
Thiamet G <i>[(3aR,5R,6S,7R,7aR)-2-ethylamino-3a,6,7,7a-tetrahydro-5-(hydroxymethyl)-5H-pyrano(3,2-</i>		Ki (hOGA) = 21 nM CE50 = 30 nM (Macauley and Vocadlo 2010)	Amélioration de la stabilité de la molécule : remplacement par un groupement amino favorise la protonation et l'interaction du Thiamet G avec le site actif en augmentant la basicité de l'azote de	Perméabilité apparente inférieure aux limites de détection du test MDR1-LLC-PK1 (Papp < 1.10⁻⁶ cm/s) → passage membranaire faible et lente

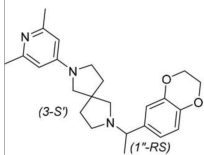
<i>d)thiazole-6,7-diol]</i>			l'endocycle. L'amine exocyclique permet une légère contraction du site actif. Inhibition compétitive et irréversible Affinité de liaison 30 fois supérieure par le Thiamet G par rapport au NButGT (Yuzwa et al. 2008) Sélectivité importante pour OGA (K_i hOGA/K_i HEX) = 37 000) (Yuzwa et al. 2008) Étude dans les troubles neurologiques : maladie d'Alzheimer avec agrégation de la protéine Tau (Yu et al. 2012; Borghgraef et al. 2013; Graham et al. 2014) et dépôt de plaques β-amyloïdes (C. Kim et al. 2013; Yuzwa et al. 2014). Etude de différenciation chondrogénique (Andrés-Bergós et al. 2012) et de cancérologie (Ding et al. 2014). Données pharmacocinétiques chez le rat : demi-vie de 1,4 h, volume distribution et biodisponibilité faible.	Une surface polaire typologique (TPSA) élevée (105 Å²)
------------------------------------	--	--	---	--

<i>Dérivé 1</i> <i>ThiamEt G</i>		Ki (hOGA) = 2 nM (mesurée par la méthode de Morrison)	Dérivé du Thiamet G : n-propyle. Sélectivité très importante (Ki hOGA/Ki HEX = 1 850 000)	
<i>Dérivé 2</i> <i>Thiamet G</i>		Ki (hOGA) = 3,2 nM (mesurée par la méthode de Morrison)	Dérivé du Thiamet G : n-allyle. Sélectivité très importante (Ki hOGA/Ki HEX = 950 000)	
<i>Dérivé 3</i> <i>Thiamet G</i>		Ki (hOGA) = 350 nM	Dérivé du Thiamet G : n-butyle. Sélectivité importante (Ki hOGA/Ki HEX = 13 700)	
MK-8719 (3aR,5S,6S,7R,7aR)-5-(di fluorométhyl)-2-(éthylamino)-3a,6,7,7a-tétrahydro-5H-pyrano[3,2-d]thiazole-6,7-diol		Ki (hOGA) = 7,9 nM EC50 = 72,4 nM	Inhibition compétitive : le groupement difluorométhyle améliore l'ancrage au site actif de l'enzyme Sélectivité importante (Ki (OGA)/ Ki (HEX) > 10 000) grâce au groupement N-éthyle Données pharmacocinétiques et pharmacodynamiques disponibles au niveau cérébral chez le rat (Selnick et al. 2019) Essai clinique de phase I chez l'Homme dans le traitement des tauopathies (Selnick et al. 2019; X. Wang et al. 2020).	Diminution de la surface polaire (TPSA = 80 Å²) Meilleure perméabilité apparente (Papp = 6,4.10⁻⁶ cm/s)

NAGstatine		Ki (OGA porc) = 4 nM (Aoyagi et al. 1992) Ki (hOGA) = 420 nM (Shanmugasundaram et al. 2006)	Origine naturelle à partir du <i>Streptomyces amakuaebsis</i>	Faible sélectivité (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 0,25)
Hybride PUGNAc-Imidazole		Ki (hOGA) = 3,8 nM (Shanmugasundaram et al. 2006)	Amélioration de l'activité inhibitrice : ajout d'un groupement phénylcarbamoyl	Orientation défavorable de la molécule sur le site actif de l'enzyme BtOGA
GlcNAc statine C		Ki (CpOGA) = 4,6 pM Ki (hOGA) = 4,4 nM	Amélioration de la structure chimique par un groupement N-isobutanoyl (Dorfmueller et al. 2006) Puissante activité inhibitrice	Sélectivité modérée (Ki (OGA)/Ki (HEX) > 164) CE50 légèrement inférieure à celle du PUGNAc
GlcNAc statine B		Ki (hOGA) = 0,42 nM (Tatsuta et al. 1995; Terinek and Vasella 2005)		
GlcNAc statine D		Ki (hOGA) = 0,74 nM (Dorfmueller et al. 2006)		Faible sélectivité (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 4)
GlcNAc statine F		Ki (hOGA) = 11,2 nM	Sélectivité (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 1 000) Possibilité d'interaction avec la cystéine du site actif (Dorfmueller et al. 2006)	
GlcNAc statine G		Ki (hOGA) = 4,1 nM	Sélectivité importante (Ki (OGA)/Ki (HEX) > 900 000) Possibilité d'interaction avec la cystéine du site actif (Dorfmueller et al. 2006)	

GlcNAc statine H		Ki (hOGA) = 2,6 nM (Dorfmueller et al. 2006)	Sélectivité importante (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 35 000)	
6-Ac-Cas (6-Acétamido-6-désoxy-castano spermine)		Ki (hOGA) = 300 nM	Inhibition compétitive Etude sur l'insuline : aucune résistance à l'insuline dans les adipocytes (Macauley and Vocadlo 2010)	Manque de sélectivité Utilisation limitée dans les différents systèmes biologiques.
Hybride Thio glycoside-Naphtalimide		Ki (OGA) = 3,8 nM	Structure chimique : ajout d'un linker de cinq à sept atomes entre les parties naphthalimide et thioglycosyle (Shen et al. 2018)	Faible sélectivité (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 8)
<i>Dérivé de l'hybride Thioglycoside-Naphtalimide</i>		Ki (hOGA) = 0,6 nM	Amélioration de la sélectivité et de la puissance : groupement de 1-piperidyl en position 4 de la fraction naphthalimide	Sélectivité modérée (Ki (OGA)/Ki (HEX) > 167)
<i>Dérivés 1,2,3-Triazole</i>	 R' =  X = CH ₂	CI50 = 0,50 μM (Igual et al. 2019)	Amélioration de la rigidité et stabilité de la molécule Sélectivité importante (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 1 100)	
<i>Dérivés 1,2,3-Triazole</i>	 R' =  X = NH	CI50 = 0,52 μM (Igual et al. 2019)	Amélioration de la rigidité et stabilité de la molécule Sélectivité importante (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 1 094)	
<i>Dérivés 1,2,3-Triazole</i>	 R' = 	CI50 = 0,72 μM (Igual et al. 2019)	Amélioration de la rigidité et stabilité de la molécule Sélectivité (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 793)	

	$R' =$  $X = O$			
α-GlcNAc Thiosulfate		Ki (sOGA) = 10 nM	Inhibition compétitive puissante : groupement thiosulfate permet la formation d'une liaison covalente du disulfure avec la cystéine 878 dans le domaine pseudo-HAT (Eun J. Kim et al. 2007).	Faible sélectivité (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 4)
Inhibiteurs non dérivés d'hydrates de carbone				
N6-méthyladénine		CI50 (hOGA) = 4 μ M (Dorfmueller and van Aalten 2010)		Sélectivité modérée (Ki (OGA)/Ki (HEX) = 75)
<i>Dérivés de thiazoles 2,5-disubstitués non glucidiques</i>	 R = H ou CH ₃	CI50 (hOGA) = 0,2 μ M (Abdel-Magid 2014)	Sélectivité (Ki (OGA)/Ki (HEX) > 200)	
Chlorhexidine		Ki = 4 μ M (L. Dong et al. 2019)	Sélectivité supérieure à 200 fois plus importante pour l'hOGA par rapport à l'HexB	
<i>Dérivés spiro-pipéridines et spiro-pyrrolidines bicycliques</i>	<u>Composé 1 :</u>  <u>Composé 2 :</u> 	Composé 1 : CI50 (hOGA) = 4 μM CE50 < 5 Composé 2 : CI50 (hOGA) = 5,58 pM	Etude dans les pathologies neurodégénératives (Rosse 2019).	

	<u>Composé 3 :</u> 	Composé 3 : CI50 = 6,74 μM CE50 < 6 (Bartolomé-Nebreda et al. 2021; Rosse 2019)		
--	---	--	--	--

Nom – Prénoms : BETUS Charlotte Rachel Dominique

Titre de la thèse : Intérêts thérapeutiques de la modulation des niveaux de O-GlcNAcylation

Résumé de la thèse :

La O-GlcNAcylation (O-GlcNAc) est une modification post-traductionnelle des protéines, ubiquitaire et très conservée au cours de l'évolution. La O-GlcNAc est impliquée dans la réponse au stress et régulée par deux enzymes seulement. Le motif GlcNAc est respectivement ajouté et retiré par la O-GlcNAc Transférase (OGT) et la O-GlcNAcase (OGA). Ces particularités font que la O-GlcNAcylation a été très difficile à étudier jusqu'à maintenant, mais les outils pharmacologiques ont été privilégiés. La molécule de Thiamet G, inhibiteur de l'enzyme OGA, est l'une des molécules les plus puissantes et efficaces. À ce jour, plus de 5 000 protéines O-GlcNAcylées ont été identifiées. La stimulation aiguë des niveaux de O-GlcNAcylation s'est avérée cardioprotectrice dans les pathologies aiguës tels que le choc septique et hémorragique. L'étude des protéines cardiaques O-GlcNAcylées par O-GlcNAcylo-mique a permis de mettre en évidence qu'un tiers des protéines identifiées sont mitochondriales. Il serait donc intéressant de cibler spécifiquement ces protéines. Par exemple, Acétyl-CoA Synthétase 1 (ACSS1) est impliquée dans la synthèse d'Acétyl-CoA à partir de l'acétate et des acides gras à chaîne courte dans la mitochondrie. Un nouvel inhibiteur de l'OGA mito-ciblé, le TPP-Thiamet G, a été développé pour cibler spécifiquement les protéines mitochondriales. Le TPP-Thiamet G semble favoriser l'expression de ACSS1 de manière concentration dépendante. La modulation du métabolisme énergétique cardiaque spécifiquement dans la mitochondrie pourrait être une cible bénéfique dans les pathologies aiguës et devrait être évaluée.

MOTS CLÉS

O-GLCNAcylation, MITOCHONDRIE, O-GLCNAcase, THIAMET G, ACSS1

JURY

Présidente : **Dr Christine Bobin-Dubigeon**, Maître de Conférences des Universités de Pharmacologie

Directrice : **Dr Edith Bigot-Corbel**, Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier de Biochimie clinique

Membres du jury : **Dr Benjamin Lauzier**, Maître de Conférences des Universités de Physiologie et Pharmacologie

Dr Cédric Logé, Maître de Conférences des Universités de Chimie Thérapeutique

Adresse de l'auteur :

Charlotte Betus
8bis rue des Noyers
72250 Parigné l'Eveque