

# THESE DE DOCTORAT

présentée à

**L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE  
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE - LILLE NORD DE FRANCE**

Pour l'obtention du titre de

**Docteur de l'Université de Lille**

par

**Aurélie CAZET**

## **Effet de l'expression de la G<sub>D3</sub> synthétase sur la progression et l'agressivité du cancer du sein**

Soutenue le 8 décembre 2010 devant la commission d'examen :

Président :	Pr. Xuefen LE BOURHIS	Université de Lille 1, INSERM U908
Rapporteurs :	Pr. Marc MAREEL	Ghent University Hospital
	Pr. Jacques PORTOUKALIAN	Université Lyon 1, Hôpital Herriot
Membres:	Dr. Joy BURCHELL	Guy's Hospital, London
	Dr. David TULASNE	Institut de Biologie de Lille, CNRS 8161
Directeur :	Pr. Philippe DELANNOY	Université de Lille 1, UMR/CNRS 8576



## REMERCIEMENTS

Philippe, je tiens tout d'abord à vous remercier de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire. Je suis consciente de la chance que j'ai eue de réaliser mes études de doctorat sous votre direction. Peu d'étudiants peuvent en effet se vanter d'avoir pu acheter des anticorps hors de prix, d'avoir participé à tant de congrès et d'avoir ouvert son projet à de nombreuses collaborations nationales et internationales. Je suis reconnaissante de la confiance et de la liberté que vous m'avez accordées pour mener ce projet ambitieux. Merci d'avoir cru en moi, dès le début. Nos quatre années de collaboration, d'échanges et de débats scientifiques m'auront permis d'évoluer, d'éveiller ma curiosité scientifique et de m'ouvrir encore plus sur le monde. Vous m'avez permis de réaliser que le métier de chercheur, tout aussi exigeant soit-il, est merveilleux et que nous sommes chanceux d'en faire partie. En espérant que cette fin de thèse n'est que le début d'une longue collaboration (et oui, je vais encore rester un peu « glyco » dans les années à venir !)... Sincèrement, merci pour tout.

Xuefen, je vous remercie d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse. Au cours de ces travaux, vous avez été mon regard de biologiste, indispensable pour développer un projet à tendance « cancéro » dans un monde un peu fou de glycobiochimiste/biochimiste !! Merci d'avoir pris le temps de répondre à mes questions, toujours avec enthousiasme et curiosité.

Je souhaite remercier vivement, pour l'honneur qu'ils me font, Messieurs les Professeurs Marc Mareel et Jacques Portoukalian, qui ont acceptés d'être les rapporteurs de ce travail. Un merci particulier au Professeur Jacques Portoukalian pour m'avoir donnée de si précieux anticorps anti-gangliosides et d'avoir si gentiment répondu à mes courriers électroniques ces derniers mois.

Dr Joy Burchell, I wish to thank you for reviewing this work and to take part in my jury, even though I know that you do not like glycolipids so much! Thank you for having collaborated in writing the review published in *Breast Cancer Research* and importantly, for giving this jury an international dimension.

David, je suis très heureuse que vous ayez accepté d'être un des examinateurs de mon jury de thèse. Notre collaboration fructueuse a été un réel plaisir, et m'aura permis de toucher « du bout des doigts » le monde des RTKs et plus particulièrement celui de c-Met. Je suis enchantée de votre enthousiasme pour la suite de ce travail, et c'est le cœur léger que je pars en post-doc de l'autre côté de l'Atlantique ; je pressens que ce projet a encore de beaux jours devant lui, entre des équipes pluridisciplinaires et prêtes à travailler ensemble.

Ces années de doctorat ont représenté une incroyable aventure scientifique et humaine, et restera à mes yeux une expérience très enrichissante grâce à toutes celles et ceux qui m'ont accompagnée, soutenue et supportée pendant la préparation de cette thèse.

Tout d'abord, les membres du C9 !!! Le C9 est une grande famille, dans laquelle les équipes tentent de travailler ensemble, discutent et partagent beaucoup ! C'est un énorme avantage d'évoluer dans une telle atmosphère. Par contre, pour écrire les remerciements de la thèse, quel calvaire ; la liste des personnes à remercier étant si longue !!! Pour faire vite (et c'est difficile car tout le monde connaît mon côté grande « bavarde » ; Philippe dirait que je dis trop de mots), un grand merci à :

## Remerciements

- Jean-Claude, notre grand chef du C9. Je suis honorée d'avoir pu travailler au sein de cette famille de glycobiochimistes, et je tiens à vous remercier pour votre disponibilité et votre gentillesse ambulante.

A la Delannoy's team (membres du si célèbre et populaire 017) :

- Sophie, si je devais décerner la « médaille d'or » des tuteurs, tu l'obtiendrais haut la main et sans aucune réserve ! Tu as été mon premier contact au C9, il y a maintenant 6 ans... Mes débuts de « bébé scientifique » n'auraient pas eu la même saveur sans toi. Tu as été mon mentor de paillasse, notamment en culture et biologie cellulaire. Par la suite, tu m'as toujours aidé, corrigé, tu as apporté un regard critique sur mes résultats, même si nos projets se sont un peu éloignés au cours des années. Ta motivation et ton optimisme sans faille sont une vraie bouffée d'oxygène pour le 017. Surtout, ne change rien !

- Marie-Ange, merci pour ta disponibilité, ta gentillesse, pour tes conseils en biologie moléculaire, moi qui suis si naïve dans ce domaine... Avec Sophie, vous avez été mes collègues et vous êtes aujourd'hui mes amies. Merci pour toutes nos discussions et activités « hors labo » (on exclura malheureusement le sport !!).

- Béa, ma femme lilloise. Je ferais court, tellement j'aurais de choses à te dire. Cela ressemblerait à une déclaration d'amour, et ça en choquerait plus d'un ! Tu es juste une personne exceptionnelle. Merci d'être mon amie, et de m'accepter avec mes petites qualités et mes grands défauts (si bien cachés non ? Humour, quand tu nous tiens...). J'attends ton arrivée du côté de NY, ainsi que celle de tes poulettes et de ton grand bonhomme, avec impatience en août 2011 !!

- Edwige, je ne regarderais plus jamais l'humeur des personnes qui m'entourent de la même façon. Grâce aux BG, nous détenons un des plus mémorables « fou rire » du C9, le chef doit encore s'en souvenir ! En tout cas, ton rire et ta joie de vivre m'ont énormément manqué cette dernière année au 017.

- Sylvain, espèce masculine qui a réussi à survivre entourée de 9 femelles pendant ces années de thèse. Et non, tu n'as jamais réussi à me faire jouer à la *Crazy Card Roulette*, par contre, pour tes manips, tu étais fort !! Chapeau, tu me donneras ton secret pour faire travailler mes futurs collègues pour moi ? Je suis extrêmement ravie de te retrouver sur le sol américain dans quelques mois, j'imagine de futurs week-ends de purs délires entre NY et Atlanta !!

- Anne, un grand merci pour nos discussions tardives et pour ta disponibilité cet été, notamment pour ma demande de financement EMBO. J'ai pu suivre également en quelques années ton évolution au sein du labo. Te voilà désormais porteuse d'un projet ANR ! Un pas de plus vers l'indépendance... Félicitations, et je ne doute pas que nous communiquerons à l'avenir de nos évolutions respectives.

- Anne-Marie, notre ingénieur chouchoute. Vous êtes un peu la maman des étudiants thésards du rez-de-chaussée. Merci pour votre gentillesse permanente à mon égard.

Un grand merci également à la relève :

- Marie, ma première stagiaire et 3<sup>ème</sup> membre du projet « Gras et sucre » alias  $G_{D3}$  synthétase et gangliosides. Malheureusement, je n'ai pas réussi à te convertir à la biocell, toi qui adores la discipline moléculaire. Je réalise aujourd'hui que cela a permis d'ouvrir de nouvelles voies d'investigation dans le projet, tout aussi passionnantes ! Attention, tu vas devenir la nouvelle « ancienne » du 017 ! Courage !

## *Remerciements*

- Agata, l'étudiante étrangère qui manipule l'expression « Ca m'énerve » mieux que Helmut Fritz ! J'ai eu la chance de suivre ton évolution au cours de l'année, et c'est incroyable les progrès que tu as réalisés en si peu de temps. Tu es capable de reprendre le projet lors de mon départ, je ne me fais aucun souci à ce sujet. Et tu sais qu'en cas de problème, tu pourras toujours me contacter ! Je te souhaite la meilleure des thèses.

- Florent, étudiant lyonnais perdu dans le grand Nord. Ton intégration au laboratoire s'est réalisée en douceur, puisque tu adores comme nous la bonne chaire et les bières belges ! Apprends juste à apprécier les équipes de foot du Nord, et tu pourras alors te sentir en total immersion chez nous ! Et tu verras, vivre entouré de tant de femmes au 017 est un vrai bonheur !

- Marianne, courage pour cette année de M2 Recherche. Tu auras la chance d'être bien entourée et préparée pour le fameux concours.

Un grand merci également à l'ensemble des personnes avec qui j'ai collaboré sur ce projet :

- Pr. Kim, it was a real pleasure and a great opportunity to work in your laboratory. I discovered the culture and the way of life in a Korean lab, which are completely different from my country! I would like to thank all the students and especially my friend Kyung-Min.

- Jonathan, travailler avec toi a toujours été un plaisir, et ton intérêt vif pour notre projet est si motivant ! Je te souhaite beaucoup de bonnes choses pour la suite de ta thèse.

- Sylvain, merci pour cette collaboration avec le Guy's Hospital. Tu as permis d'apporter un regard clinique à notre papier, ce qui a été bénéfique pour sa publication. Je te souhaite beaucoup de courage pour tes recherches de financement, et je croise les doigts pour toi ! Et qui sait, à l'avenir, nous travaillerons peut être sur un sujet commun «glycosylation et métastases du cancer du sein » ?

Je tiens à remercier sincèrement les membres des autres laboratoires :

- Les laboratoires « d'en face » : Tony pour ton sourire quotidien et nos discussions, François pour ton regard éclairé de jeune recrue CNRS et ton esprit critique, Dominique pour ton grand sourire et tes compliments du matin, Sandrine, Anne-Sophie et Marlène, reine de la salle de culture. Merci également aux étudiants : Stéph, une de mes collègues préférées, Lulu, que j'ai eu le plaisir de connaître ces derniers mois, Karine, ma co-équipière de course à pied, Romain, Ali et la latino-américain team, Yobana, Carlos et Socorro qui sont tout simplement des amours à la bonté sans fin.

Bien sûr mention spéciale pour ma Coco d'amour. Tout semble nous opposer : je suis relativement zen/ tu es super stressée ; j'ai tendance à grossir en condition de stress/tu maigris à vue d'œil... Et pourtant ces dernières années, nous avons vécu tellement de choses communes dans nos vies, que ce soit d'un point de vue professionnel que privé... Comme tu le dis souvent : « C'est génial, on se comprend ». Sache ma belle que même si je pars vivre à des milliers de kms de chez toi, tu pourras toujours me téléphoner et nous passerons à l'avenir de grandes heures à discuter de nos vies, j'en suis certaine....

- Les autres peuples du C9, actuels ou anciens : Merci aux étudiants, Mélanie, Lan-Yi, Matthieu, Séverine, Audrey, Adeline, Estelle, Marie-Estelle, Yoann, petit Sylvain, Vanessa et à tous les autres que j'oublie probablement. Merci pour les échanges scientifiques, et surtout pour nos moments de répits nocturnes « houblonnés » !

Nadège, Gaëlle et Yvon sans qui nous ne serions pas grand-chose, et François « homme de ménage », pour sa bonne humeur matinale et son sens de l'humour...un peu douteux !

## *Remerciements*

- Les membres du SN3 : Hubert, merci de m'avoir soutenue pour mes demandes de financements postdoctoraux ; promis, j'irai un jour en Australie ! Milles mercis aux chefs et étudiants avec lesquels j'ai pu parler au détour d'un couloir : Eric, la terreur des souris, Robert-Allain, Manue, Christophe et Ingrid ; Elsa, Chann, Sam, Yohann, Stéphan, Rod, Vaik, Elisa, Cyril et JP. Grâce à votre gentillesse et à votre convivialité, je me suis toujours sentie un peu comme chez moi à l'U908. Merci également à Christian Slomianny, pour votre patience et votre générosité.

Un clin d'œil spécial aux équipes enseignantes qui m'ont fait confiance et qui ont acceptées de me confier des enseignements pendant mes premières années de monitorat. Un grand merci à Bruno Bastide, et à mes collègues de physio : Caroline, Hélène, Slava, Nicolas, Arnaud et à Matthieu. Un gros bisou à mon apparitrice préférée Congetta.

Un immense merci à tous mes amis scientifiques et d'ailleurs, pour tous les moments de détente partagés, où mon esprit arrivait quelques peu à se détacher des gangliosides !

-Thomas, futur grand pharmacien (belge ?). J'espère que dans quelques années, tu m'aideras à rentrer chez GSK comme promis, mais pas sous ta direction (avec nos caractères, impossible de cohabiter !)

-Stéphane, le « coloc » le plus gentil du monde. Merci d'avoir supporté mes délires et mes grandes questions d'ordre philosophique « Imagine si ... tu dirais/ferais/penserais quoi ? ». Merci pour ta patience. Apprends juste à utiliser ta cuisine de rêve, et tu deviendras l'homme idéal !

- Jorge, mexican monkey lost in a factory... I will never give away your secret, I promise M...man. And keep hope, one day, you will graduate and you will find a nice post-doc; you are a great scientist.

- Mes hommes moniteurs, Rémy, Gaylor, Jean, Flo, Yo (et chanceux, tu as le droit d'être remercié 2 fois !!). Vive les soirées « Triple K » du jeudi dans le meilleur pub lillois, nos débats (un peu) trop arrosés. Je garderai un souvenir merveilleux de ma thèse et des formations CIES grâce à vous. D'énormes bisous à mon Rémy, à jamais mon deuxième homme.

- Les boulonnais, mon amoureuse, ma louloute et les autres, que j'ai un peu délaissés durant cette thèse. On se connaît depuis si longtemps, et je sais que vous n'êtes jamais très loin. Je vous attends cet été aux USA !

Je terminerai par ma famille, qui a contribué à sa manière à la bonne réalisation de ce travail et à mon équilibre au travers cette aventure. Mes grands-parents pour leur amour et leur soutien sans faille, ma « petite » sœur adorée et son Jojo, la famille Cazet/Bernard : je vous l'annonce, j'ai bientôt terminé les études ! Mon père à qui je ressemble tellement et pas seulement pour le côté blagueur, et ma moumounette, sans qui tout serait tellement plus difficile...

## **AVANT-PROPOS**

Ce travail a été effectué au sein :

- De l'Unité de « Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle » (Unité Mixte de Recherche n° 8576 du CNRS, Université Lille Nord de France, dirigée par le Docteur Jean-Claude Michalski), sous la direction du Professeur Philippe Delannoy.
- Du laboratoire « Signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein. Protéomique fonctionnelle » (INSERM U908, Université Lille Nord de France, dirigée par le Professeur Hubert Hondermarck), sous l'encadrement du Professeur Xuefen Lebourhis.
- Du laboratoire « Molecular and Cellular Glycobiology Unit » (Department of Biological Sciences, SungKyunKwan University, Suwon City, Korea), sous l'encadrement du Professeur Cheorl-Ho Kim.

L'ensemble de ces travaux a été financé par le ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche, le projet PHC Hubert Curien STAR, l'Université Lille Nord de France, l'Association de la Recherche contre le Cancer (ARC) et la Ligue Régionale contre le cancer.

Les travaux accomplis pendant cette thèse, mais également au cours de mes stages de Licence et de Master, ont fait l'objet des publications et des communications suivantes.

## **Publications:**

Groux-Degroote S., Krzewinski-Recchi MA., **Cazet A.**, Vincent A., Lehoux S., Lafitte JJ., Van Seuningen I., Delannoy P. (2008). IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated Lewis<sup>x</sup> epitopes in the human bronchial mucosa. *Biochem J.* 410:213-223.

**Cazet A.**, Groux-Degroote S., Teylaert B., Kwon KM., Lehoux S., Slomianny C., Kim CH., Le Bourhis X., Delannoy P. (2009). G<sub>D3</sub> synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol Chem.* 390:601-609.

Trottein F., Schaffer L., Ivanov S., Paget C., Vendeville C., **Cazet A.**, Groux-Degroote S., Lee S., Krzewinski-Recchi MA., Faveeuw C., Head SR., Gosset P., Delannoy P. (2009). Glycosyltransferase and sulfotransferase gene expression profiles in human monocytes, dendritic cells and macrophages. *Glycoconj J.* 26:1259-1274.

Lehoux S., Groux-Degroote S., **Cazet A.**, Dhaenens CM., Maurage CA., Caillet-Boudin ML., Delannoy P., Krzewinski-Recchi MA. (2010). Transcriptional regulation of the human *ST6GAL2* gene in cerebral cortex and neuronal cells. *Glycoconj. J.* 27:99-114.

Bernardin A., **Cazet A.**, Guyon L., Delannoy P., Vinet F., Bonnaffé D., Texier I. (2010). Copper-free click chemistry for highly luminescent quantum dot conjugates: application to *in vivo* metabolic imaging. *Bioconj. Chem.* 21:583-588.

**Cazet A.**, Julien S., Bobowski M., Krzewinski-Recchi MA., Harduin-Lepers A., Groux-Degroote S., Delannoy P. (2010). Consequences of the expression of sialylated antigens in breast cancer. *Carbohydrate Research.* 345:1377-1383.

**Cazet A.**, Julien S., Bobowski M., Burchell J., Delannoy P. (2010). The Expression of Tumor-Associated Carbohydrate Antigens in Breast Cancer. *Breast Cancer Research.* 12:204-217.

**Cazet A.**, Lefebvre J., Adriaenssens E., Julien S., Bobowski M., Grigoriadis A., Kim CH., Tutt A., Tulasne D., Le Bourhis X., Delannoy P. (2010) G<sub>D3</sub> synthase expression enhanced proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation. *Molecular Cancer Research.* In press. PMID: 20889649.

**Cazet A.**, Bobowski M., Rombouts Y., Lefebvre J., Steenackers A., Guérardel Y., Le Bourhis X., Tulasne D., Delannoy P. The ganglioside G<sub>D2</sub> induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G<sub>D3</sub> synthase. *In preparation for submission in Glycobiology.*



## **Communications orales:**

**Cazet A\***, Sophie Groux-Degroote, Béatrice Catieau-Teylaert, Xuefen Le Bourhis and Philippe Delannoy. Expression of G<sub>D3</sub> synthase increases MDA-MB-231 cell proliferation. *The 1<sup>st</sup> Korea-France Glycobiology Symposium, October 30<sup>th</sup> 2007, SungKyunKwan University, Suwon City, South Korea.*

**Cazet A\***, Kyung-Min Kwon, Seok-Jo Kim, Sophie Groux-Degroote, Béatrice Catieau-Teylaert, Xuefen Le Bourhis, Cheorl-Ho Kim and Philippe Delannoy Effect of the over-expression of the G<sub>D3</sub> synthase on breast cancer cell proliferation. *The 2<sup>nd</sup> Korea-France Glycobiology Symposium on sialyltransferase, Glycobiology and Glycomics, November 25<sup>th</sup> 2008, SungKyunKwan University, Suwon City, South Korea.*

**Cazet A\***, Kyung-Min Kwon, Seok-Jo Kim, Sophie Groux-Degroote, Béatrice Catieau-Teylaert, Xuefen Le Bourhis, Cheorl-Ho Kim and Philippe Delannoy Effect of the over-expression of the G<sub>D3</sub> synthase on breast cancer cell proliferation. *The 3<sup>rd</sup> Korea – France Collaborative Symposium; Glycobiology and Proteomics of Cancer; February 17<sup>th</sup> 2009, Villeneuve d'Ascq, France.*

**Cazet A\***, Lefebvre J, Kyung-Min Kwon, Seok-Jo Kim, Kim CH, Tulasne D, Le Bourhis X and Delannoy P. Rôle de la sialyltransférase ST8Sia I ou G<sub>D3</sub> synthétase dans le développement du cancer du sein. *9<sup>ème</sup> Journée André VERBERT, 16 Septembre 2009, Lille, France.*

**Cazet A\***, Lefebvre J, Kim CH, Tulasne D, Le Bourhis X and Delannoy P. G<sub>D3</sub> synthase expression induces proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells *via* the constitutive phosphorylation of c-MET/HGFR. *Seminar in the King's College London, Breast Cancer Biology Group, September 30<sup>th</sup> 2009, London, The United Kingdom.*

**Cazet A\***, Lefebvre J, Kyung-Min Kwon, Seok-Jo Kim, Kim CH, Tulasne D, Le Bourhis X and Delannoy P. G<sub>D3</sub> synthase over-expression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *20<sup>th</sup> Joint Meeting of Glycobiology, November 8-10, 2009, Cologne, Germany.*

**Cazet A\***, Lefebvre J, Adriaenssens E, Tulasne D, Lebourhis X and Delannoy P. G<sub>D3</sub> synthase over-expression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells *via* the constitutive phosphorylation of c-Met receptor. *XXIIIèmes Journées du Groupe Français des Glucides, May 17 – 20, 2010, Baie de Somme, Picardie, France.*

\* Orateur

## **Communications par affiche:**

Groux-Degroote S\*, Krzewinski-Recchi MA, **Cazet A**, Lafitte JJ, Delannoy P. Influence of inflammation on the glycosylation and sulfation of human bronchial mucins. *7ème colloque des jeunes chercheurs de la mucoviscidose*, 6-7 avril 2006, Nogent sur Marne, France.

Groux-Degroote S\*, Krzewinski-Recchi MA, **Cazet A**, Lafitte JJ, Delannoy P. Influence of inflammation on the glycosylation and sulfation of human bronchial mucins. *GlycoT 2006*, 25-28 June, Tsukuba, Japan.

Groux-Degroote S\*, Krzewinski-Recchi MA, **Cazet A**, Lafitte JJ, Delannoy P. IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated lewis x epitopes in the human bronchial mucosa.

- *Gordon Conference on Glycobiology, Ventura (CA), USA*, 4 - 9 mars 2007.

- *Benzon Symp. n° 54, Glycosylation: Opportunities in Drug Development, Copenhagen, Denmark*, June 11-14, 2007.

- *18th Joint Meeting of the Studiengruppe Glykobiologie der GBM, the Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie, the Groupe Lillois de Glycobiologie and the Belgian Working Group for Glycosciences*. Novembre 4-6, 2007, Lesquin, France.

**Aurélié Cazet\***, Sophie Groux-Degroote, Béatrice Catieau-Teylaert, Xuefen Le Bourhis and Philippe Delannoy. Expression of G<sub>D3</sub> synthase increases MDA-MB-231 cell proliferation. *18<sup>th</sup> Joint Meeting of Glycobiology*, November 4-6, 2007, Lille-Lesquin, France.

Bernardin A\*, **Cazet A**, Delannoy P, Vinet P, Bonnaffé D, Texier I. Clickable quantum dot probes for *in vivo* metabolic imaging.

- *XXIIèmes Journées du GFG*, May 19-22, 2008, Ax-les-Thermes, France.

- *6<sup>th</sup> International Conference on Biomedical Applications of Nanotechnology*, March 4 - 6, 2009, Charité, Berlin.

**Aurélié Cazet\***, Kyung-Min Kwon, Seok-Jo Kim, Sophie Groux-Degroote, Béatrice Catieau-Teylaert, Xuefen Le Bourhis, Cheorl-Ho Kim and Philippe Delannoy. Effect of the over-expression of the G<sub>D3</sub> synthase on breast cancer cell proliferation. *2<sup>èmes</sup> Journées du Cancéropôle Nord-Ouest*, May 5-6, 2009, Le Touquet, France.

Sylvain Lehoux\*, Sophie Groux-Degroote, **Aurélié Cazet**, Claire-Marie Dhaenens, Claude-Alain Maurage, Marie-Laure Caillet-Boudin, Philippe Delannoy and Marie-Ange Krzewinski-Recchi. Transcriptional expression and regulation of the human ST6GAL2 gene in brain. *9th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium*, September 13-15, 2009, Bruxelles, Belgium.

Colomb F\*, El-Machhour F, **Cazet A**, Lafitte J.-J, Delannoy P, Groux-Degroote S and Krzewinski-Recchi M.-A. TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-8 increase the expression of glycosyltransferases and sulfotransferases involved in the biosynthesis of sialylated and/or sulfated lewis x epitopes in the human bronchial mucosa and in the A549 lung cancer cell line. *11ème colloque des jeunes chercheurs de la mucoviscidose*, 4 mars 2010, Paris, France.

**Aurélié Cazet\***, Jonathan Lefebvre, Eric Adriaenssens, Cheorl-Ho Kim, David Tulasne, Xuefen Le Bourhis and Philippe Delannoy. G<sub>D3</sub> synthase expression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells *via* the constitutive phosphorylation of c-Met/HGFR. *3<sup>èmes</sup> Journées du Cancéropôle Nord-Ouest*, May 6-7, 2010, Deauville, France.

**Aurélie Cazet**, Yoann Rombouts, Jonathan Lefebvre, Eric Adrienssens, Sylvain Julien, Marie Bobowski, David Tulasne, Xuefen Le Bourhis and Philippe Delannoy. The ganglioside G<sub>D2</sub> induces the constitutive phosphorylation of c-Met/HGFR and the proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells. *SialOglyco 2010, 21-26 August 2010, Postdam, Germany.*

Marie Bobowski\*, **Aurélie Cazet**, Sylvain Julien, Florent Colomb, Marie-Ange Krzewinski-Recchi, Sophie Groux-Degroote, Anne Harduin-Lepers, Philippe Delannoy. Transcriptional regulation of the G<sub>D3</sub> synthase (*ST8SIA1*) gene in breast cancer.

- *SialOglyco 2010, 21-26 August 2010, Postdam, Germany.*

- *21<sup>th</sup> Joint Meeting of Glycobiology, November 7-9, 2010, Ghent, Belgium.*

Florent Colomb\*, Marie-Ange Krzewinski-Recchi, **Aurélie Cazet**, Marie Bobowski, Jean-Jacques Lafitte, Philippe Delannoy, Sophie Groux-Degroote. TNF $\alpha$ , IL-6 and IL-8 control sialyl and/or sulfo Lewis<sup>x</sup> epitopes biosynthesis in human bronchial explants and in A549 lung cancer cells.

- *SialOglyco 2010, 21-26 August 2010, Postdam, Germany.*

- *21<sup>th</sup> Joint Meeting of Glycobiology, November 7-9, 2010, Ghent, Belgium.*

Agata Steenackers\*, **Aurélie Cazet**, Marie Bobowski, Xuefen Le Bourhis and Philippe Delannoy. Effect of the expression of G<sub>D3</sub> synthase on two different breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *21<sup>th</sup> Joint Meeting of Glycobiology, November 7-9, 2010, Ghent, Belgium.*

\* Orateur



# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b>	1
<b>SOMMAIRE DES FIGURES</b>	5
<b>SOMMAIRE DES TABLEAUX</b>	7
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	8
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</b>	11
<b>I. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION</b>	13
<b>I. A. La glande mammaire normale</b>	13
I. A. 1. Anatomie et histologie de la glande mammaire.	13
I. A. 1. a) Anatomie du sein	13
I. A. 1. b) Histologie de la glande mammaire normale	16
I. A. 2. Le développement discontinu de la glande mammaire	18
I. A. 2. a) Etape prénatale	18
I. A. 2. b) Etape pubertaire	18
I. A. 2. c) Gestation et lactation	19
I. A. 2. d) Ménopause et sénescence	20
<b>I. B. Le cancer du sein : maladie multifactorielle</b>	21
I. B. 1. Données épidémiologiques	21
I. B. 2. Les facteurs de risques	22
I. B. 2. a) Age	22
I. B. 2. b) Facteurs environnementaux et habitudes alimentaires	22
I. B. 2. c) Vie génitale	23
I. B. 2. d) Antécédents familiaux	23
I. B. 2. e) Antécédents de pathologie mammaire bénigne	24
I. B. 3. La tumorigenèse mammaire	24
I. B. 3. a) Les étapes du développement tumoral	24
I. B. 3. b) Les caractéristiques des tumeurs mammaires	26
• Les différents types de cancer du sein	26
• Les métastases des cellules cancéreuses de sein	28
• Classification des cancers du sein	28
I. B. 3. c) Mécanismes de la tumorigenèse mammaire	33
• Formation de la tumeur primaire : lien entre croissance, survie et instabilité génomique	33
• Invasion et métastases	41
• <i>ST6GALNAC5</i> et les métastases cérébrales	44

<b>II. LES ANOMALIES DE GLYCOSYLATION DE SURFACE DANS LE CANCER DU SEIN</b>	45
<b>II. A. Les antigènes glucidiques associés aux tumeurs</b>	45
II. A. 1. Description	45
II. A. 2. Antigènes sialylés et cancer	47
II. A. 2. a) Biosynthèse	47
II. A. 2. b) Exemples d'AGAT dans les cancers	48
II. A. 2. c) Immunothérapie	49
<b>II. B. Les antigènes glucidiques associés au cancer du sein</b>	50
<b>III. LES GANGLIOSIDES COMPLEXES : FONCTIONS AU CŒUR DE LA CELLULE ET DANS LE PROCESSUS DE CAN- CERISATION</b>	65
<b>III. A. La biosynthèse des gangliosides</b>	65
III. A. 1. Structure	65
III. A. 1. a) Les glycosphingolipides	65
III. A. 1. b) Les GSLs de la famille ganglio	66
III. A. 2. Localisation	69
III. A. 2. a) Localisation tissulaire	69
III. A. 2. b) Localisation cellulaire	69
III. A. 3. Le métabolisme des GSLs de la série ganglio	71
III. A. 3. a) La biosynthèse des gangliosides	71
• Description	71
• Organisation supramoléculaire des enzymes intervenant dans la bio- synthèse des gangliosides	73
• Les gangliosides de la série $\alpha$	73
III. A. 3. b) Le catabolisme des gangliosides	74
III. A. 3. c) La régulation du métabolisme gangliosidique	76
• Régulation dépendante de l'équipement enzymatique, de la disponi- bilité des substrats donneur/accepteur et de l'organisation supramolé- culaire des GTs.	76
• Régulation transcriptionnelle	77
• Régulation post-transcriptionnelle	78
• Autres facteurs de régulation	79
III. A. 2. d) La biosynthèse des gangliosides complexes : rôle clef de la sialyltransférase ST8Sia 1 ou $G_{D3}$ synthétase	80
<b>III. B. Rôles physiologiques et pathologiques des gangliosides</b>	82
III. B. 1. Fonctions des gangliosides dans la physiologie cellulaire et tissulaire	82
III. B. 1. a) La reconnaissance cellulaire dépendante des gangliosides	82
• Rôle dans l'immunité	82
• Rôle dans les interactions myéline-axone	83
• Rôle dans les interactions avec les virus, bactéries et toxines	83
• Rôle dans les interactions avec les protéines de la matrice extracel- lulaire	85

III. B. 1. b) La modulation des signaux transmembranaires	85
• Signalisation des canaux ioniques	85
• Signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs)	86
III. B. 2. Rôle des gangliosides complexes dans le processus de cancérisation	90
III. B. 2. a) Les gangliosides complexes dans les tumeurs d'origine neuro-ectodermique	90
• Rôle prédominant du ganglioside $G_{D3}$ dans le mélanome	90
• Rôle dans les tumeurs cérébrales	93
III. B. 2. b) Les gangliosides complexes dans les tumeurs pulmonaires	95
III. B. 2. c) Expression des gangliosides complexes dans d'autres types de cancer	97
III. B. 2. d) Les thérapies anticancéreuses visant les gangliosides	97
<b>IV. OBJECTIFS DE LA THESE</b>	101
<b>IV. A. Contexte de la thèse</b>	101
<b>IV. B. Les objectifs de la thèse</b>	102
<b>RESULTATS</b>	105
<b>Article 1: <math>G_{D3}</math> synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells</b>	107
<b>Article 2: <math>G_{D3}</math> synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation</b>	119
<b>Article 3: The ganglioside <math>G_{D2}</math> induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the <math>G_{D3}</math> synthase</b>	151
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	175
<b>I. Le <math>G_{D2}</math> : activateur spécifique du récepteur c-Met dans les cellules mammaires triple negatives</b>	177
I. A. Rappel des résultats obtenus	177
I. B. Spécificité d'activation du récepteur c-Met	178
I. C. Le $G_{D2}$ : principal acteur de l'activation de c-Met et de l'acquisition du phénotype prolifératif des cellules MDA-MB-231	180
I. D. Activation de c-Met dépendante du $G_{D2}$ : un nouveau mécanisme de contrôle de c-Met dans les cellules cancéreuses mammaires	182

I. E. Activation de c-Met dépendante du $G_{D2}$ : un phénomène généralisable aux cellules cancéreuses $G_{D2}$ positives ?	182
<b>II. Rôle de la GD3S dans la tumorigenèse chez le petit animal</b>	<b>184</b>
II. A. Effet sur la formation de la tumeur primaire	184
II. B. Effet de l'expression de la GD3S sur la dissémination des cellules mammaires et l'apparition des métastases	186
<b>III. Rôle de la GD3S dans la tumorigenèse chez le malade</b>	<b>187</b>
III. A. La GD3S et la tumeur primaire	187
III. B. Relation entre l'expression de la GD3S et des paramètres d'agressivité tumorale	188
III. C. Les gangliosides complexes : cibles thérapeutiques d'intérêt dans le cancer du sein	188
<b>REFERENCES</b>	<b>191</b>



## SOMMAIRE DES FIGURES

<b>Figure 1: Anatomie de la glande mammaire</b>	<b>14</b>
<b>Figure 2 : Représentation schématique de la structure de la glande mammaire</b>	<b>14</b>
<b>Figure 3 : Schéma représentant le drainage lymphatique du sein</b>	<b>15</b>
<b>Figure 4: Histologie de la glande mammaire normale</b>	<b>17</b>
<b>Figure 5 : Le développement de la glande mammaire</b>	<b>20</b>
<b>Figure 6 : Les différentes étapes de la cancérisation dans le cas d'un carcinome canalaire mammaire</b>	<b>25</b>
<b>Figure 7 : Coupes anatomo-pathologiques représentant les principaux types de carcinomes mammaires</b>	<b>27</b>
<b>Figure 8 : Identification de signatures pronostiques ou prédictives dans le cancer du sein par la technique des puces à ADN</b>	<b>32</b>
<b>Figure 9 : De la tumeur primaire mammaire aux métastases : les gènes associés aux différents processus</b>	<b>34</b>
<b>Figure 10 : Approches thérapeutiques visant à inhiber la croissance tumorale mammaire en ciblant la signalisation du récepteur HER2</b>	<b>37</b>
<b>Figure 11 : Les hypothèses expliquant la transformation maligne et l'hétérogénéité tumorale</b>	<b>39</b>
<b>Figure 12 : Différenciation épithéliale mammaire normale et tumorale</b>	<b>40</b>
<b>Figure 13 : Infiltration des cellules tumorales mammaires au niveau de la barrière hémato-encéphalique, des capillaires continus pulmonaires et des capillaires sinusoides de la moelle osseuse</b>	<b>43</b>
<b>Figure 14 : Représentation schématique de gangliosides complexes disialylés : le <math>G_{D3}</math>, le <math>G_{D2}</math> et le <math>G_{D1b}</math></b>	<b>67</b>
<b>Figure 15: Représentation schématique de la synthèse des gangliosides</b>	<b>72</b>
<b>Figure 16: Représentation schématique de la dégradation des gangliosides des séries 0- et a-</b>	<b>75</b>
<b>Figure 17 : Organisation génomique de la <math>G_{D3}</math> synthétase humaine</b>	<b>81</b>

<b>Figure 18 : Représentation schématique de l'interaction entre la Siglec-4, ou MAG, et les gangliosides complexes <math>G_{D1a}</math> et <math>G_{T1b}</math></b>	<b>83</b>
<b>Figure 19 : Action de la toxine cholérique sur une cellule intestinale humaine</b>	<b>84</b>
<b>Figure 20 : Représentation schématique de la signalisation calcique dépendante du <math>G_{M1}</math> dans la maladie de Landing</b>	<b>86</b>
<b>Figure 21: Mécanisme de résistance à l'insuline dans les adipocytes</b>	<b>88</b>
<b>Figure 22 : Régulation de l'activité de divers récepteurs à activité tyrosine kinase par les gangliosides</b>	<b>89</b>
<b>Figure 23 : Effets de l'expression du ganglioside <math>G_{D3}</math> sur les propriétés biologiques de cellules tumorales de mélanome</b>	<b>92</b>
<b>Figure 24 : Apoptose par anoïkis de cellules du cancer du poumon à petites cellules</b>	<b>96</b>
<b>Figure 25 : Stratégie vaccinale utilisant des lymphocytes T manipulés génétiquement</b>	<b>99</b>
<b>Figure 26 : Structure du <math>G_{D2}</math> et de la molécule <math>G_{D2}</math>-lactone-KLH</b>	<b>100</b>

## **SOMMAIRE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1 : Classification du cancer du sein par stade, en fonction des observations TNM</b>	<b>29</b>
<b>Tableau 2 : Caractéristiques moléculaires utilisées en immunocytochimie pour différencier les différents sous-types de cancer du sein</b>	<b>31</b>
<b>Tableau 3 : Expression des AGAT dans différents types de cancers.</b>	<b>47</b>
<b>Tableau 4 : Structures oligosaccharidiques déterminant les différentes séries de glycosphingolipides</b>	<b>66</b>
<b>Table 5 : Nomenclature et structures des principaux gangliosides</b>	<b>68</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS

$\beta$ 3Gal T4 :	G <sub>A1</sub> /G <sub>M1a</sub> /G <sub>D1b</sub> /G <sub>T1c</sub> synthase
$\beta$ 4GalNAc T1 :	G <sub>A2</sub> /G <sub>M2</sub> /G <sub>D2</sub> /G <sub>T2</sub> synthase
AGAT :	Antigènes Glucidiques Associés aux Tumeurs
Angptl4:	Angiopoietin-like 4
AMPc:	Adénosine MonoPhosphate cyclique
BRCA1:	Breast Cancer Suceptibility 1
BRCA2:	Breast Cancer Suceptibility 2
CCI :	Carcinome Canalaire Infiltrant
CCIS :	Carcinome Canalaire <i>in situ</i>
Cer :	Céramide
CERT :	CERamide Transport protein
CMP-Neu5Ac :	Acide cytidyl-monophospho- <i>N</i> -acétylneuramique
CK :	Cytokératine
CLIS :	Carcinome Lobulaire <i>in situ</i>
co-IP:	co-immunoprécipitation
DARC:	Duffy Antigen Chemokine Receptor
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA:	Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid
EGF:	Epidermal Growth Factor
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT :	Epithelial-Mesenchymal Transition
ER:	Estrogen Receptor
ERK:	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FAK:	Focal Adhesion Kinase
FGF:	Fibroblast Growth Factor
FRET:	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FRAP:	Fluorescence Recovery After Photobleaching
Gal :	Galactose
GalCer :	Galactosylcéramide
GalNAc :	<i>N</i> -acétylgalactosamine
GD3S :	G <sub>D3</sub> synthétase
GD3S <sup>+</sup> :	G <sub>D3</sub> synthétase positif
GEM :	Glycosphingolipids-Enriched Microdomains
GH:	Growth Hormone

## Liste des abréviations

Glc :	Glucose
GlcCer :	Glucosylcéramide
GlcNAc :	<i>N</i> -acétylglucosamine
GlcNAc-TV :	<i>N</i> -acétylglucosaminyltransférase V
GM2-AP:	G <sub>M2</sub> -Activator Protein
GNE :	UDP- <i>N</i> -acétylglucosamine 2-épipimérase/ <i>N</i> -acétylmannosamine 6-kinase
GPI :	Glycosylphosphatidylinositol
GSLs:	Glycosphingolipides
GTs:	Glycosyltransférases
HGF/SF:	Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor
HIV-1 :	Human Immunodeficiency Virus type 1
HPRT:	Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
IGF-1:	Insulin-like Growth Factor 1
IKL-Akt:	Integrin-Linked Kinase-Akt
IL:	Interleukine
JNK:	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
Kb:	Kilobases
KLH:	Keyhole Limet Hemocyanin
LacCer :	Lactosylcéramide
LAL :	Leucémie aiguë lymphoblastique
Le <sup>y</sup> :	Lewis <sup>y</sup>
mAb :	Monoclonal Antibody
MAG :	Myelin-Associated Glycoprotein
MAM :	Membranes Associées aux Mitochondries
MEK:	Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase/ERK kinase
MDGF-1:	Mammary-Derived Growth Factor 1
MMP:	Matrix Metalloproteinase
N-CAM	Neural Cell Adhesion Molecule
Neu5Ac :	Acide <i>N</i> -acétylneuraminique
Neu5Gc :	<i>N</i> -glycosylneuraminique
NGF:	Nerve Growth Factor
NK:	Natural Killer
NSCLC:	Non-Small Cell Lung Cancer
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PDGFR:	Platelet-derived growth factor receptor
PI3K:	Phosphatidyl-Inositol 3-OH Kinase

## Liste des abréviations

PIP <sub>3</sub> :	PhosphatidyInositol (3,4,5)-triphosphates
PR :	Progesterone Receptor
PSA:	PolySialic Acid
PTEN :	Phosphatase and TENsin homolog
PTHRP:	Parathyroid Hormone-Related Protein
RANKL:	Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand
RB :	Retinoblastoma protein
ROS:	Reactive Oxygen Species
siRNA:	Small Interfering RNA
RTKs:	Receptor Tyrosine-kinase
SAPK:	Stress-activated protein kinase/c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal kinase
SAPs:	Spingolipid Activator Proteins
SCID:	Severe Combined ImmunoDeficiency
SCLC:	Small Cell Lung Cancer
Siglecs:	Sialic acid-binding Immunoglobulin-like Lectins
sLe <sup>a</sup> :	sialyl-Lewis <sup>a</sup>
sLe <sup>x</sup> :	sialyl-Lewis <sup>x</sup>
ST3Gal V:	G <sub>M3</sub> synthase
ST8Sia I:	G <sub>D3</sub> synthase
ST8Sia V:	G <sub>T3</sub> synthase
sTn :	sialyl-Tn
TF:	Thomsen-Friedenreich
TGF- $\alpha$ :	Transforming Growth Factor $\alpha$
TGF- $\beta$ :	Transforming Growth Factor $\beta$
THS:	Traitements Hormonaux Substitutifs
TNF $\alpha$ :	Tumor Necrosis Factor- $\alpha$
TNFR:	Tumor Necrosis Factor Receptor
TRPC5 :	Transient Receptor Potential cation Channel 5
UGCG :	UDP-glucose : céramide glucosyltransférase
UICC :	Union Internationale Contre le Cancer
uPA :	Urokinase-like Plasminogen Activator
VEGF:	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR-2:	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2

# **INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE**





## **I. LA GLANDE MAMMAIRE ET SA CANCERISATION**

### **I. A. La glande mammaire normale**

Le sein, ou glande mammaire, est une glande exocrine cutanée d'origine ectodermique qui se développe au cours de la vie de la femme et dont la fonction est d'assurer, après la parturition, la production de lait nécessaire à l'alimentation du nouveau-né. Son développement et certains aspects histologiques l'apparentent à des glandes sudoripares apocrines modifiées. La glande mammaire est constituée de 2 compartiments cellulaires : le compartiment mésenchymateux, composé des vaisseaux sanguins et des nerfs, et le compartiment épithélial qui s'articule autour d'un réseau de canaux galactophores et de lobules renfermant les alvéoles. Ces deux compartiments sont séparés par une membrane basale de collagène de type IV, de laminine et de glycosaminoglycanes. Cette architecture se construit tout au long de la vie, du stade fœtal à la ménopause, sous l'influence des hormones sexuelles (œstrogènes, progestérone) et pituitaires, et d'un certain nombre de facteurs de croissance.

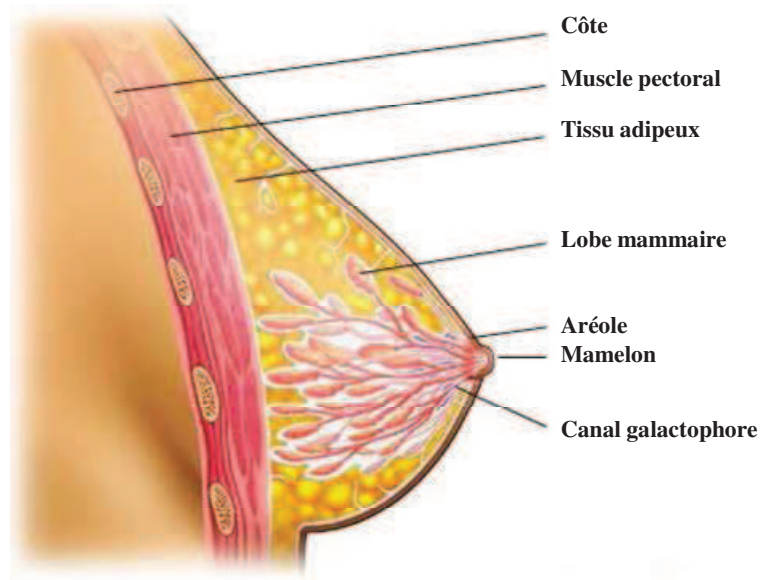
#### **I. A. 1. Anatomie et histologie de la glande mammaire.**

##### ***I. A. 1. a) Anatomie du sein***

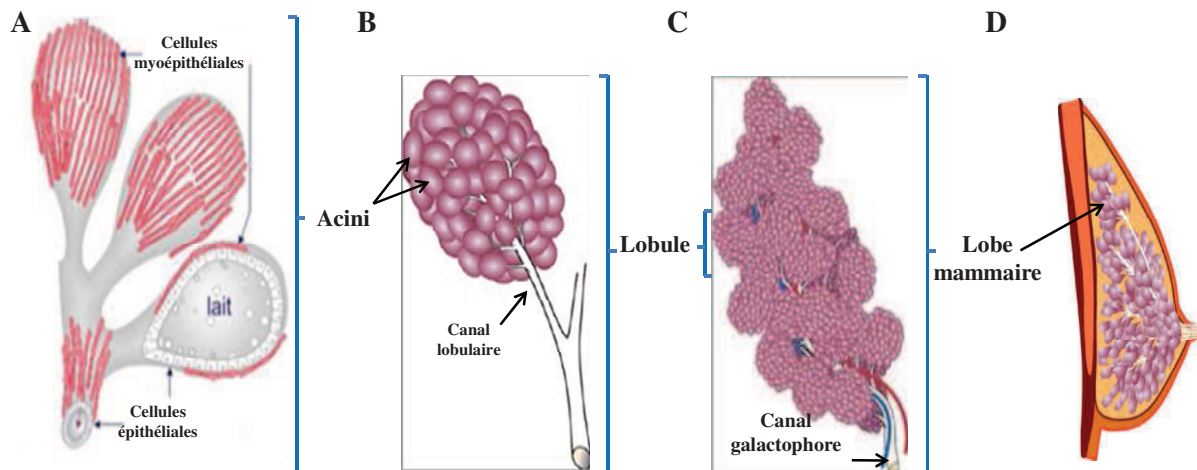
Les seins sont situés sur la paroi antérieure du thorax, ou poitrine, dans une zone qui s'étend classiquement de la 3<sup>ème</sup> à la 7<sup>ème</sup> côte (**Figure 1**). La glande mammaire se développe à partir de la glande aréolo-mamelonnaire ; elle est entièrement incluse dans le tissu adipeux sous-cutané et n'est rattachée à la peau que par ses seuls canaux excréteurs. Elle est composée de lobes et de canaux galactophores entourés de tissu conjonctif dans lequel cheminent les vaisseaux (Espié et Gorins, 2001).

Les acini ou alvéoles mammaires sont groupés de façon très dense autour d'un canal alvéolaire, nommé également canal galactophore du 3<sup>ème</sup> ordre, par lequel est éjecté le produit de sécrétion (**Figure 2**). Plusieurs canaux alvéolaires se réunissent et forment ensuite un canal lobulaire (canal de 2<sup>ème</sup> ordre) qui draine un lobule. Plusieurs canaux lobulaires se réunissent pour former un canal galactophore collecteur de 1<sup>er</sup> ordre et l'ensemble des lobules qu'il draine forme un lobe glandulaire. Chaque galactophore achemine le lait vers le mamelon par un orifice qui lui est propre. La glande mammaire représente donc le groupement de 15 à 20

unités lobulaires fonctionnellement indépendantes, mais chirurgicalement indissociables. Les lobes sont séparés entre eux par des cloisons de tissu conjonctif dense.



**Figure 1: Anatomie de la glande mammaire** (image adaptée et issue du site [www.virtualmedicalcentre.com](http://www.virtualmedicalcentre.com)).



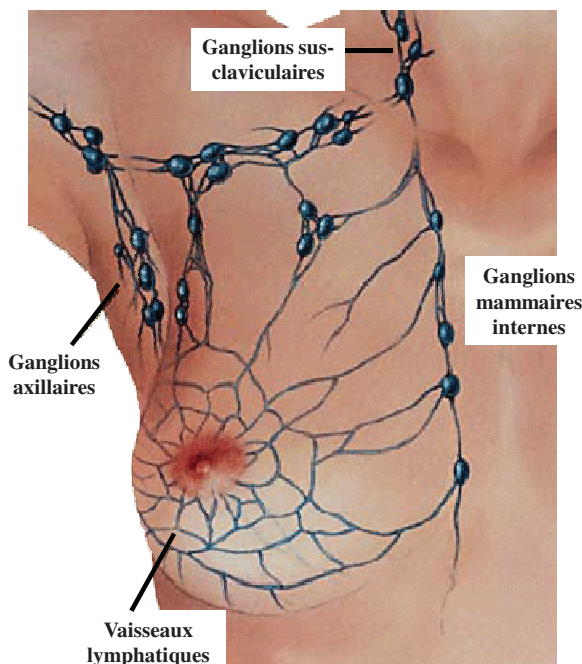
**Figure 2 : Représentation schématique de la structure de la glande mammaire.** Entre 10 à 100 acini ou alvéoles (A) s'organisent autour d'un canal lobulaire, donnant ainsi naissance à un lobule (B). Le groupement de 20 à 40 lobules autour du canal galactophore excréteur participe à la formation du lobe mammaire (C). Le sein est une glande composée de plusieurs lobes mammaires, inclus dans le tissu adipeux sous-cutané (D). Les alvéoles mammaires sont composés d'un épithélium sécrétoire qui éjectent le lait dans les canaux alvéolaires, jusqu'au canal galactophore grâce à la contraction des cellules myoépithéliales, elles même réagissant au stimulus de succion (A). (images adaptées et issues du site [www.santeallaitementmaternel.com](http://www.santeallaitementmaternel.com)).

## Introduction bibliographique

Le sein est irrigué par un réseau artériel sous épidermique pré-glandulaire, provenant principalement des artères thoraciques externes et internes, et par un réseau rétro-glandulaire de rôle plus négligeable. Le drainage veineux s'effectue selon deux voies : une voie superficielle et une voie profonde. Le réseau capillaire sanguin est très développé, notamment en période de lactation. Il irrigue richement les lobules glandulaires et leurs alvéoles.

Le sein est innervé par trois groupes de nerfs qui convergent vers la plaque aréolo-mamelonnaire : le groupe antérieur, latéral et supérieur.

Finalement, le réseau lymphatique du sein peut être divisé en réseau lymphatique cutané drainant la lymphe de la peau et de la graisse sous-cutanée et en drainage lymphatique de la glande elle-même. Ce dernier, nommé réseau péri-lobulaire, entoure la surface des lobules. Certains vaisseaux lymphatiques suivent les canaux galactophores et se jettent dans le plexus sous-aréolaire ; les autres quittent la glande par sa périphérie. Les collecteurs ont ensuite deux destinées : les nodus axillaires, situés dans la graisse qui remplit le creux axillaire, et les nodus de la chaîne thoracique interne (mammaire interne) puis les ganglions sus-claviculaires (**Figure 3**). L'organisation du drainage lymphatique explique ainsi clairement l'apparition de métastases du cancer du sein au niveau des ganglions axillaires.

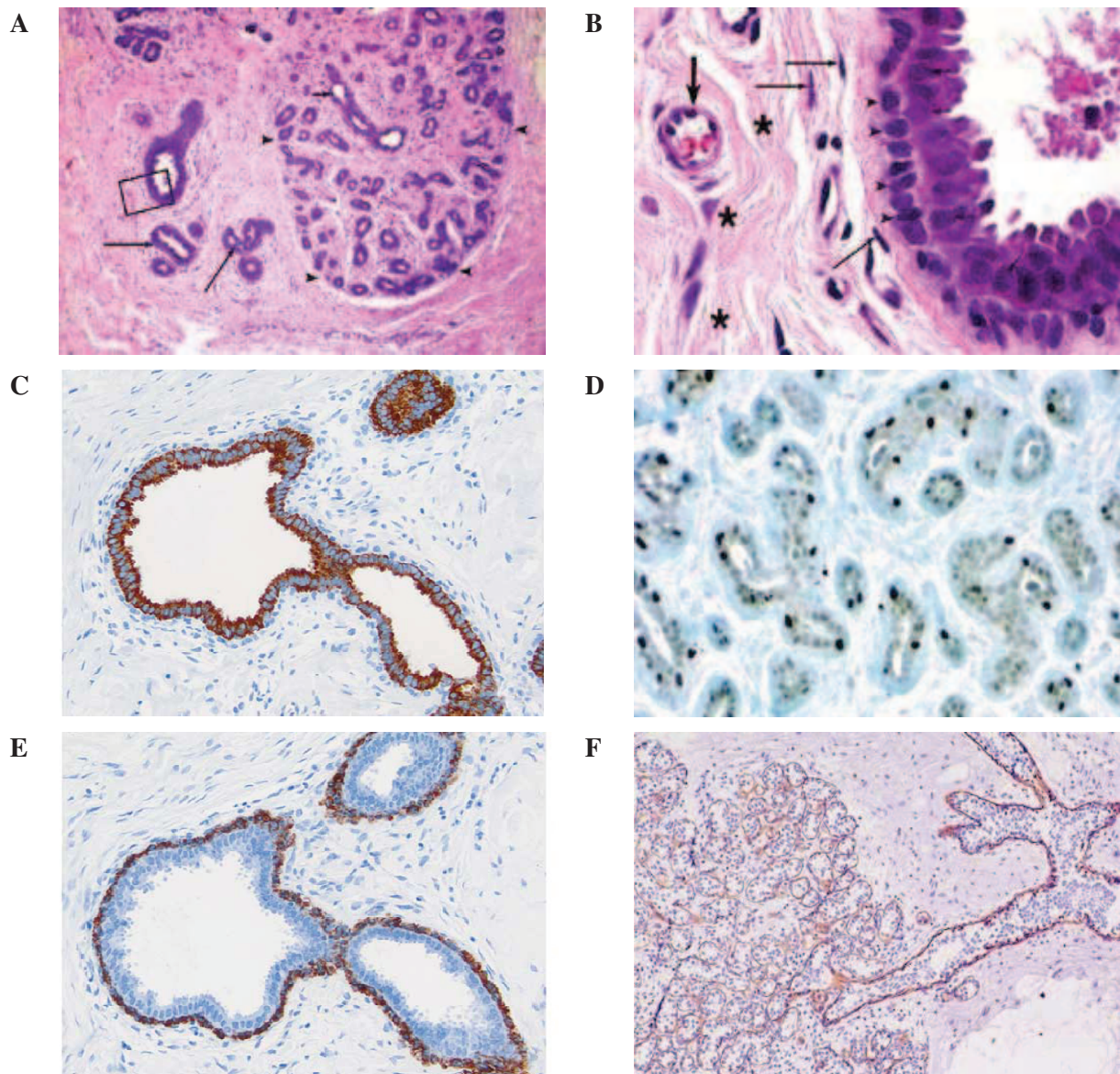


**Figure 3 : Schéma représentant le drainage lymphatique du sein.** Le réseau péri-lobulaire est composé des vaisseaux lymphatiques, entourant l'aréole, des ganglions axillaires, des ganglions mammaires internes et sus-claviculaires. L'envahissement des ganglions lymphatiques est le reflet du potentiel métastatique des cellules tumorales mammaires (image adaptée et issue du site [www.celtnet.org.uk/cancer/breast-function](http://www.celtnet.org.uk/cancer/breast-function)).

***I. A. 1. b) Histologie de la glande mammaire normale***

Exception faite du court segment des canaux collecteurs qui s'abouche à la peau au niveau du mamelon et qui est bordé par un revêtement de type malpighien, le système canalaire mammaire est bordé par deux couches cellulaires : une couche interne de cellules épithéliales entourée par une couche externe discontinue de cellules myoépithéliales (**Figure 4**). Les cellules épithéliales sont disposées perpendiculairement aux cellules myoépithéliales. Ces deux couches cellulaires sont délimitées par une membrane basale ; l'ensemble repose dans le stroma, ou tissu palléal, composé de la matrice extracellulaire (collagène de type IV, laminine, fibronectine, glycosaminoglycanes), de fibroblastes, d'adipocytes et de vaisseaux sanguins. En réponse au stimulus de succion, les acini sécrètent le lait et les cellules myoépithéliales fusiformes se contractent permettant l'éjection du lait dans les canaux alvéolaires, lobulaires puis galactophores, jusqu'au mamelon.

D'un point de vue immunohistochimique, les cellules épithéliales de l'arbre canalaire expriment des cytokératines et les récepteurs hormonaux (œstrogènes notamment), alors que les cellules myoépithéliales sont positives pour l'actine du muscle lisse. La membrane basale est marquée par des anticorps anti-laminine et anti-collagène de type IV.



**Figure 4: Histologie de la glande mammaire normale. A. Lobule mammaire post-pubertaire.** Les têtes des flèches (►) permettent de délimiter un lobule. Le canal alvéolaire terminal (petite flèche →) mène au réseau canalaire (flèche longue). La matrice extracellulaire, composée principalement de collagène, entoure lobule et canaux. La coupe histologique a été marquée à l'aide des colorants hématoxyline et éosine (dimension 1.5 x 1 mm). **B. Lobule mammaire post-pubertaire, agrandissement de la coupe histologique A (rectangle noir).** Les cellules myoépithéliales du canal (►) reposent sur une couche de cellules épithéliales (petites flèches →). Les fibroblastes (flèches longues), orientés parallèlement à la lame basale, et le collagène (★) sont des composant du stroma. Une artériole est indiquée par une large flèche (▼). (dimension 150 x 100 microns ; les images A et B sont issues du site <http://mammary.nih.gov/reviews/tumorigenesis>). **C. Marquage histologique des cellules épithéliales de l'arbre canalaire mammaire par un anticorps anti-cytokératine 18.** (grossissement x 200 ; Friedrichs *et al.*, 2005). **D. Marquage hétérogène du récepteur aux œstrogènes au niveau des cellules épithéliales de lobules mammaires.** **E. Marquage histologique des cellules myoépithéliales de l'arbre canalaire de sein par un anticorps anti-actine du muscle lisse.** (grossissement x 200 ; Friedrichs *et al.*, 2005). **F. Expression de la laminine 5 au niveau des membranes basales délimitant les canaux et lobules mammaires** (grossissement x 100 ; Diaz *et al.*, 2005).

## **I. A. 2. Le développement discontinu de la glande mammaire**

Le développement de la glande mammaire est très lent : ébauché au cours de la vie fœtale, il se prolonge jusqu'à la ménopause et se déroule en plusieurs étapes distinctes, séparées de nombreuses années. Ce développement discontinu est finement régulé et soumis à diverses influences paracrines (facteurs de croissance) et endocrines (hormones sexuelles et pituitaires). Son fonctionnement s'effectue lors de la gestation puis de la lactation au cours desquelles la différenciation de la glande est maximale (**Figure 5**).

### ***I. A. 2. a) Etape prénatale***

Les premières ébauches de la glande mammaire apparaissent à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine de la vie embryonnaire. Elles dérivent de l'ectoderme et des tissus qui constituent la peau du fœtus. Au cours du 5<sup>ème</sup> mois, le bourgeon mammaire émet des prolongements cylindriques pleins (15 à 20) dans le mésoderme sous-jacent. Entre le 7<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> mois, ces prolongements se ramifient, se dilatent et se creusent d'une lumière formant ainsi les futurs canaux galactophores (Espié et Gorins, 2001).

A la naissance, la glande mammaire correspond donc à un court système de tubules s'ouvrant au niveau d'un mamelon ombilique à la surface de la peau *via* les futurs canaux galactophores. A ce stade, aucune différence n'est observée entre les glandes mammaires des individus masculins et féminins. Elle demeurera sous cette forme rudimentaire chez l'homme, alors que son évolution va se poursuivre chez la femme, à la puberté, sous l'effet des hormones sexuelles.

### ***I. A. 2. b) Etape pubertaire***

A la puberté, les premières modifications ovariennes apparaissent chez l'adolescente, avec la mise en place des cycles menstruels. Sous l'influence des stéroïdes ovariens sécrétés, la glande mammaire s'engage dans un développement spécifique. Elle est alors soumise à une alternance d'exposition aux œstrogènes (1<sup>ère</sup> moitié du cycle) et à la progestérone (2<sup>ème</sup> moitié du cycle). Durant la phase folliculaire, l'hormone pituitaire GH (*Growth Hormone*) associée à la production d'œstrogènes stimule la prolifération, la migration et la survie des cellules épithéliales canalaire, aboutissant à la mise en place de l'arborescence de la glande (Sternlicht, 2006). Pendant la seconde moitié du cycle, ou phase lutéale, la sécrétion de progestérone provoque une dilatation modérée des canaux galactophores et une légère différenciation des cel-

lules épithéliales en cellules sécrétoires. Ce processus est arrêté à la fin du cycle si une gestation n'est pas engagée. Le tissu mammaire sécréteur apparu connaît alors une involution.

Ces modifications reflètent la sensibilité du tissu épithélial mammaire aux stimuli hormonaux. L'action des hormones s'effectue à la fois de manière directe sur les cellules épithéliales, et de manière indirecte par une action sur les cellules mésenchymateuses du stroma sous-jacent. Ces dernières sécrètent un ensemble de facteurs de croissance tels que l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\alpha$  ou  $\beta$* ), IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*), FGF (*Fibroblast Growth Factor*) ou le MDGF-1 (*Mammary-Derived Growth Factor 1*). Ces facteurs de croissance représentent des régulateurs de la prolifération et de la différenciation normale de l'épithélium mammaire. Les œstrogènes favorisent également la croissance du tissu épithélial en stimulant la synthèse de métalloprotéases (MMP2, 3, 14, Adam 17) qui, en dégradant localement la matrice extracellulaire, contribuent à la migration et à la prolifération des cellules épithéliales (Sternlicht, 2006).

Les changements des équilibres hormonaux de la puberté sont toutefois incapables d'induire le véritable développement de la glande mammaire. Les modifications morphologiques sont importantes, mais sont dues avant tout à une augmentation des adipocytes adjacents qui se chargent en graisse, provoquant la saillie de la glande et du mamelon. Entre la puberté et la première grossesse, le développement mammaire concerne essentiellement les canaux et assez peu le tissu alvéolaire sécréteur.

### ***I. A. 2. c) Gestation et lactation***

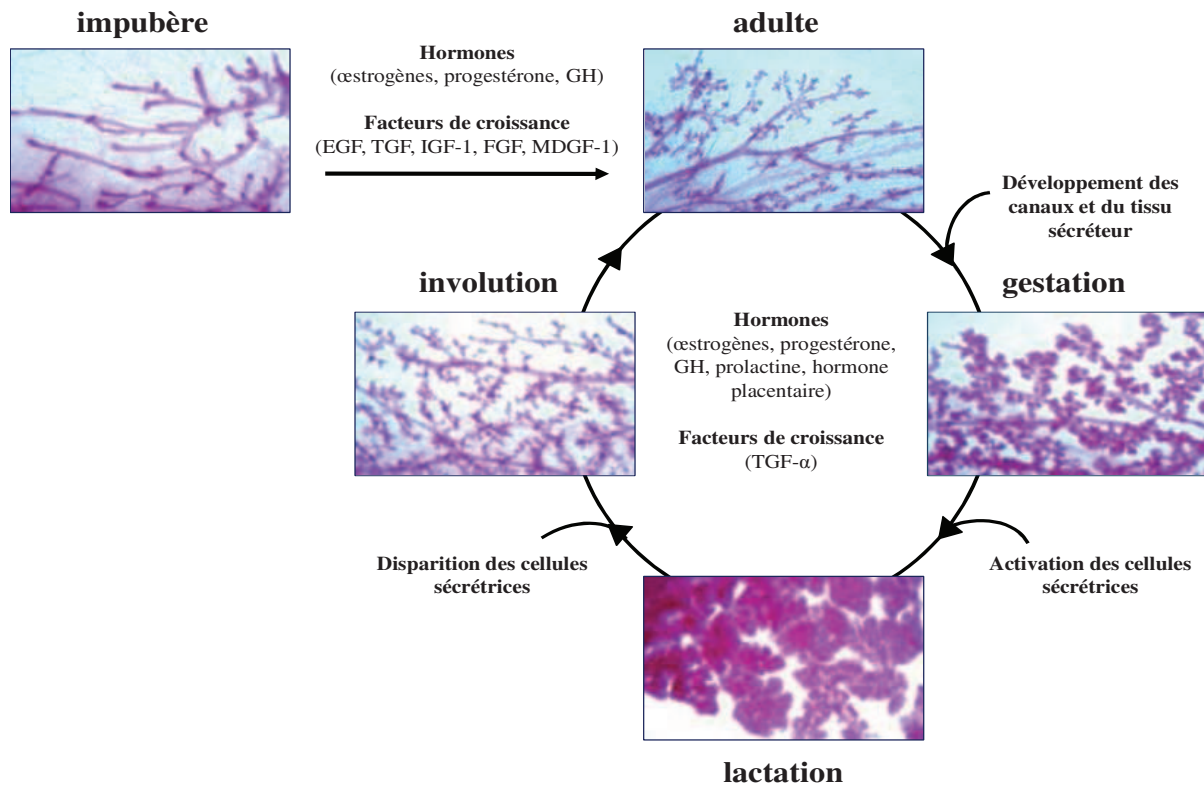
Au cours de la grossesse, les ramifications terminales des canaux se multiplient et de nombreuses alvéoles se développent (jusqu'à 100 alvéoles par lobule), sous l'influence combinée des hormones œstrogènes et de la progestérone, et de facteurs de croissance tels que le TGF- $\alpha$ . La progestérone induit notamment une augmentation de l'expression des récepteurs à l'EGF à la surface des cellules épithéliales et de la prolactine. La prolactine est un facteur essentiel : elle présente un effet pro-mitotique et anti-apoptotique par la voie de transduction JAK2-Stat5.

La glande mammaire achève son développement avec la première lactation. Les cellules sécrétrices de lait, les acini, sont parfaitement différenciées sous l'effet des hormones lactogènes (la prolactine, les glucocorticoïdes, la GH et l'hormone placentaire lactogène).

Les alvéoles régressent lors du sevrage et la glande mammaire revient à son état initial. Le tissu sécréteur est éliminé par des processus apoptotiques et par phagocytose *via* les cellules du système immunitaire.

### I. A. 2. d) Ménopause et sénescence

Le déclin des fonctions ovariennes à la ménopause provoque une régression des structures de la glande mammaire ; les canaux galactophores sont maintenus, mais les alvéoles restantes ainsi que les lobules continuent de régresser avec l'âge. Le tissu conjonctif s'amenuise et devient plus lâche, au profit du développement du tissu adipeux.



**Figure 5 : Le développement de la glande mammaire.** Sous l'effet des hormones ovariennes et d'hormones de croissance, l'arborescence mammaire se développe à partir de la puberté de la femme. Les œstrogènes et l'hormone pituitaire GH stimulent la croissance et les ramifications du système canalaire ainsi que la prolifération du tissu conjonctif péri-canalaire. La progestérone induit la dilatation des canaux et une légère différenciation des cellules épithéliales en cellules sécrétrices. Pendant la grossesse, les hormones œstrogènes/progestérone et le TGF- $\alpha$  stimulent le développement de nombreux tubulo-alvéoles glandulaires. Les hormones lactogènes induisent la différenciation des cellules épithéliales en acini, productrices de lait. Lors du sevrage, l'accumulation de produit de sécrétion provoque la dislocation de l'épithélium mammaire. Des enzymes protéolytiques telles que les gélatinases sont activées. La matrice extracellulaire est ainsi digérée et le tissu sécréteur est dégradé par les macrophages (adapté d'Espié et Gorins, 2001 ; images issues du site <http://mammary.nih.gov/reviews/development/>).



## **I. B. Le cancer du sein : maladie multifactorielle**

Le cancer du sein est le cancer le plus répandu dans la population féminine. En dépit des progrès réalisés ces dernières années en termes de diagnostic et d'innovations thérapeutiques, cette pathologie demeure la première cause de mortalité par cancer chez les femmes dans le monde (Kamangar *et al.*, 2006). De par sa fréquence, cette maladie représente donc une préoccupation majeure de santé publique. Une meilleure prise en charge du cancer du sein passe par une amélioration combinée de la prévention, du dépistage, des tests diagnostiques et par une compréhension des mécanismes de progression tumorale et de résistance aux traitements. Répondre à ces attentes reste cependant complexe en raison de l'hétérogénéité moléculaire, histologique et clinique des tumeurs mammaires.

### **I. B. 1. Données épidémiologiques**

Dans le monde, plus de 1.150.000 nouveaux cas de cancer du sein surviennent chaque année, dont environ 580.000 dans les pays développés où il est plus fréquent qu'en Afrique ou en Asie. Il est responsable chaque année de plus de 410.000 décès (Kamangar *et al.*, 2006 ; Porter, 2009). En France, il représente plus d'un nouveau cas de cancer sur 3 sur l'ensemble des cancers dépistés dans la population féminine. Une étude clinique a estimé qu'en 2006, près de 50.000 nouveaux cas ont été diagnostiqués et 11 631 décès ont été liés à cette pathologie, représentant ainsi 20 % des décès féminins par cancer (Guérin *et al.*, 2009). L'âge moyen d'apparition du cancer du sein est d'environ 60 ans.

Alors que l'incidence du cancer du sein n'a cessé de croître ces dernières décennies (avec une augmentation de 74 % entre 1980 et 2005), la mortalité diminue de 1 % par an depuis 1993. Cette donnée reflète en partie les progrès thérapeutiques, avec une proportion de plus en plus importante de cancers du sein diagnostiqués et soignés avec succès. De plus, l'amélioration des techniques d'imagerie et le dépistage systématique du cancer du sein à partir de l'âge de 50 ans ont permis incontestablement d'améliorer la prise en charge précoce des patientes. Dans ce contexte, plus de la moitié des femmes âgées de 50 à 74 ans ont réalisé une mammographie en 2007 dans notre pays (Séradour *et al.*, 2010).

Les chiffres de l'incidence du cancer du sein en France, publiés ces deux dernières années, semblent également favorables, mais ce bilan positif ne concerne que les femmes de plus de 55 ans (Allemand *et al.*, 2008 ; Séradour *et al.*, 2010). Les auteurs révèlent ainsi que le taux

d'incidence a baissé de 14,7 % pour des femmes âgées de 55 à 59 ans et de 12,6 % pour des femmes âgées de 60 à 64 ans, entre 2003 et 2007. Un phénomène similaire a été décrit aux Etats-Unis et en Suède. Cette tendance à la diminution est expliquée par l'arrêt de l'utilisation des traitements hormonaux substitutifs (THS).

Le cancer du sein peut survenir aussi chez l'homme, mais il est rare (moins de 1 % des cas).

## **I. B. 2. Les facteurs de risques**

Plusieurs études épidémiologiques et expérimentales menées à travers le monde ont mis en évidence des facteurs environnementaux, nutritionnels et génétiques intervenant dans l'étiologie du cancer du sein.

### ***I. B. 2. a) Age***

L'âge est le facteur de risque le plus important du cancer du sein. La maladie est rare chez les femmes de moins de 30 ans ; plus de 50 % des cas sont observés après 65 ans. Il existe cependant des cancers survenant chez des femmes plus jeunes et environ 15 à 20 % des cancers du sein sont diagnostiqués avant 50 ans. Dans cette tranche d'âge, on retrouve plus fréquemment les cancers familiaux avec mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Institut National du Cancer).

### ***I. B. 2. b) Facteurs environnementaux et habitudes alimentaires***

Les chiffres d'incidence et de mortalité varient en fonction de la situation géographique ; l'incidence la plus élevée étant notée en Europe du Nord et en Amérique du Nord, la plus basse dans les pays en développement et au Japon. Les migrations géographiques ont permis de démontrer le rôle essentiel des facteurs environnementaux dans l'incidence du cancer du sein. En effet, les populations asiatiques migrantes aux Etats-Unis et notamment les Japonais présentent au bout de 2 à 3 générations le même profil épidémiologique que la population locale. Il en est de même pour des personnes jeunes ayant émigré d'un pays à bas risque, ce qui traduit une corrélation entre la pathologie et le mode de vie dès le plus jeune âge.

L'alcool est le seul facteur nutritionnel de risque établi. Ce risque augmente d'environ 7 % pour une consommation moyenne d'une boisson alcoolisée par jour, alors que le tabac ne semble pas présenter de lien avec l'incidence du cancer du sein.

La surcharge pondérale joue un rôle différent en fonction du statut ménopausique. L'obésité augmente d'environ 50 % le risque de cancer du sein chez les femmes ménopausées, probablement en raison d'une hyperœstrogénie sérique (Key *et al.*, 2001). Cependant, l'obésité après la ménopause est un facteur de risque bien circonscrit et indépendant de la pathologie ; elle peut ainsi être évitée par une activité physique régulière, composante majeure du maintien de l'équilibre énergétique, et qui semble ainsi réduire le risque d'apparition de la maladie dans cette tranche de la population féminine (Pan et DesMeules, 2009).

### ***I. B. 2. c) Vie génitale***

Plusieurs études incriminent l'âge précoce des premières règles (avant l'âge de 12 ans) et une ménopause tardive (après 55 ans). Il n'a jamais été démontré que ces deux paramètres relevaient d'un même facteur causal, mais il semblerait que le risque soit lié à une exposition prolongée des hormones ovariennes sur l'épithélium mammaire (Key *et al.*, 2001).

L'âge de la première grossesse (avant 30 ans) et la multiparité jouent quand à eux un rôle protecteur. Les effets de l'allaitement ne semblent pas tout à fait avérés, hormis pour un allaitement long de plus de deux ans. Selon certaines études, la lactation engendre des changements hormonaux endogènes, en particulier une réduction de la production d'œstrogènes et une augmentation de prolactine, qui diminueraient la durée d'exposition globale aux œstrogènes. L'allaitement diffère également la reprise de l'ovulation et maintient la glande mammaire sous une forme hautement différenciée, la mettant à l'abri des carcinogènes.

Les effets de la contraception orale sont controversés (Casey *et al.*, 2008 ; Kahlenborn *et al.*, 2008), alors que les traitements hormonaux substitutifs présentent un risque avéré (Suhrke *et al.*, 2009).

### ***I. B. 2. d) Antécédents familiaux***

L'histoire familiale est associée, de manière régulière, à un risque accru de cancer du sein. Le risque est d'autant plus marqué chez les jeunes femmes et lorsque la maladie s'est développée chez une proche parente (mère, fille ou sœur), avant l'âge de 50 ans (Pharoah *et al.*, 1997). Ainsi, 7 à 10 % des cas sont à composante héréditaire, et dus notamment à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs *BRCA1* et *BRCA2* (*Breast Cancer Susceptibility 1 et 2*) (Miki *et al.*, 1994 ; Futreal *et al.*, 1994 ; Wooster *et al.*, 1995 ; Couch *et al.*, 1996). Le fait d'évoluer dans le même environnement, d'avoir le même style de vie et un patrimoine génétique com-

mun, ajouté à l'instabilité génomique en rapport avec les mutations des gènes *BRCA1* et *BRCA2*, expliquerait en partie le risque accru de cancer du sein associé à l'origine familiale.

### ***I. B. 2. e) Antécédents de pathologie mammaire bénigne***

Les maladies bénignes du sein représentent un facteur de risque de cancer du sein. Elles sont histologiquement divisées en deux groupes : les lésions non prolifératives et les lésions prolifératives avec ou sans atypie. Les lésions non prolifératives ne sont généralement pas associées à un risque accru. A l'inverse, les lésions prolifératives sans atypie multiplient le risque par deux, tandis que les lésions hyperplasiques avec atypie augmentent ce risque au moins d'un facteur cinq (Key *et al.*, 2001). Ces déficiences dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire pourraient expliquer la prédisposition des patientes à développer ultérieurement un cancer.

En conclusion le cancer du sein apparaît comme une maladie multifactorielle. Une identification des facteurs de risques sur lesquels il est possible d'agir, telle que la surcharge pondérale, et une meilleure connaissance des mécanismes de tumorigenèse en cause, pourraient faciliter la mise en œuvre de stratégies efficaces de prévention.

## **I. B. 3. La tumorigenèse mammaire**

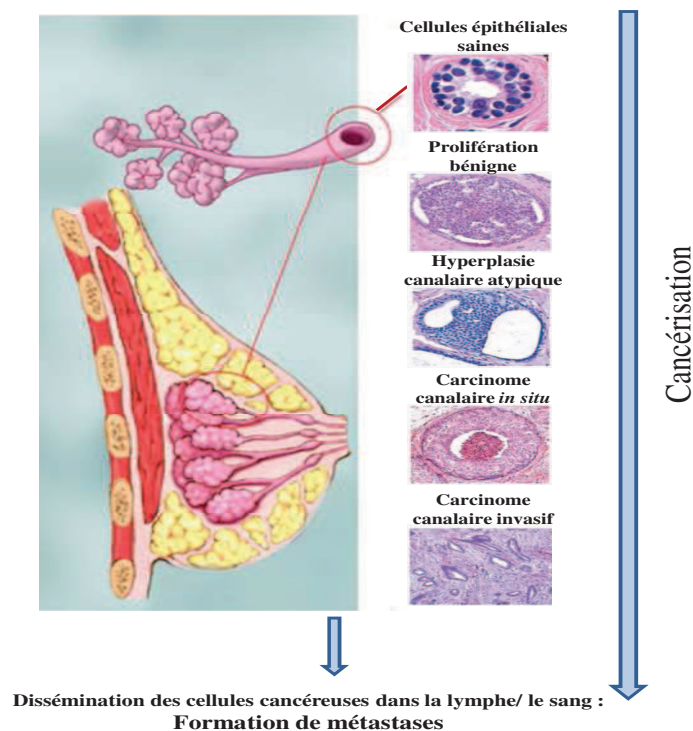
### ***I. B. 3. a) Les étapes du développement tumoral***

La carcinogenèse mammaire est le résultat d'une succession d'étapes contribuant à la transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse, sous l'influence d'une multitude de facteurs tels que les agents environnementaux, les facteurs physiologiques (facteurs de croissance, hormones, cytokines...) ou encore les altérations génétiques. La transformation de la cellule est suivie de son expansion clonale et de sa croissance en masse tumorale ou cancer primaire. Les cellules cancéreuses envahissent ensuite progressivement les tissus adjacents au niveau local puis se disséminent dans l'organisme par rupture de la membrane basale pour former des métastases.

Plusieurs étapes successives participent au processus de cancérisation de l'épithélium mammaire, schématisées dans la **figure 6** :

## Introduction bibliographique

- L'hyperplasie : lors de l'initiation, une cellule saine d'un canal ou lobule mammaire est génétiquement modifiée et se multiplie de manière anarchique.
- La dysplasie : les cellules se différencient et continuent à proliférer en présentant des modifications structurales et fonctionnelles. Ce stade n'est décrit qu'au niveau épithélial (dysplasie et hyperplasie sont notées comme des lésions précancéreuses).
- Le carcinome *in situ* : les cellules épithéliales cancéreuses prolifèrent uniquement au niveau local, dans la lumière de la glande, sans franchir la membrane basale. Les cellules myoépithéliales présentent des altérations épigénétiques et phénotypiques et leur nombre diminue ; dans le même temps, les fibroblastes, les lymphocytes et les cellules endothéliales du stroma prolifèrent.
- Le carcinome infiltrant ou invasif : la perte de l'intégrité de la membrane basale permet aux cellules tumorales d'envahir le tissu conjonctif.
- Les métastases : les cellules néoplasiques essaient à partir de la tumeur primaire *via* les voies lymphatiques ou sanguines et colonisent ainsi un ou des organes distants.



**Figure 6 : Les différentes étapes de la cancérisation dans le cas d'un carcinome canalaire mammaire.** Sous l'influence de divers signaux, d'altérations génétiques et épigénétiques, les cellules épithéliales mammaires vont proliférer de manière anarchique jusqu'au stade de l'hyperplasie atypique. Les cellules se différencient, acquièrent de nouvelles propriétés structurales et prolifèrent au niveau local, donnant ainsi naissance à un carcinome *in situ*. Dans certains cas, les cellules sont capables de franchir la membrane basale et forment un cancer invasif puis métastatique. (images adaptées et issues du site [www.bccancer.bc.ca](http://www.bccancer.bc.ca) et de la publication de Burstein et de ses collaborateurs (Burstein *et al.*, 2004).

### ***I. B. 3. b) Les caractéristiques des tumeurs mammaires***

- Les différents types de cancer du sein

Les études anatomo-pathologiques ont mis en évidence l'existence de différents types de cancer du sein. Les tumeurs mammaires peuvent ainsi être dans un premier temps classées en tumeurs bénignes et tumeurs malignes.

Les tumeurs bénignes sont bien limitées et encapsulées. Elles présentent une croissance lente et locale ; elles récidivent en général après exérèse. Parmi celles-ci, on note les adénofibromes (hyperplasie d'un ou plusieurs lobules mammaires) et les tumeurs phyllodes (1% des tumeurs de sein).

Les tumeurs malignes sont quand à elles mal limitées, irrégulières et non encapsulées. Les cellules présentent une croissance rapide, anarchique et tendent à infiltrer les tissus adjacents. Environ 95 % des tumeurs malignes mammaires sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire un cancer développé à partir de l'épithélium glandulaire mammaire. Ces adénocarcinomes se développent soit à partir des cellules formant les canaux (carcinome canalaire), soit à partir des cellules des lobules glandulaires (carcinome lobulaire). Ces carcinomes peuvent ensuite être subdivisés selon leurs caractéristiques d'infiltration du stroma sous-jacent. On distingue ainsi les carcinomes *in situ* non invasifs et les carcinomes infiltrants ou invasifs.

#### **✓ Les carcinomes *in situ* (non infiltrants) :**

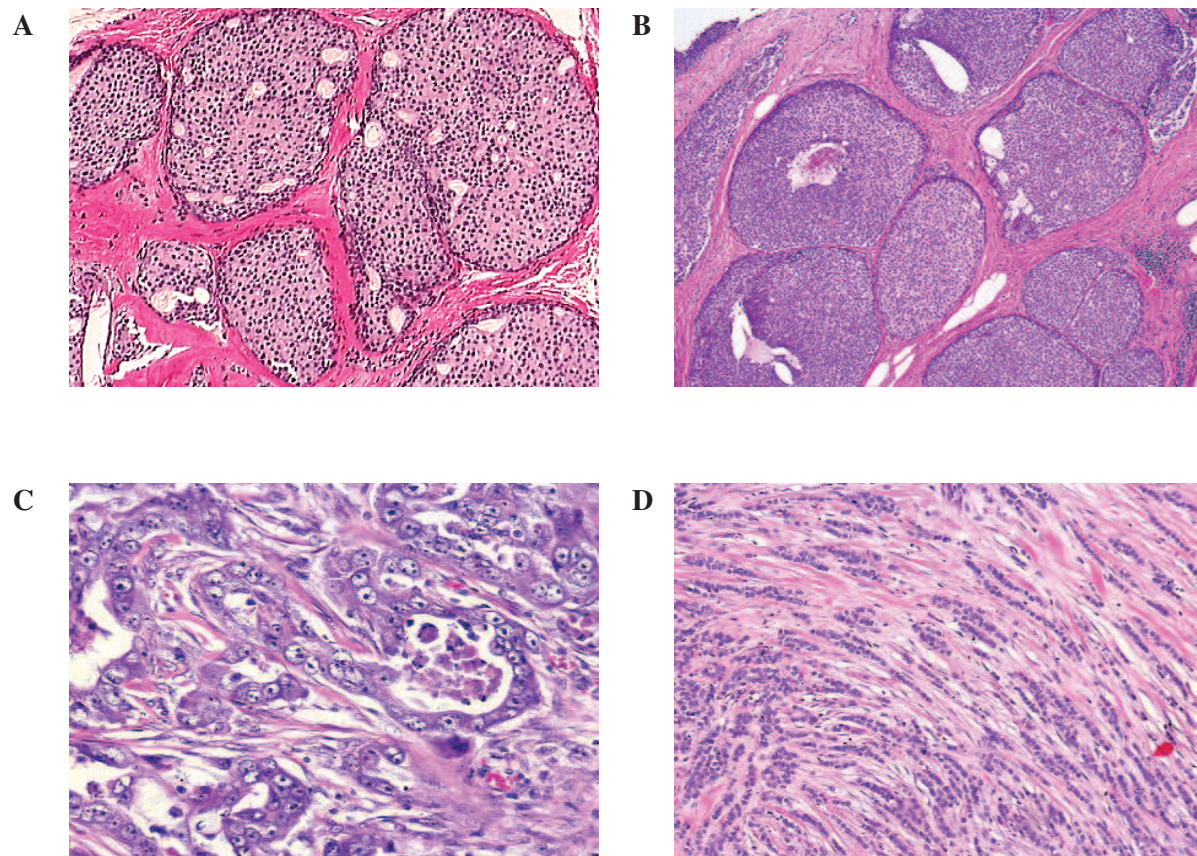
Les carcinomes de sein *in situ* représentent environ un quart des cancers diagnostiqués. Cette proportion est en constante augmentation du fait du développement du dépistage du cancer du sein et de la généralisation de la mammographie.

Ces tumeurs *in situ* sont localisées dans les canaux et sont appelées canalaire (CCIS) ou dans les lobules et sont dits lobulaires (CLIS). La prolifération maligne des cellules épithéliales s'effectue dans la lumière du canal galactophorique ou au niveau des acini des lobules, sans envahir le tissu conjonctif environnant. Les CCIS sont de bon pronostic et les CLIS sont généralement bilatéraux et évoluent dans 20 à 50 % des cas vers une forme infiltrante.

#### **✓ Les carcinomes infiltrants (ou invasifs) :**

Les carcinomes infiltrants représentent environ les trois quarts des cancers diagnostiqués. Ces cancers ont la propriété d'envahir les tissus conjonctifs, évoluant localement puis métastasant. On distingue également différentes formes selon l'aspect histologique des biopsies (**Fi-**

gure 7). Ces carcinomes sont le plus souvent canaux (80 % des cas) ou lobulaires (5 %). D'autres formes plus rares sont associées à un meilleur pronostic de survie des patientes : la maladie de Paget du mamelon, les carcinomes médullaire, tubuleux, mucineux, cribriforme, papillaire infiltrant, adénoïde kystique, apocrine, sécrétant ou encore métaplasique.



**Figure 7 : Coupes anatomo-pathologiques représentant les principaux types de carcinomes mammaires.** Les carcinomes canalaire *in situ* (A) et lobulaire *in situ* (B) sont caractérisés par une prolifération non contrôlée des cellulaires mammaires dans la lumière du canal galactophorique et des acini des canalicules lobulaires, respectivement. Les carcinomes canalaire invasif (C) ou lobulaire infiltrant (D) présentent quand à eux une dégradation de la membrane basale et un envahissement du stroma sous-jacent par les cellules cancéreuses. Les coupes histologiques ont été marquées à l'aide des colorants hématoxyline et éosine (images issues du site [www.gfmer.ch](http://www.gfmer.ch)).

- Les métastases des cellules cancéreuses de sein

Le cancer du sein est une pathologie à évolution lente : il faut en effet compter 6 à 8 ans pour qu'apparaisse une tumeur de 1 cm<sup>3</sup>, décelable par mammographie. Ce cancer est caractérisé par l'apparition fréquente de foyers tumoraux secondaires. En effet, les cellules néoplasiques des carcinomes de type invasif peuvent envahir le stroma et le tissu mammaire environnant et essaimer *via* le réseau lymphatique, ou sanguin. Les premiers relais ganglionnaires colonisés par les cellules cancéreuses de sein sont les ganglions axillaires, localisés au niveau des aisselles, suivis des ganglions de la chaîne thoracique interne et sous-claviculaires (**Figure 3**). Cet envahissement est le prémice de la généralisation du cancer du sein et du développement des métastases secondaires au niveau des os, des poumons, de la plèvre, de la peau, du foie et du cerveau. La survie des patientes est d'autant diminuée que le nombre de ganglions envahis et de métastases apparues est important (Cocconi, 1995).

Ces données reflètent donc bien les challenges actuels des chercheurs : découvrir des marqueurs fiables des tumeurs mammaires primaires utilisables pour un dépistage précoce ainsi que des marqueurs biologiques de dissémination et d'implantation des cancers secondaires agressifs et de mauvais pronostic.

- Classification des cancers du sein

- ✓ La classification anatomo-clinique ou classification TNM.

La classification TNM est un système international, validé en 1953 comme base de classification par le comité de nomenclature et de statistiques de l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer). Elle est communément utilisée par les praticiens et se fonde sur l'extension anatomique de la tumeur déterminée par la clinique et l'histopathologie. Cette classification concerne les carcinomes et contribue à évaluer le pronostic de la maladie et à déterminer le traitement à prescrire. Les trois lettres utilisées symbolisent la propagation de la pathologie sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N) et à distance pour d'éventuelles métastases (M). Chaque lettre est affectée d'un coefficient, qui est fonction de la gravité du cancer du sein (Espié et Gorins, 2001). La lettre T symbolise la tumeur primaire. Elle est notée de T0 (quand la lésion primitive n'est pas retrouvée) à T4 pour les tumeurs les plus étendues. Cette cotation dépend du volume tumoral, représenté par le diamètre maximal de la lésion, et de la fixation aux organes voisins (peau, côte, muscles intercostaux, grand den-



telé). La lettre N, de N0 à N3, dépend du territoire ganglionnaire, plus ou moins proche de la tumeur, des dimensions des adénopathies, de leur nombre et de leur fixation éventuelle aux tissus voisins. La lettre M est annotée M0 en l'absence de métastases connues ou M1 en leur présence, quel que soit leur siège, unique ou multiple. La juxtaposition de ces 3 lettres chiffrées donne une description abrégée de l'extension de la tumeur maligne. La combinaison de ces variables permet également d'établir le stade du cancer du sein (de 0 à IV), qui reflète son agressivité (**Tableau 1**).

Ces analyses sont complétées par d'autres facteurs pronostiques tels que le grade histopronostique, la taille anatomique de la tumeur, l'âge, le statut hormonal de la patiente et la présence de récepteurs hormonaux.

**Tableau 1: Classification du cancer du sein par stade, en fonction des observations TNM.**

<b>Stade</b>	<b>Description</b>
0	Cancer <i>in situ</i> (non invasif)
I	La tumeur a une taille $\leq$ à 2 cm, absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional
II	La tumeur mesure de 2 à 5 cm et/ou atteinte ganglionnaire satellite mineure
III	Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure, absence de métastase
IV	Tumeur avancée localement et métastases à distance

La classification TNM a contribué pendant de nombreuses années à codifier les indications de traitement pour les cliniciens. Malheureusement, ce système rend insuffisamment compte de l'hétérogénéité évolutive de la maladie, conduisant souvent à des traitements inadaptés. Cette inadaptation coïncidant avec la disponibilité croissante de nouvelles drogues anti-cancéreuses, il a été nécessaire d'améliorer la classification pronostique pour déterminer de nouveaux marqueurs, affiner les indications thérapeutiques et améliorer la survie globale des patientes.

✓ La classification moléculaire

Face aux limites des approches classiques, les recherches se sont tournées vers une caractérisation moléculaire globale, détaillée et objective de la maladie à l'aide des analyses génomiques à haut débit, notamment par l'analyse du transcriptome sur puces à ADN. Ces techniques ont tout d'abord été utilisées pour décrire les différences d'expression génique entre le tissu tumoral invasif et le tissu mammaire sain. Ces analyses non supervisées ou *clustering* ont permis de définir des classes de tumeurs sur la base de leur similitude en terme d'expression génique, indépendamment de toute donnée histologique ou clinique *a priori*. Une fois définies, des corrélations ont été recherchées entre ces classes de tumeurs et les paramètres histologiques et cliniques. C'est par cette approche, appliquée à un jeu de 496 gènes sélectionnés parmi 8.102 testés et à une série de cancers du sein localement avancés, qu'une équipe de Stanford a défini 5 sous-types de tumeurs, entités biologiques différentes les unes des autres retrouvées dans les diverses populations ethniques (Perou *et al.*, 2000 ; Sorlie *et al.*, 2001 ; Sotiriou *et al.*, 2003).

On distingue ainsi :

- **Le type luminal** : il est le sous-groupe le plus représenté (34-66 % des cancers du sein), correspondant à des cancers généralement de bas grade qui expriment les récepteurs hormonaux (œstrogènes et progestérone) et les cytokératines (CK) 8/18. Ces tumeurs présentent un profil d'expression proche de celui décrit pour les cellules épithéliales lumineales et sont subdivisées en deux sous-types, en fonction du profil d'expression génique et de la survie des patientes.

- **Luminal A** (19-39 % des cancers du sein) : de bon pronostic et de faible grade, avec une expression très importante du récepteur aux œstrogènes.

- **Luminal B ou C** (10-23 %) : ce groupe présente une forte expression des gènes de prolifération cellulaire et anti-apoptotique en comparaison au sous-type A ; il est de grade plus élevé et de pronostic moins favorable expliquant les différences de réponse aux traitements hormonaux.

Les tumeurs mammaires négatives pour l'expression des récepteurs hormonaux (30-45 %) peuvent quant à elles être divisées en trois sous-types :

- **Triple-négatif** (15-20 %) : dans ce groupe, on note une absence d'expression à la fois du récepteur aux œstrogènes (ER), du récepteur à la progestérone (PR) et du récepteur à activité tyrosine kinase Her2 (ErbB2). Le type nommé *basal-like* est un sous-groupe des tumeurs triple-négatives hétérogènes (Rakha *et al.*, 2009 ; Seal et Chia, 2010). Il présente un profil

## Introduction bibliographique

d'expression proche de celui des cellules myoépithéliales basales, avec une forte expression des gènes de prolifération cellulaire et des CK 5/6 et 17. Une mutation de la protéine p53 a également été décrite dans 82 % des cas ainsi que du gène *BRCA1*. Ces tumeurs sont de grade III et de mauvais pronostic.

- ***ERBB2/HER2+*** (4-10 %) : ces tumeurs sur-expriment un groupe de gènes de l'amplicon 17q22.24 dont *ERBB2* et p53 est mutée dans 71 % des cas. Elles sont de grade III.

- ***Normal breast-like*** (10 %) : Ce groupe présente des caractéristiques en commun avec le tissu mammaire normal mais aussi avec les cellules non épithéliales du microenvironnement tumoral. Ce dernier sous-type reste encore mal défini.

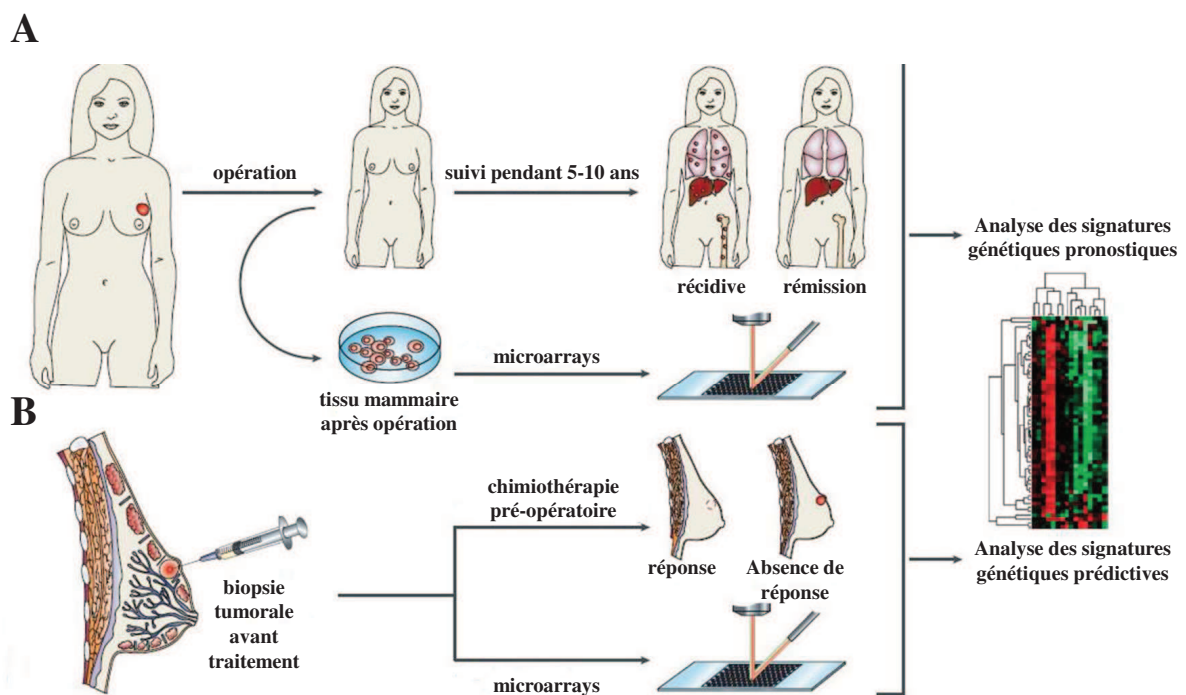
Ces groupes et leurs corrélations histo-cliniques ont été validés sur un nombre important de tumeurs (Sorlie *et al.*, 2003 ; Carey *et al.*, 2006) (**Tableau 2**), puis ont été identifiés dans des carcinomes *in situ* et dans le cancer du sein inflammatoire, renforçant leur robustesse et leur universalité. Cependant, l'origine et l'apparition de chacun de ces sous-types n'est à ce jour pas encore clairement défini, même si certaines hypothèses portent sur l'existence de cellules souches cancéreuses et sur un modèle hiérarchique du développement de la tumeur de sein (cf. paragraphe II.B.3.c) (Polyak, 2007 ; Sims *et al.*, 2007 ; Melchor et Benítez, 2008 ; Shipitsin et Polyak, 2008).

**Tableau 2 : Caractéristiques moléculaires utilisées en immunocytochimie pour différencier les différents sous-types de cancer du sein** (adapté de Mullan et Millikan, 2007).

Sous-types de tumeurs mammaires	Marqueurs immunocytochimiques
<i>Luminal de type A</i>	ER+ et/ou PR+ ; HER2-
<i>Luminal de type B</i>	ER+ et/ou PR+ ; HER2+
<i>Basal-like</i>	ER-, PR-, HER2- ; CK 5/6+; CK14+; EGFR+
<i>ERBB2/HER2+</i>	HER2+, ER-, PR-
<i>Normal breast-like</i>	Négatif pour les 5 marqueurs précédents

Ces dernières années, des recherches transcriptomiques ont permis d'identifier des signatures pronostiques ou prédictives de la réponse thérapeutique, dont certaines sont actuellement en phase de validation dans des essais cliniques prospectifs (**Figure 8**). Ces études permettent d'associer les signatures génétiques des tumeurs mammaires avec, entre autres, la survie, que le patient ait ou non reçu un traitement adjuvant (van de Vijver *et al.*, 2002 ; Pawitan *et al.*, 2005), avec la récurrence tumorale et métastatique ou encore avec la réponse aux traitements systématiques (chimiothérapie, hormonothérapie) (Sotiriou et Piccart, 2007 ; Driouch *et al.*, 2007).

Les puces à ADN ont ainsi marqué un tournant dans l'approche du cancer du sein, offrant un outil essentiel pour disséquer la complexité moléculaire des tumeurs, et probablement améliorer la prise en charge des patientes dans les années à venir.



**Figure 8 : Identification de signatures pronostiques ou prédictives dans le cancer du sein par la technique des puces à ADN.** Les ARN sont extraits d'échantillons mammaires collectés pendant l'opération chirurgicale (A) ou avant le traitement (B), marqués avec un marqueur fluorescent et hybridés avec un microarray contenant des sondes spécifiques des gènes d'intérêt. **A.** Analyse des signatures génétiques pronostiques à partir de tumeurs prélevées lors de l'opération chirurgicale, et comparées à la présence ou l'absence de récurrence. **B.** Analyse des signatures prédictives à partir d'échantillons de tumeurs mammaires prélevés avant traitement, et comparées à la réponse au traitement (d'après Sotiriou et Piccart, 2007).

### I. B. 3. c) Mécanismes de la tumorigenèse mammaire

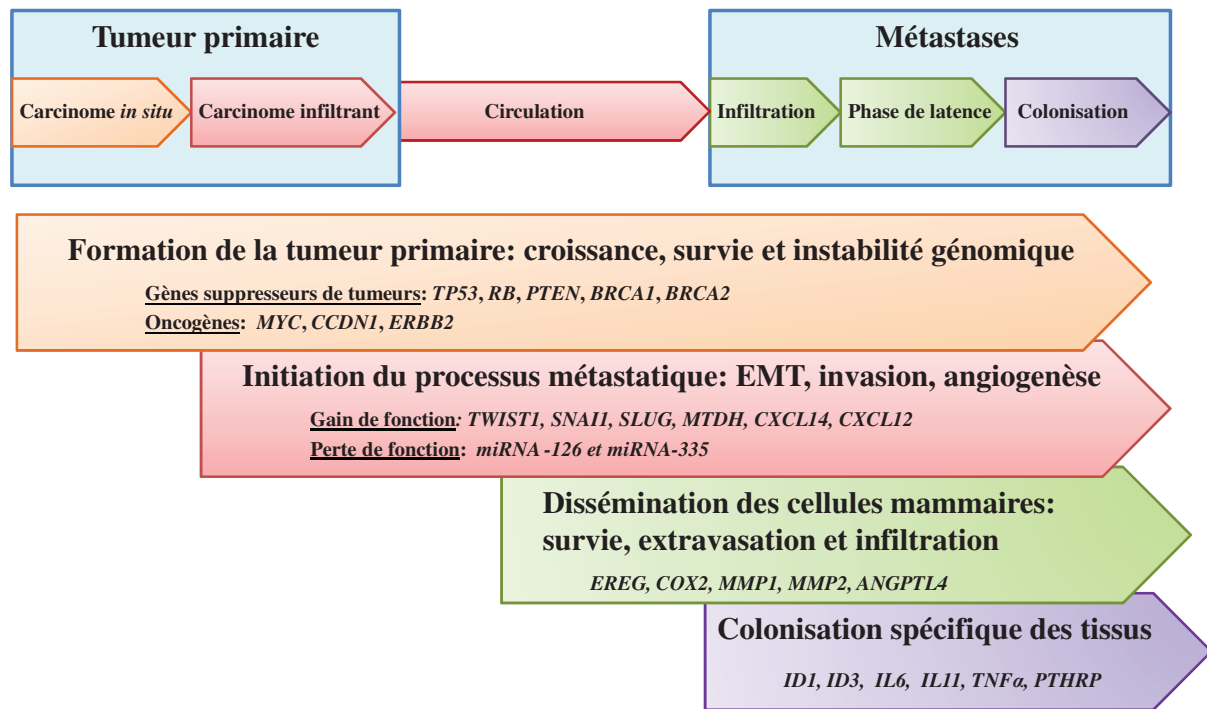
Comme nous l'avons vu précédemment, le cancer du sein est une pathologie évolutive multifactorielle au cours de laquelle l'influence de facteurs exogènes et endogènes, liée à une succession d'altérations géniques, confèrent aux cellules des avantages sélectifs menant à la transformation de cellules saines en cellules tumorales. La complexité du cancer peut se résumer en « six altérations essentielles dans la physiologie de la cellule », décrites par Hanahan et Weinberg, qui permettent à la cellule d'acquies sa malignité : indépendance par rapport aux signaux de croissance cellulaire, perte de la sensibilité vis-à-vis des signaux anti-prolifératifs, échappement à l'apoptose, potentiel répliatif illimité, conversion angiogénique, invasion et métastase (Hanahan et Weinsberg, 2000). Ce schéma est discuté aujourd'hui ; certains préférant regrouper d'un côté les altérations liées à la formation de la tumeur primaire, qu'elle soit bénigne ou maligne, et d'un autre côté, l'invasion tissulaire et la formation des métastases, corrélées au mauvais pronostic du cancer du sein (Lazebnik, 2010) (**Figure 9**).

L'instabilité génomique peut être reliée aux altérations citées précédemment. Les altérations géniques les plus fréquemment décrites dans le cancer du sein correspondent à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou, au contraire, à l'activation d'oncogènes par amplification génique (Thompson et Easton, 2004).

- Formation de la tumeur primaire : lien entre croissance, survie et instabilité génomique

✓ Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs agissent à différents niveaux de la vie de la cellule. On les subdivise en 3 groupes : les garants de la stabilité du génome (*caretakers* tels que *TP53*, *BRCA1/2*), les inhibiteurs de la croissance cellulaire (*gate-keepers* tels que *RB*, *PTEN*) et les modulateurs du microenvironnement tumoral (*landscapers* tel que *CDH1*) (**Figure 9**). Selon le modèle de Knudson, il est nécessaire que les deux allèles d'un gène suppresseur de tumeurs soient altérés pour que la fonction de régulation négative de la prolifération cellulaire soit perdue (Knudson, 1993). Ces dernières années, des études ont montré que la perte monoallélique d'un gène suppresseur de tumeurs dans des modèles murins peut être suffisante pour mener à la tumorigenèse (Ma *et al*, 2005).



**Figure 9 : De la tumeur primaire mammaire aux métastases : les gènes associés aux différents processus.** Les étapes basiques de la formation de métastases incluent l'évolution d'un carcinome *in situ* vers un stade invasif au cours duquel les cellules cancéreuses mammaires envahissent le stroma sous-jacent puis se disséminent dans l'organisme par la lymphe ou les vaisseaux sanguins. Ces événements sont liés à un ensemble d'altérations géniques touchant, entre autres, des gènes suppresseurs de tumeurs ou des oncogènes. D'autres modifications génétiques et épigénétiques sont ensuite nécessaires pour permettre aux cellules mammaires circulantes d'infiltrer le parenchyme cervical, pulmonaire ou osseux, de survivre en phase de latence, et de coloniser des organes spécifiques, donnant ainsi naissance à des tumeurs secondaires (adapté de Nguyen *et al.*, 2009).

Plusieurs gènes sont mutés dans le cancer du sein.

La protéine p53 est une protéine anti-oncogénique essentielle, communément désignée comme la "gardienne de la stabilité du génome". Ces fonctions sont multiples : p53 joue un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation des lésions moléculaires ou encore dans la sénescence et l'induction de l'apoptose (Levine et Oren, 2009). 25 % des tumeurs mammaires présentent une mutation du gène *TP53*, associée à un mauvais pronostic de survie des patientes notamment dans les tumeurs de type ER- et PR- (IARC *TP53* database, Novembre 2009 ; Olivier *et al.*, 2006). L'inactivation de p53 induit une augmentation de la prolifération et la probabilité de la transformation maligne des cellules mammaires en raison d'une déficience dans le processus apoptotique. De plus, une mutation de la protéine p53 et une dé-

régulation de l'expression des protéines anti-apoptotiques peuvent induire une résistance à la chimiothérapie (Bertheau *et al.*, 2008).

La protéine Rb (*Retinoblastoma protein*) intervient dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire. Des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation de Rb par les complexes cycline-cdk permettent de libérer/séquestrer respectivement le facteur de transcription E2F, faisant de Rb un médiateur essentiel de la signalisation antiproliférative. Plusieurs études ont démontré une expression aberrante de *RB* dans 20 % à 35 % des cancers du sein, en raison d'une perte d'hétérozygotie ou d'une perte totale de son expression (Bosco et Knudsen, 2007a). La perte de fonction de Rb compromet les points clefs du cycle cellulaire, contribuant ainsi à une prolifération anarchique des cellules. Les études menées par l'équipe de Knudsen ont permis de montrer que les tumeurs mammaires présentant une déficience en Rb résistent aux anti-mitogènes des thérapies hormonales et sont associées à une récurrence rapide de la maladie après un traitement par le tamoxifène (Bosco *et al.*, 2007b).

La protéine PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) participe à la régulation du cycle de division cellulaire en déphosphorylant notamment les phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphates (PtdIns (3,4,5) $P_3$  ou PIP $_3$ ). Son action est antagoniste de la phosphatidyl-inositol 3-OH kinase (PI3-kinase ou PI3K), requise pour l'activation de la protéine de signalisation intracellulaire Akt. Environ 40 % des patientes atteintes de cancer du sein présentent une mutation du gène *PTEN*, ce qui peut engendrer une activation constitutive des protéines Akt et mTOR et, par conséquent, une prolifération et une survie cellulaire non contrôlées. De manière intéressante, une diminution « subtile » de *PTEN* (de 20 % par rapport à l'expression dans des souris *Wild Type*) est suffisante pour augmenter l'expression de la forme phosphorylée d'Akt, diminuer la survie de souris immunodéprimées et induire le développement spécifique de tumeurs mammaires (Alimonti *et al.*, 2010).

Les gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont des gènes suppresseurs de tumeurs dont la mutation prédispose aux cancers du sein, mais également à celui de l'ovaire, du pancréas et de la prostate. Ces gènes sont associés aux formes familiales et par conséquent utilisés dans la prévention du cancer du sein héréditaire (Metcalf *et al.*, 2008 ; Bordeleau *et al.*, 2010). Les protéines BRCA sont directement impliquées dans la réparation des cassures de l'ADN, le maintien de la stabilité du génome, l'activité transcriptionnelle d'autres gènes suppresseurs de tumeurs et dans le contrôle du cycle cellulaire *via* leur interaction avec les protéines rad51, p53 et l'ARN polymérase II (Yoshida et Miki, 2004 ; Rosen *et al.*, 2006 ; Buck, 2008).

✓ Activation d'oncogènes

Les protéines codées par les oncogènes stimulent à la fois la prolifération, la survie, l'invasion et la migration des cellules cancéreuses (**Figure 9**). Ce sont des facteurs de croissance (HGF/SF ou *Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor*), des récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR, c-Met), des protéines des voies de signalisation (Ras, Src), des acteurs de la survie cellulaire (Bcl-2), des régulateurs du cycle cellulaire (cycline D1, cdk) ou encore des facteurs de transcription (c-Myc, Rel). Dans le cancer du sein, les oncogènes sont principalement activés par amplification génique ; les mutations ponctuelles, les insertions ou les réarrangements géniques étant moins observés.

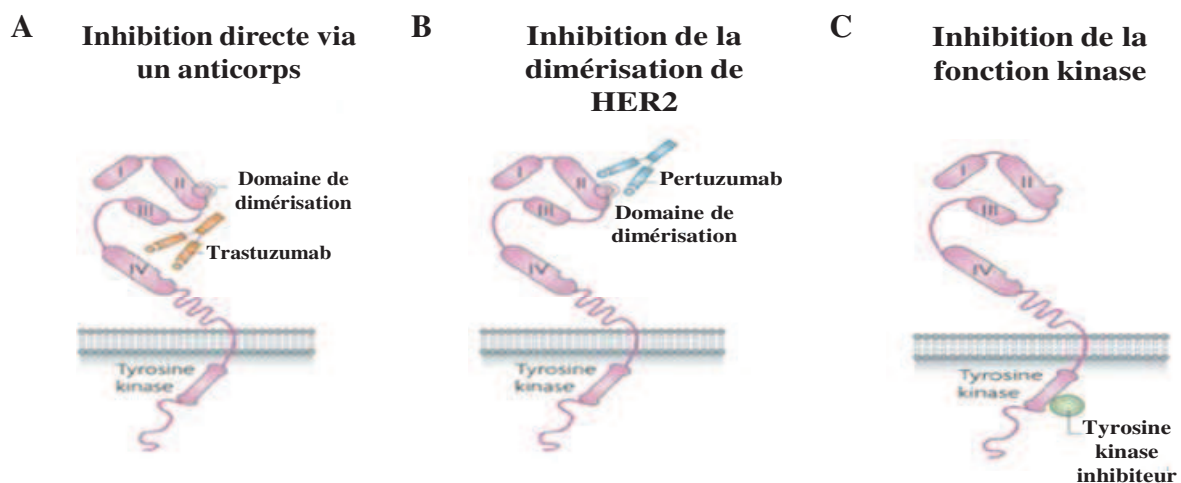
Les altérations génétiques liées au gène *MYC* ont été les premières décrites dans le cancer du sein (Escot *et al.*, 1986). *c-myc* est un facteur de transcription impliqué dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la survie et l'apoptose. *MYC* est amplifié par duplication dans environ 20 % des cancers du sein, sa fréquence d'amplification étant d'autant plus élevée dans les tumeurs de type basal, envahissant les ganglions axillaires, ainsi que dans les tumeurs présentant des altérations du gène *BRCA1* décrit précédemment (Chen et Olopade, 2008 ; Nikolsky *et al.*, 2008).

Le gène *CCND1* ou *PRDA1* code pour la cycline D1, qui régule le passage G1/S et G2/M du cycle cellulaire. Ce gène est amplifié dans 13 à 20 % des carcinomes mammaires. De manière intéressante, la cycline D1 est surexprimée dans 50 % des cancers du sein, en présence ou en l'absence d'amplification génique (Arnold et Papanikolaou, 2005). L'expression de cette protéine peut alors être dérégulée par des mécanismes de régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle anormaux. Une surexpression de la cycline D1 est associée à un grade histopronostique élevé, une expression importante de la cycline A et de la protéine Ki67 dans les tumeurs ER+, alors qu'elle est associée à un faible grade et à une faible expression de Ki67 dans les tumeurs mammaires ER- (Aaltonen, 2009). Il a été démontré que la surexpression de la cycline D1 seule, tout comme celle de *c-myc*, n'a pas de pouvoir oncogénique suffisant et nécessite des événements additionnels pour transformer une cellule saine en cellule tumorale.

Le gène *c-ERBB2* est le 3<sup>ème</sup> gène le plus amplifié dans le cancer du sein. Il code pour le récepteur à activité tyrosine kinase Her2 ou ErbB2, de la famille de l'EGFR. Sa surexpression à la surface de 25 à 30 % des tumeurs primaires mammaires induit la dimérisation et la transphosphorylation constitutive du récepteur (Owens *et al.*, 2004). L'activation des voies de signalisation qui en découle, Ras/MAPK, PI3K/Akt, PLC $\gamma$ 1/PKC et JAK/STAT, conduit à la



formation de la tumeur primaire ainsi qu'à une résistance aux traitements hormonaux et à la chimiothérapie (Sergina et Moasser, 2007). De par son implication dans la tumorigenèse, le récepteur Her2 constitue une cible de premier intérêt dans la thérapie anti-cancéreuse. Des outils thérapeutiques innovants, basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-Her2, sont utilisés ou ont atteint la phase III d'essais cliniques chez des patientes atteintes de cancer du sein (**Figure 10**). Ainsi, le Trastuzumab (ou Herceptine), anticorps monoclonal murin recombinant et humanisé, réprime la croissance tumorale et augmente la survie des patientes lorsqu'il est combiné à une chimiothérapie (Slamon *et al.*, 2001 ; Romond *et al.*, 2005). De nouvelles générations d'agents ciblant Her2 et notamment des inhibiteurs de sa fonction kinase comme le Lapatinib sont actuellement en cours de développement (**Figure 10**) (Baselga et Swain, 2009). Il est intéressant de noter que le locus 17q12-q21, dont fait partie *ERBB2*, contient également le gène *TOPO2* codant la topoisomérase II alpha. Il s'avère que celui est également amplifié dans une majorité de tumeurs de sein HER2+. De nouvelles approches thérapeutiques combinant inhibiteurs de HER2 et de TOPO2 sont envisagées (Järvinen et Liu, 2006).



**Figure 10 : Approches thérapeutiques visant à inhiber la croissance tumorale mammaire en ciblant la signalisation du récepteur HER2.** Le récepteur HER2 ou ERBB2 est composé de trois domaines fonctionnels : une partie extracellulaire avec 4 domaines distincts, un segment transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. A l'heure actuelle, le ligand spécifique de HER2 est inconnu ; le récepteur existe dans une configuration « ouverte », disponible pour sa dimérisation. **A.** L'anticorps Trastuzumab se lie directement au domaine IV de la partie extracellulaire du récepteur HER2, réprimant ainsi l'activation des voies de signalisation associées, le clivage du domaine extracellulaire et favorisant les réactions immunitaires par une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps. **B.** Un autre anticorps monoclonal anti-HER2, le Pertuzumab, se lie directement au domaine II de la région extracellulaire. La fixation de l'Ac inhibe la dimérisation du récepteur, élément clef de l'activation de celui-ci. **C.** Inhibition de la fonction kinase intracellulaire de HER2 par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques tels que le Lapatinib (adapté de Baselga et Swain, 2009).

✓ Régulation épigénétique

La cancérisation d'un épithélium mammaire est causée en premier lieu par une série de sélections clonales liées à des changements d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs et d'oncogènes. Il est désormais établi que des modifications épigénétiques peuvent également conduire à une instabilité chromosomique et à des réarrangements responsables de la carcinogénèse, notamment dans le cancer du sein. Ces altérations incluent des modifications telles que l'hypométhylation de l'ADN et l'hypoacétylation de la chromatine, ainsi que des hypométhylations et hyperméthylations spécifiques de gènes (Feinberg et Tycko, 2004 ; Tlsty *et al.*, 2004).

De nombreux gènes sont hyperméthylés dans le cancer du sein, en comparaison au tissu sain. Ils peuvent être impliqués dans l'apoptose (*RASSF1A*, *HOXA5*, *TWIST1*), le contrôle de la prolifération cellulaire (*CCND2*, *p16*, *BRCA1*, *RARβ*), la croissance (*ERα*, *PGR*) ou encore l'invasion (*CDH1*). Ces gènes sont à la fois hyperméthylés dans la tumeur primaire, mais également dans les cellules du microenvironnement tumoral (Agrawal *et al.*, 2007).

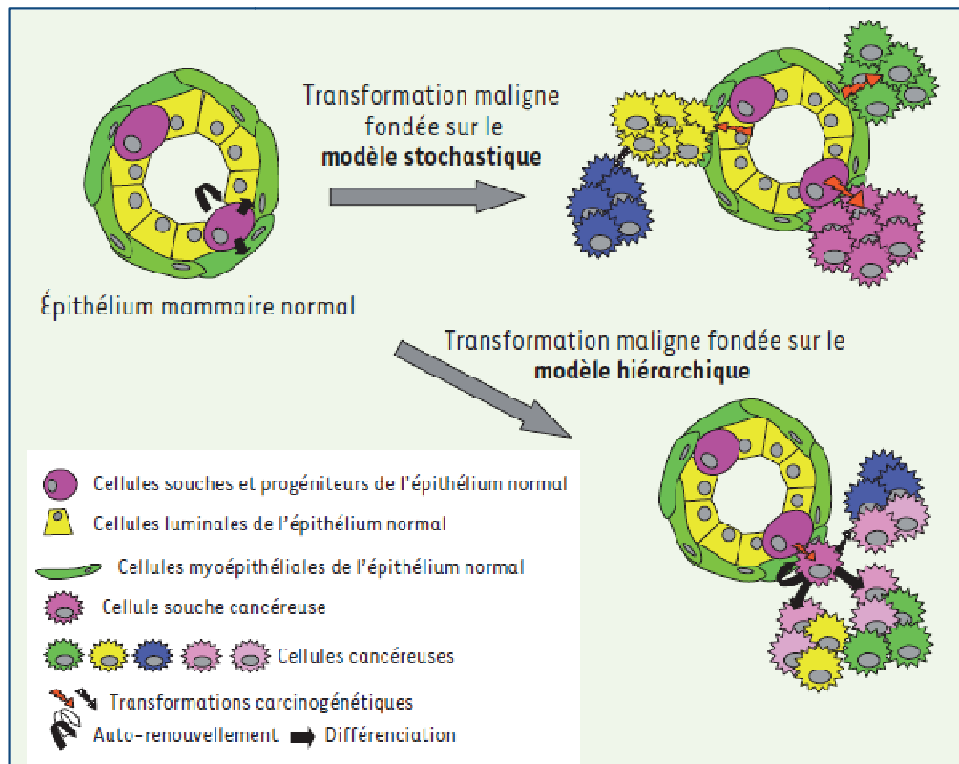
Des modifications épigénétiques jouent également un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des petits ARN non codants, ou microRNA (miRNA), pouvant eux-mêmes contribuer à l'évolution de la tumeur primaire, et notamment participer au processus d'invasion et de métastase (cf. paragraphe II.B.3.c). Ainsi, une hyperméthylation aberrante des miRNA9-1, miRNA-124, miRNA-148, miRNA-152 et miRNA-663 a été démontrée dans une série de 71 tumeurs primaires mammaires (Lehmann *et al.*, 2008 ; Veeck et Esteller, 2010).

✓ Le concept des cellules souches

Depuis quelques années, un concept définit une nouvelle classe de cellules mammaires ayant des propriétés de renouvellement illimité, de différenciation et un potentiel tumorigène présent *a priori* dans les tumeurs solides : il s'agit des cellules souches cancéreuses.

Ce nouveau modèle diffère en quelque sorte du concept de l'évolution clonale appelé modèle stochastique dans lequel la tumeur primaire serait la conséquence de l'accumulation de modifications génétiques et épigénétiques d'une cellule saine, même différenciée, conduisant à son expansion et à sa sélection clonale (Nowell, 1976). Cette théorie de l'évolution clonale peut cependant difficilement expliquer l'hétérogénéité des tumeurs mammaires décrite précédemment. Dans le modèle des cellules souches cancéreuses ou modèle hiérarchique, seule une cellule souche ou progénitrice peut engendrer la formation d'une tumeur primaire, suite à

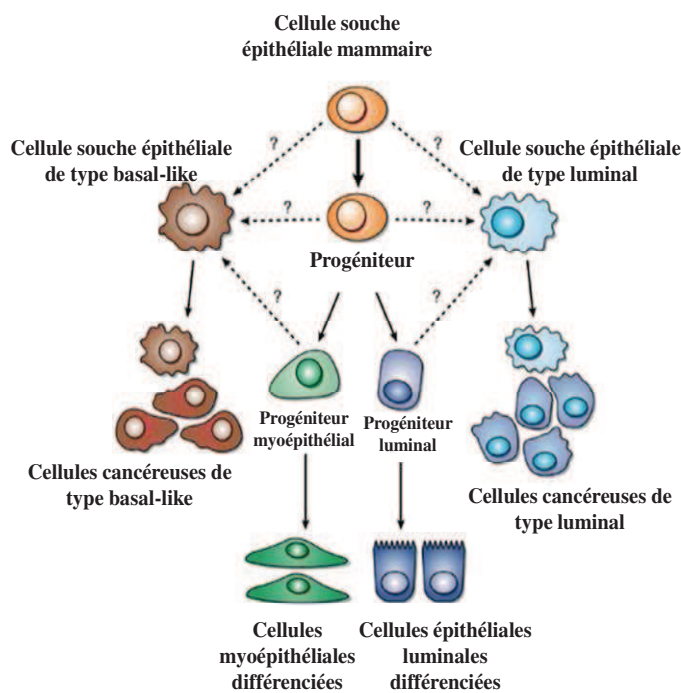
l'acquisition d'une ou plusieurs altérations génétiques (**Figure 11**). Ces deux théories ne sont pas mutuellement exclusives. En effet, les cellules filles différenciées à partir d'une cellule souche peuvent à leur tour acquérir de nouvelles mutations ou des modifications épigénétiques, conduisant à leur sélection, à la progression et à l'invasion tumorale. Ainsi, les propriétés caractéristiques des cellules souches cancéreuses vont être celles des cellules souches épithéliales mammaires adultes, c'est-à-dire auto-renouvellement, longue durée de vie, capacité à reproduire l'hétérogénéité tissulaire, auxquelles s'ajoutent d'autres propriétés acquises à la suite des altérations génétiques, comme la prolifération continue et l'autonomie vis-à-vis de la « niche » environnementale. L'auto-renouvellement (intrinsèque ou acquis dans le cas des progéniteurs) est un élément clé lors de l'initiation de l'oncogenèse où l'expansion des cellules souches cancéreuses permettra de former le pool initial de la tumeur.



**Figure 11 : Les hypothèses expliquant la transformation maligne et l'hétérogénéité tumorale.** Deux hypothèses modélisant la transformation maligne ont été proposées afin d'expliquer l'hétérogénéité tumorale régnant au sein d'une tumeur solide. D'une part, le modèle stochastique dans lequel chaque cellule de l'épithélium mammaire peut être transformée et former un clone tumoral composé de cellules qui ont toutes la capacité de proliférer de façon indéfinie et d'évoluer en réponse à l'accumulation de nouvelles altérations oncogéniques. D'autre part, le modèle hiérarchique dans lequel seule une cellule souche ou progénitrice peut être la cible de l'oncogenèse. Ainsi, seules les cellules souches cancéreuses prolifèrent de manière anarchique et donneront naissance à l'hétérogénéité tumorale en contrôlant la différenciation (d'après Ginestier *et al.*, 2007).

Les cellules souches cancéreuses ont tout d'abord été mises en évidence dans les leucémies, et ce n'est que récemment qu'elles ont été isolées dans une variété de tumeurs solides (Visvader et Lindeman, 2008). Les cellules souches cancéreuses mammaires, hautement tumorigènes, sont  $CD44^+$  et  $CD24^{-/low}$  et expriment fortement l'aldéhyde déshydrogénase, enzyme clef du métabolisme de l'acide rétinolique. Elles représentent 1 à 10 % de la tumeur de sein. Un tout petit nombre (200) de ces cellules cancéreuses  $CD44^+/CD24^{-/low}$  forment une tumeur primaire après injection dans des souris SCID, alors que 20.000 cellules mammaires ne possédant pas ce phénotype en sont incapables (Al-Hajj *et al.*, 2003). Les tumeurs ainsi formées reproduisent l'hétérogénéité phénotypique décrite dans la tumeur d'origine. Les voies de signalisation telles que les voies Wnt, Notch, Hedgehog et du TGF- $\beta$  sont spécifiquement activées dans les cellules souches cancéreuses de sein, et cette dernière semble particulièrement impliquée dans l'induction du caractère malin (Shipitsin *et al.*, 2007).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe II.B.3.b), les tumeurs mammaires sont désormais classées selon leur expression moléculaire en type *luminal* ou *basal-like*. Sur la base de cette classification et de l'hypothèse des cellules souches, un nouveau modèle tente d'expliquer l'apparition des différentes tumeurs mammaires ; il est présenté en **figure 12**. Cependant, de nombreux points restent à éclaircir.



**Figure 12 : Différenciation épithéliale mammaire normale et tumorale.** À partir de cellules souches épithéliales mammaires et leurs descendants immédiats (progéniteurs bipotents prolifératifs), deux lignages cellulaires se développent, aboutissant à des cellules matures différenciées. Le lignage luminal comprend les cellules acineuses capables de produire le lait pendant la lactation. Le lignage myoépithélial entoure les cellules précédentes et comprend des cellules différenciées exprimant des marqueurs du muscle lisse. Des altérations génétiques peuvent toucher les cellules souches ou les progéniteurs conduisant à la formation d'une tumeur composée de cellules immatures si les capacités de différenciation sont limitées (tumeurs basales) ou de cellules progressant le long du lignage luminal (tumeurs de type luminal) (adapté de Shipitsin et Polyak, 2008).

- Invasion et métastases

Un ensemble d'altérations génétiques et épigénétiques favorise donc la formation de la tumeur primaire de sein. D'autres altérations sont nécessaires pour induire le passage d'un carcinome *in situ* à un carcinome invasif puis le tropisme des cellules mammaires vers les organes-cibles (os, foie, poumon et cerveau). Ces dernières années, l'équipe de Massagué s'est intéressée à définir les gènes impliqués dans le processus métastatique et les a regroupés en 3 classes : les gènes initiateurs de la métastase, les gènes de la dissémination et ceux impliqués dans la colonisation spécifique des tissus (Nguyen *et al.*, 2009) (**Figure 9**). Alors qu'un cancer du sein localisé est généralement guérissable, la survie des patientes atteintes d'un cancer généralisé est nettement moindre, les traitements étant plus palliatifs que curatifs. Ces études fondamentales permettent ainsi de cibler les signatures génétiques des cellules mammaires métastatiques et d'envisager à l'avenir des thérapies plus ciblées.

- ✓ Les gènes initiateurs du processus métastatique

Ces gènes codent pour des éléments qui permettent aux cellules tumorales mammaires, aux capacités prolifératives illimitées, de franchir la membrane basale et d'envahir le stroma sous-jacent. Ils sont exprimés par les cellules épithéliales cancéreuses elles-mêmes, mais également par les cellules qui composent le microenvironnement tumoral (cellules myoépithéliales, fibroblastiques, immunitaires et endothéliales). Ces gènes peuvent promouvoir la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), la motilité cellulaire, la dégradation de la matrice extracellulaire, le recrutement de progéniteurs endothéliaux et favoriser l'angiogenèse ainsi que l'échappement au système immunitaire.

A titre d'exemple, la surexpression des facteurs de transcription Twist, Snail1 et Slug, codés respectivement par les gènes *TWIST1*, *SNAI1* et *SLUG*, favorise l'EMT des cellules épithéliales tumorales mammaires en réprimant de manière aberrante l'expression de la molécule d'adhérence E-cadhérine (Yang *et al.*, 2004 ; Yang et Weinberg, 2008).

L'amplification génique de *MTDH* (également appelé *AEGI*), codant la molécule d'adhérence métadhérine, est observée dans 40 % des tumeurs mammaires et favorise l'invasion et la formation de métastases pulmonaires, ainsi qu'une résistance à la chimiothérapie *via* une activation du récepteur à l'HGF (Hu *et al.*, 2009).

Les cellules myoépithéliales et les myofibroblastes du microenvironnement tumoral régulent positivement des facteurs impliqués dans la migration, l'invasion, l'angiogenèse et la dégrada-

tion de la matrice extracellulaire. Elles produisent des chimiokines (CXCL12 et CXCL14) qui se fixent spécifiquement sur leurs récepteurs exprimés par les cellules épithéliales tumorales, augmentant leur migration et leur prolifération. En parallèle, elles sécrètent des métalloprotéases qui dégradent la matrice extracellulaire et favorise l'invasion (Allinen *et al.*, 2004).

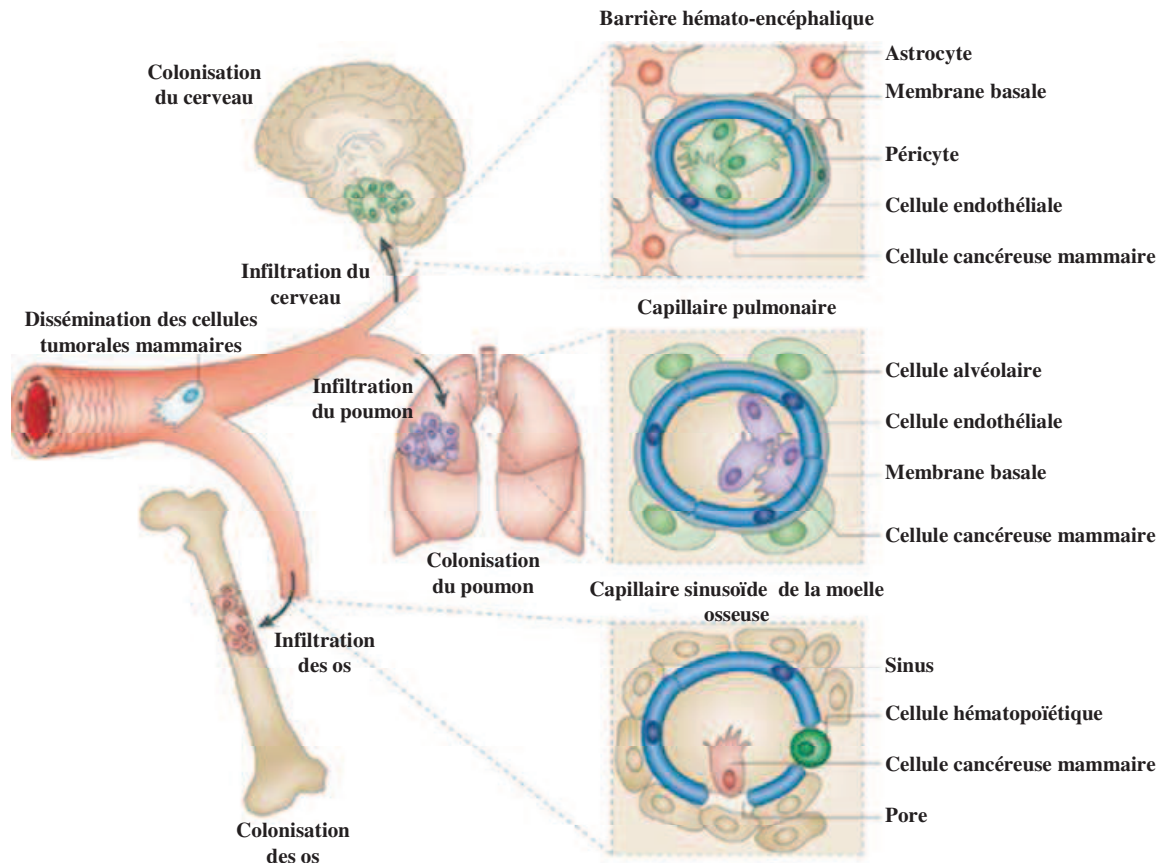
Dans le cancer du sein, ce processus est également initié par l'inhibition de l'expression des micro-ARN non codants, les miRNA-126 et miRNA-335 (Tavazoie *et al.*, 2008).

✓ Les gènes impliqués dans la dissémination

La dissémination des cellules tumorales requiert 3 étapes essentielles : l'intravasation dans les vaisseaux lymphatiques ou sanguins, la survie dans la circulation et l'extravasation au niveau des capillaires d'un organe distant (**Figure 13**).

Le gène *CD82* (ou *KAI1*) est un gène suppresseur de métastases. Il code pour la protéine de surface CD82, de la famille des tétraspanines. La molécule CD82 interagit spécifiquement avec l'antigène DARC (*Duffy Antigen Chemokine Receptor*), exprimé à la surface des cellules endothéliales, ce qui provoque en conditions physiologiques l'inhibition de l'infiltration par sénescence des cellules (Bandyopadhyay *et al.*, 2006). La perte d'expression de la molécule CD82 dans les carcinomes mammaires infiltrants favorise ainsi la dissémination et l'infiltration des cellules de sein (Yang *et al.*, 2000).

L'extravasation nécessite l'acquisition de fonctions particulières par les cellules cancéreuses, au vu des différences architecturales des capillaires cérébraux, pulmonaires ou encore osseux (**Figure 13**). L'expression combinée de l'épiréguline (ligand de l'EGFR), de la cyclooxygénase COX2 et des métalloprotéases MMP1 et MMP2 est nécessaire pour favoriser la circulation et l'extravasation des cellules tumorales mammaires au niveau des capillaires continus pulmonaires (Gupta *et al.*, 2007a). De plus, la production de cytokine Angptl4 (*Angiopoietin-like 4*), stimulée par le TGF- $\beta$  du microenvironnement tumoral, permet l'extravasation en dissociant les jonctions entre les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires (Padua *et al.*, 2008).



**Figure 13 : Infiltration des cellules tumorales mammaires au niveau de la barrière hémato-encéphalique, des capillaires continus pulmonaires et des capillaires sinusoides de la moelle osseuse.** Dans le cas d'un carcinome de type invasif, les cellules cancéreuses mammaires peuvent essayer à partir de la tumeur primaire *via* la circulation sanguine et infiltrer des organes distants. Ce dernier événement nécessite l'acquisition de propriétés particulières par les cellules tumorales disséminées. En effet, la structure fenêtrée des capillaires sinusoides de la moelle osseuse est plus permissive à l'extravasation des cellules cancéreuses que les capillaires continus des capillaires pulmonaires. Les capillaires cérébraux sont beaucoup plus difficiles à pénétrer, en raison de la structure particulière de la barrière hémato-encéphalique (d'après Nguyen *et al.*, 2009).

- ✓ Les gènes impliqués dans la colonisation spécifique des tissus

L'étape d'extravasation est suivie d'une phase de latence plus ou moins longue dans le cancer du sein (de quelques années voire décennies), pendant laquelle les cellules cancéreuses mammaires résident dans le parenchyme des organes distants en l'état de dormance. De récentes études ont démontré que la colonisation des organes et le développement de macrométastases nécessitent des altérations génétiques et épigénétiques des cellules tumorales disséminées mais aussi du microenvironnement.

Ainsi, l'expression des gènes *ID1* et *ID3*, codant des facteurs de transcription inhibiteurs de la différenciation, permet aux cellules cancéreuses disséminées du sous-type *basal* d'échapper à

la sénescence et initie la croissance de foyers tumoraux secondaires après extravasation dans les poumons de souris immunodéprimées (Gupta *et al.*, 2007b ; Swarbrick *et al.*, 2008).

La formation de métastases osseuses nécessitent la production de facteurs activateurs par les cellules mammaires disséminées, tels que les interleukines IL-6 et IL-11, le TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ), et le PTHRP (*Parathyroid Hormone-Related Protein*). Ces facteurs stimulent l'expression du ligand RANKL (*Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand*) par les ostéoblastes du tissu osseux, qui en retour stimule la genèse des ostéoclastes. Les ostéoclastes dégradent la matrice osseuse, libérant un ensemble de facteurs (TGF- $\beta$ , IGF1) qui, par une boucle de régulation paracrine, stimulent et entretiennent la croissance de la macrométastase osseuse (Mundy, 2002).

- *ST6GALNAC5* et les métastases cérébrales

Les métastases cérébrales affectent environ 10 à 15 % de patientes atteintes de cancer du sein au stade métastatique (Weil *et al.*, 2005). En raison de la structure particulière de la barrière hémato-encéphalique, l'extravasation de cellules tumorales circulantes combinée à la colonisation du tissu cérébral nécessitent l'acquisition de fonctions particulières par les cellules mammaires. De manière intéressante, Bos et ses collaborateurs ont montré que le gène *ST6GALNAC5* favorise spécifiquement le phénomène d'extravasation au niveau des capillaires cérébraux. Exprimé uniquement au niveau du cerveau, *ST6GALNAC5* code pour une sialyltransférase impliquée dans la biosynthèse des gangliosides de la série  $\alpha$ . Sa néo-expression par les cellules mammaires cancéreuses favorise l'adhérence de celles-ci au niveau des cellules endothéliales cérébrales et leur passage au travers la barrière hémato-encéphalique (Bos *et al.*, 2009). Cet exemple apporte un regard nouveau sur la fonction des glycosyltransférases dans le processus de cancérisation et notamment dans le développement des métastases et la colonisation spécifique des organes.



## **II. LES ANOMALIES DE GLYCOSYLATION DE SURFACE DANS LE CANCER DU SEIN**

La glycosylation apparaît comme l'une des modifications majeures des protéines et des lipides. Cette modification covalente consiste en l'ajout séquentiel d'un ou d'une série de monosaccharides, par l'action combinée de différentes glycosyltransférases et de glycosidases des voies de sécrétion, à l'origine de la grande diversité des chaînes glycaniques portées par les glycoprotéines et les glycolipides. Ces structures jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques. Ainsi, à la surface des cellules, les glycoconjugués sont directement impliqués dans les interactions cellule-cellule ou cellule-matrice, l'antigénicité, le développement et la différenciation cellulaire, mais aussi dans diverses pathologies (Varki *et al.*, 2009).

### **II. A. Les antigènes glucidiques associés aux tumeurs**

#### **II. A. 1. Description**

Au cours du développement tumoral apparaissent des changements de structure et d'organisation des glycoconjugués à la surface cellulaire, qui se traduisent par l'apparition d'Antigènes Glucidiques Associés aux Tumeurs (AGAT). Ces AGAT résultent le plus souvent d'un changement d'expression de certaines enzymes golgiennes responsables de leur biosynthèse: les glycosyltransférases (GTs).

Ainsi, une activité accrue de la *N*-acétylglucosaminyltransférase V (GlcNAc-TV codée par le gène *MGTA5*) est associée à la propagation du cancer *via* une augmentation du branchement en  $\beta$ 1,6 de résidus de *N*-acétylglucosamine sur des *N*-glycannes (Dennis *et al.*, 1987 ; Kim et Varki, 1997 ; Yao *et al.*, 1998 ; Lau et Dennis, 2008). En effet, l'inoculation de cellules épithéliales pulmonaires surexprimant stablement la GlcNAc-TV provoquent l'apparition de tumeurs primaires chez des souris *Nude*, alors qu'aucune tumeur n'apparaît pour des inoculations de cellules contrôle (Demetriou *et al.*, 1995). En parallèle, des modèles murins *Mgat5*<sup>-/-</sup> développent un nombre moins important de métastases et présentent une durée de vie plus élevée que des souris *Mgat5*<sup>+/+</sup>. Cette réduction est corrélée à une inhibition de l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt au niveau de la tumeur primaire (Granovsky *et al.*, 2000). De telles structures tri- et tétra-antennées sont exprimées au niveau du domaine extracellulaire

des récepteurs à l'EGF et au TGF- $\beta$ , stabilisent ces derniers par des interactions avec la glectine-3 membranaire et condamnant alors leur endocytose. L'expression aberrante de *MGAT5* au niveau de carcinomes mammaires favorise la prolifération, l'EMT par une perte d'expression de la E-cadhérine et facilite également la motilité cellulaire, le phénomène d'extravasation *in vivo* et le développement de métastases chez des souris immunodéprimées (Partridge *et al.*, 2004 ; Lau *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que l'expression du gène *MGTA5* et de la glycosyltransférase GlcNAc-TV associée sont sous le contrôle d'oncogènes tels que H-Ras et Src (Kang *et al.*, 1996 ; Buckhaults *et al.*, 1997).

Une synthèse incomplète des chaînes glycaniques, avec accumulation de précurseurs des O-glycannes tels que l'antigène sialyl-Tn (sTn) porté par la mucine MUC1, peut également être corrélée à l'agressivité tumorale et à une diminution de la survie globale des patients dans le cancer de l'ovaire, du pancréas, du colon ou encore du sein (**Tableau 3** ; Nakagoe *et al.*, 2001 ; Soares *et al.*, 1996 ; Julien *et al.*, 2006).

Finalement, la néosynthèse d'antigènes aberrants dits oncofœtaux, dont l'expression est normalement restreinte aux tissus embryonnaires, a été décrite lors du processus de transformation cancéreuse et résulte d'une modification de l'expression des enzymes impliquées dans leur synthèse (Dube et Bertozzi, 2005).

Ces changements de glycosylation de surface ont été décrits pour de très nombreux types de tumeurs (**Tableau 3**) et sont généralement associés à un mauvais pronostic de survie pour des patients atteints de cancer. Les AGAT peuvent être mis en évidence à des fins diagnostiques ou pronostiques à l'aide d'anticorps monoclonaux et de lectines spécifiques mais également par l'analyse de l'expression des glycosyltransférases responsables de leur biosynthèse (Recchi *et al.*, 1998 ; Hebbar *et al.*, 2003).

Il est intéressant de noter que la majorité des épitopes glucidiques associés aux tumeurs portent un ou plusieurs résidus d'acide sialique (acide *N*-acétylneuraminique ou Neu5Ac) en position terminale non réductrice de leurs chaînes glycaniques. A titre d'exemple, les antigènes sialyl-Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>), sialyl-Lewis<sup>a</sup> (sLe<sup>a</sup>) et sialyl-Tn (sTn) sont surexprimés dans différents cancers tels que le cancer du pancréas, du côlon, du sein ou encore le cancer du poumon à petites cellules (**Tableau 3**).

**Tableau 3 : Expression des AGAT dans différents types de cancers** (adapté de Zhang *et al.*, 1997a ; Zhang *et al.*, 1997b ; Dube et Bertozzi, 2005 ; Niederhafner *et al.*, 2008).

AGAT	Tissus cancéreux									
	Epithélial								Neuroectodermal	
	Ovaire	Pan-créas	Sang	Sein	Colon	Prostate	Estomac	Poumon	Mélanome	Neuroblastome
sLe <sup>x</sup>		X		X	X				X	
sLe <sup>a</sup>		X		X	X		X	X		
sialyl-Tn	X	X		X	X	X		X		
TF	X			X	X	X				
Le <sup>y</sup>	X	X		X	X	X	X	X		
Globo H	X	X		X	X	X		X		
PSA		X	X	X				X		X
G <sub>D2</sub>	X		X					X	X	X
G <sub>D3</sub>								X	X	X
Fucosyl G <sub>M1</sub>								X		
G <sub>M2</sub>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

sLe<sup>x</sup> ou sialyl-Lewis<sup>x</sup> : Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4[Fuca1-3]GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-R

sLe<sup>a</sup> ou sialyl-Lewis<sup>a</sup> : Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3[Fuca1-4]GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-R

sTn ou sialyl-Tn : Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-O-glycoprotéine

TF (Thomsen-Friedenreich antigen) ou T: Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-O-glycoprotéine

Le<sup>y</sup> ou Lewis<sup>y</sup> : Fuca1-2Gal $\beta$ 1-4[Fuca1-3]GlcNAc $\beta$ 1-R

Globo H : Fuca1-2Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-R

PSA : (Neu5Ac $\alpha$ 2-8)<sub>n</sub>Neu5Ac $\alpha$ 2-3/6-R

G<sub>D3</sub> : Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ -4Glc $\beta$ 1-1Cer

G<sub>D2</sub> : GalNAc $\beta$ 1-4[Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-3]Gal $\beta$ -4Glc $\beta$ 1-1Cer

G<sub>M2</sub> : GalNAc $\beta$ 1-4[Neu5Ac $\alpha$ 2-3]Gal $\beta$ -4Glc $\beta$ 1-1Cer

Fucosyl-G<sub>M1</sub>: Fuca1-2Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4[Neu5Ac $\alpha$ 2-3]Gal $\beta$ -4Glc $\beta$ 1-1Cer

## II. A. 2. Antigènes sialylés et cancer

### II. A. 2. a) Biosynthèse

La biosynthèse des motifs sialylés résulte de l'activité d'une famille particulière de glycosyltransférases impliquée dans la glycosylation terminale : les sialyltransférases. Ces enzymes golgiennes catalysent la réaction de transfert d'un résidu d'acide sialique à partir de sa forme activée, l'acide cytidyl-monophospho-*N*-acétylneuramique (CMP-Neu5Ac), sur l'extrémité terminale non réductrice d'une chaîne glycannique, portée soit par un glycolipide, soit par une *N*- ou *O*-glycosylprotéine. A ce jour, 20 gènes de sialyltransférases ont été identifiés et clonés chez l'Homme. Toutes ces enzymes utilisent le CMP-Neu5Ac comme substrat donneur mais diffèrent par leur spécificité de substrat accepteur (Harduin-Lepers *et al.*, 2005).

Les structures sialylées sont retrouvées :

- au niveau des glycannes des *N*-glycosylprotéines de type *N*-acétyllactosaminique ou de type hybride ; dans ce cas, les résidus d'acide sialique se trouvent en position terminale non réductrice des "antennes" qui substituent le noyau pentasaccharidique.
- au niveau des glycannes des *O*-glycosylprotéines. La sialylation peut intervenir au tout début de la biosynthèse des chaînes oligosaccharidiques conduisant à la synthèse de structures "courtes" sialylées telles que l'antigène sialyl-Tn (Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr) ou les antigènes sialyl-T (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr ou Gal $\beta$ 1-3[Neu5Ac $\alpha$ 2-6]GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr) et disialyl-T (Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3[Neu5Ac $\alpha$ 2-6]GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr).
- au niveau d'une famille particulière de glycosphingolipides : les gangliosides.

### ***II. A. 2. b) Exemples d'AGAT dans les cancers***

Les AGAT sialylés sont étudiés et décrits depuis de nombreuses années. Bien que chaque AGAT semble agir de façon particulière sur les cellules cancéreuses, plusieurs auteurs ont montré qu'une augmentation globale du taux de sialylation à la surface cellulaire favorise les capacités invasives et la dissémination de ces cellules (Tokuyama *et al.*, 1997 ; Sawada *et al.*, 2002).

A titre d'exemple, le sLe<sup>a</sup> (également marqueur sérique CA 19-9) et le sLe<sup>x</sup> sont des épitopes reconnus par certaines molécules d'adhérence ou d'inflammation telles que la molécule inducible E-sélectine. Ils jouent alors un rôle significatif dans l'adhérence des cellules tumorales circulantes aux cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et participent aux phénomènes d'extravasation lors du processus métastatique par voie sanguine (Takada *et al.*, 1993 ; Kannagi *et al.*, 2004). Inhiber les interactions sélectine-glycane par l'utilisation d'anticorps spécifiques ou de séquences de siRNA ciblant le récepteur CD44v4 constitue actuellement des perspectives de recherche thérapeutique (Kannagi *et al.*, 2004 ; Zen *et al.*, 2008 ; Ragupathi *et al.*, 2009).

Les PSA (*PolySialic Acid*) représentent un autre exemple d'AGAT sialylés. Il s'agit de polymères linéaires d'acides sialiques liés en  $\alpha$ 2-8, le nombre de résidus d'acides sialiques pouvant varier pendant le développement embryonnaire et chez l'homme adulte. Les chaînes de PSA fortement sialylées présentes sur la molécule d'adhérence N-CAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) sont exprimées dans plusieurs tissus fœtaux humains et sont généralement ré-exprimées dans les néoplasmes correspondants. Ainsi, leur présence a été détectée dans les

tumeurs malignes d'origine neuro-ectodermique telles que le méduloblastome, le neuroblastome et le glioblastome et leur expression est associée à l'invasion tumorale (Suzuki *et al.*, 2005 ; Amoureux *et al.*, 2010). Les formes polysialylées de la protéine N-CAM interagissent avec la E-cadhérine à la surface cellulaire, inhibant ainsi les interactions cellule-cellule et favorisant significativement la dissémination de cellules tumorales pancréatiques ou pulmonaires chez des souris immunodéprimées (Daniel *et al.*, 2001; Schreiber *et al.*, 2008).

Bien que le phénomène d'hypersialylation soit connu depuis près d'une trentaine d'années, les bases moléculaires de ces modifications structurales sont encore très mal définies. L'apparition des motifs sialylés dans les cancers semble être le reflet des variations d'expression et d'activité des sialyltransférases. La régulation de la transcription est l'un des événements majeurs permettant le contrôle de l'expression de ces enzymes. Cette régulation peut être modulée par des oncogènes. Par exemple, la transfection de fibroblastes de rat par l'oncogène H-Ras induit une augmentation de la sialylation en  $\alpha 2,6$  qui résulte d'une augmentation du taux de transcription de la  $\beta$ -galactoside  $\alpha 2,6$ -sialyltransférase ST6Gal I. En parallèle, cette augmentation de sialylation est associée à un potentiel invasif accru des cellules transfectées (Le Marer *et al.*, 1992; Le Marer et Stéhelin, 1995). Récemment, les variations de glycosylation observées dans les cancers gastro-intestinaux ont été associées à des modifications épigénétiques telles que l'inhibition des gènes de glycosyltransférases *B4GALNT2* et *ST3GAL6* par hyperméthylation de l'ADN (Wang *et al.*, 2008; Kawamura *et al.*, 2008).

### ***II. A. 2. c) Immunothérapie***

De par leur implication dans la tumorigenèse et leur expression restreinte dans les tissus sains, les AGAT sialylés représentent une cible de premier intérêt dans la thérapie anti-cancéreuse. Plusieurs stratégies vaccinales sont actuellement en cours de développement et se situent à différentes phases d'essais cliniques (Dube et Bertozzi, 2005 ; Niederhafner *et al.*, 2008 ; Ragupathi *et al.*, 2009). Ainsi, le Thératope<sup>TM</sup>, vaccin dont l'immunogène est une molécule combinée comprenant une protéine porteuse KLH (*Keyhole Limet Hemocyanin*) sur laquelle sont greffées 3.000 molécules sTn, présente un potentiel thérapeutique intéressant pour le traitement de malades atteints de cancer du sein. De nombreux tests préliminaires ont montré que l'injection de cette molécule peut induire des réponses immunitaires et cellulaires dirigées contre le sTn (essais de phase 0, I et II) (Miles et Papazisis, 2003 ; Julien *et al.*, 2009). Cependant, les essais cliniques de phase III sur des patientes présentant un cancer du sein au stade

métastatique ont montré des effets limités aussi bien d'un point de vue de la progression tumorale que de la survie, probablement en raison du faible pourcentage de tumeurs sTn<sup>+</sup> dans la cohorte étudiée (25 à 30 %). Toutefois, un traitement avec le Thératope<sup>TM</sup> en conjonction avec de l'hormonothérapie semble augmenter la survie des patientes (Holmberg et Sandmaier, 2004). De nouvelles stratégies à l'étude visent à réaliser des vaccins multi-antigéniques tournés contre plusieurs déterminants glycaniques (Dube et Bertozzi, 2005 ; Niederhafner *et al.*, 2008).

## **II. B. Les antigènes glucidiques associés au cancer du sein**

Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'expression des AGAT est altérée dans le cancer du sein. Au cours de la préparation de cette thèse, nous avons décidé de regrouper l'ensemble des connaissances acquises ces dernières années sur les anomalies de glycosylation dans le cancer du sein. Nous avons dressé un bilan des recherches fondamentales et cliniques démontrant les modifications de cette glycosylation de surface et les conséquences sur le développement et l'agressivité de la maladie. Cette revue, intitulée « *Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer* », parue dans le journal *Breast Cancer Research*, est insérée dans ce chapitre en tant que paragraphe (II.B).

REVIEW

# Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer

Aurélie Cazet<sup>1,2</sup>, Sylvain Julien<sup>3</sup>, Marie Bobowski<sup>1,2</sup>, Joy Burchell<sup>3</sup> and Philippe Delannoy<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

Glycosylation changes that occur in cancer often lead to the expression of tumour-associated carbohydrate antigens. In breast cancer, these antigens are usually associated with a poor prognosis and a reduced overall survival. Cellular models have shown the implication of these antigens in cell adhesion, migration, proliferation and tumour growth. The present review summarizes our current knowledge of glycosylation changes (structures, biosynthesis and occurrence) in breast cancer cell lines and primary tumours, and the consequences on disease progression and aggressiveness. The therapeutic strategies attempted to target tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer are also discussed.

## Introduction

Glycosylation is one of the most important modifications of proteins and lipids. The structure of glycans is highly diversified and their biosynthesis requires specific enzymatic machinery involving a high number of glycosyltransferases. Glycoconjugates of the cell surface are thought to play important roles in a variety of biological functions, such as cell–cell and cell–substrate interactions, bacterial adhesion, membrane organization, cell immunogenicity and protein targeting. For example, sialyl-Lewis<sup>x</sup> (sLe<sup>x</sup>) antigens are the ligands for selectins and are involved in the recruitment of leukocytes to lymphoid tissues and inflammation sites [1].

Glycan structures depend on the cell type, developmental stage and cell differentiation, and are modified in many pathologic states including cancers. The modification of cellular glycosylation is indeed a common phenotypic change of cancer cells that mainly affects the

outer part of glycans, leading to the expression of tumour-associated carbohydrate antigens (TACAs). Increased  $\beta$ 1,6-branching, increased sLe<sup>x</sup> or sialyl-Lewis<sup>a</sup> (sLe<sup>a</sup>) antigens, or the general increase in sialylation are commonly observed in *N*-linked and *O*-linked glycans of carcinoma cells and are associated with grade, invasion, metastasis and poor prognosis. These changes in glycosylation often reflect a deregulation of glycosyltransferase expression at the transcriptional level, and several examples have shown that glycosyltransferase genes, including *ST6GAL1* [2] and *MGAT5* [3], are regulated by oncogenes.

sLe<sup>x</sup>, s-Le<sup>a</sup> and sialyl-Thomsen-nouvelle (sTn) are tumour-associated antigens found in breast cancer [4-6]. When these antigens are detected at the surface of breast carcinoma cells, they are usually associated with a poor prognosis and a reduced overall survival of the patients [7]. These glycosylation changes mostly result from the modification of the expression of glycosyltransferase (GT) genes, and the level of expression of sialyltransferases has been proposed as a prognostic marker for the follow-up of breast cancer patients [8,9].

Several cellular models have been developed in order to explain the mechanisms by which carbohydrate antigens can reinforce breast cancer progression and aggressiveness, showing the implication of TACAs in cell adhesion, migration, proliferation and tumour growth [10,11]. TACAs such as sTn are also targets for breast cancer immunotherapy. Finally, recent data seem to indicate an important role of complex gangliosides in breast cancer progression and metastasis [12,13]. The present review summarizes our current knowledge of glycosylation changes that occur in breast cancer and the consequences of these changes on disease development and aggressiveness.

## Defects in mucin-type *O*-glycosylation

One of the hallmarks of breast adenocarcinomas is the overexpression and aberrant localization of membrane-bound mucins, such as MUC1 and MUC4 [14]. Mucins are characterized by a large number of tandem repeated domains, rich in serine and threonine, which are therefore densely *O*-glycosylated.

\*Correspondence: philippe.delannoy@univ-lille1.fr

<sup>1</sup>Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576, University of Sciences and Technologies of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France  
Full list of author information is available at the end of the article

O-glycans expressed by normal breast epithelial cells are composed of Core2 structures extended with a linear poly lactosaminic chain, which can be fucosylated or sialylated [15] (Figure 1). Accordingly, a recent study reported a prevalence of Le<sup>x</sup> expression at the apex of normal breast epithelia, where MUC1 is also detected [16].

In contrast, breast cancer cell lines express truncated O-glycans with shorter poly lactosaminic chains and a tendency to switch from Core2 O-glycans to sialylated or unsialylated Core1 structures (Figure 1) [17]. It has long been known that breast cancer tissues contain more sialic acid and more sialyltransferase activity [18] than corresponding normal tissues. Breast cancer cells may thus express shorter O-glycans due to premature sialylation of the poly lactosaminic chain blocking further extension, or due to truncation of the O-glycans at the core level – owing to the sialylation of the Core1 structure or of the initial GalNAc, leading to the expression of sialyl-Thomsen–Friedenreich (sialyl-T) antigen structures and sTn antigen, respectively (Figure 1).

Alternatively, a defect in GTs that are involved in the biosynthesis of the O-glycan cores can also lead to the incomplete synthesis of the glycans, allowing the expression of O-linked carbohydrate antigens known as Thomsen–Friedenreich (T or TF) antigen (unsialylated Core1) and Thomsen-nouvelle (Tn) antigen (initial unsubstituted GalNAc) (Figure 1).

#### Thomsen–Friedenreich antigen

T antigen is the cryptic precursor of Core2 O-glycans, which can be unmasked if the cancer cells lose their ability to synthesize Core2 (Figure 1). T antigen consists of unsialylated Core1 structures (Galβ1-3GalNAcαSer/Thr) initially described on glycoporphins of red blood cells. The galactose residue is crucial for the antigenicity since re-sialylation or β-D-galactosidase treatment abrogates T-antigen detection [19].

Georg Springer was the pioneer of the study of T antigen in breast cancer. Using natural anti-T antisera, he first showed that all breast cancers, but not benign lesions or normal mammary gland, expressed the T antigen [20]. Later studies using monoclonal antibodies demonstrated the presence of T antigen at a low level in normal epithelium or metaplastic lesions of the breast [21].

Lectins such as *Arachis hypogea* agglutinin/peanut lectin (PNA), *Amaranthus caudatus* lectin or *Artocarpus integrifolia*/jacalin have been extensively used to detect T antigen. None of these lectins, however, is exclusively specific for the Galβ1-3GalNAc structure. Both *A. caudatus* agglutinin and *A. integrifolia* agglutinin/jacalin are specific for GalNAc when there is no substitution on C6 of the saccharide (Figure 2). In contrast, substitution on C3 does not impair their binding. Consequently both *A. caudatus* agglutinin and *A. integrifolia* agglutinin/

jacalin can bind to Tn antigen (GalNAcα-Ser/Thr), T antigen (Galβ1-3GalNAcα-Ser/Thr) and sialyl-T antigen (Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcα-Ser/Thr) [22,23].

PNA is specific for unsubstituted Gal residues [24]. Because of its high reactivity with asialo-glycophorin, PNA has been tagged as the anti-T lectin [24]. PNA was able to react weakly with healthy tissue while anti-T antisera were not, however, suggesting that PNA specificity was slightly wider than the sole T carbohydrate. Indeed, PNA can bind, albeit with lower affinity, to terminal galactose in a variety of glycans including glycolipids such as asialo-G<sub>M1</sub> [23] or N-acetyl-lactosamine (LacNAc) [25]. Studies of T-antigen expression using PNA should therefore be treated cautiously, especially in the absence of complementary analysis of the O-glycosylation of the considered cells or tissues.

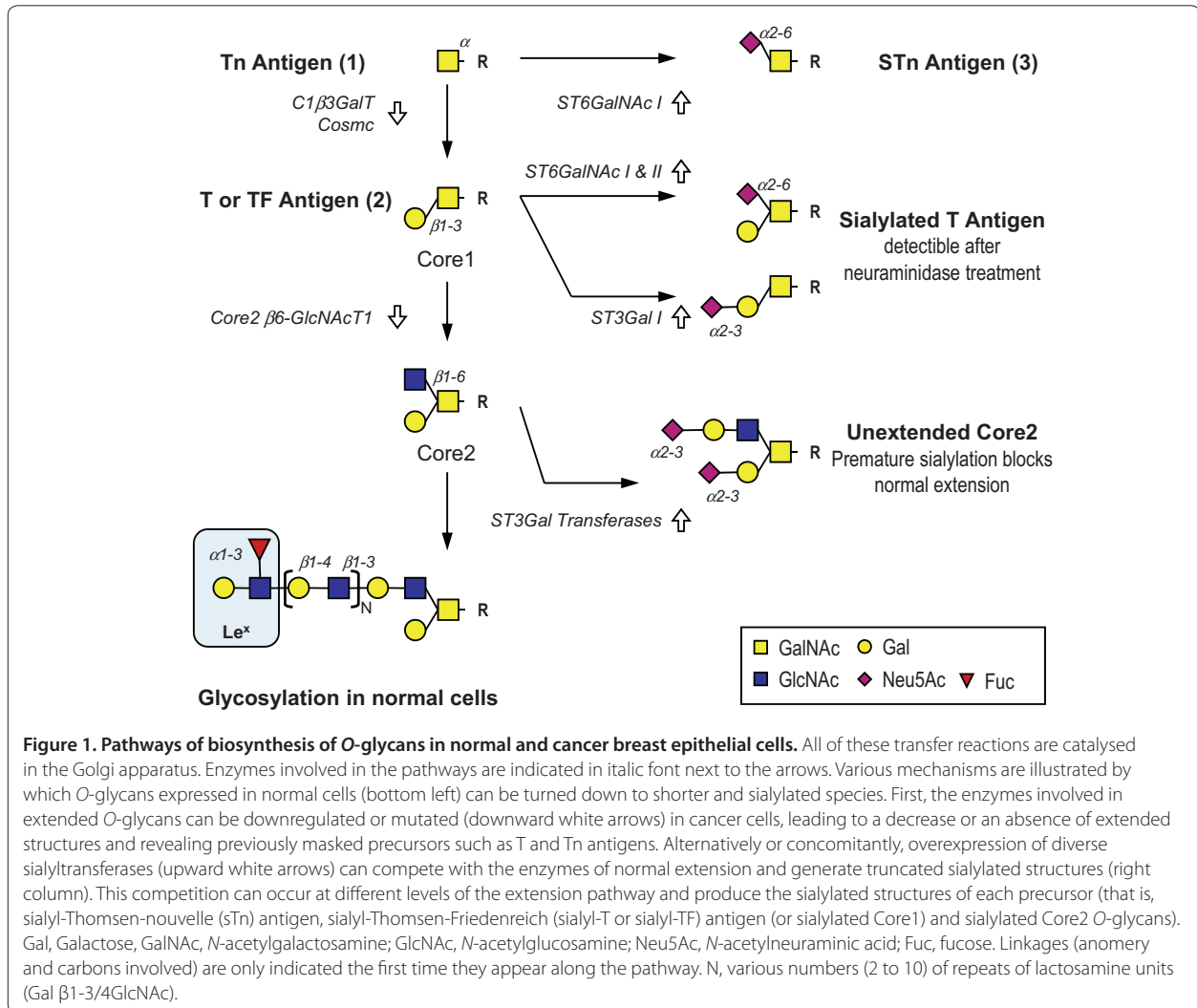
In parallel to lectins, mAbs have long been used to investigate T-antigen expression in epithelial cancers [26]. As for lectins, most mAbs are not strictly specific for the sole Galβ1-3GalNAc-Ser/Thr structure – some of them, such as A78-G/A7, cross-reacting with asialo-G<sub>M1</sub>. Other mAbs define site-specific T antigens, such as BW835 with the VTSA motif in MUC1 tandem repeat. The HH8 mAb, as PNA, tolerates further substitution on the C6 of the GalNAc leading to Core2 structures [26] (Figure 2).

These subtle differences of specificity concur with the variability of the detection of T antigen in tumour tissues [26,27], and these discrepancies have fuelled debates regarding the prognosis value of T-antigen expression in breast cancers. PNA staining does not have any prognostic significance [26], while a more recent study using the mAb A78-G/A7 showed a correlation of T-antigen expression with a better prognosis [28], opposite to what is reported for gastrointestinal, lung or cervix cancers.

A recent study has shown that 98% of the disseminated tumour cells in the bone marrow were positively stained by a new anti-T antibody [29], suggesting a role for T antigen in the metastasis process. This putative role has been investigated during the past decade, on the assumption that Galβ1-3GalNAc-R disaccharide could be a good ligand for Galectin-3 [30], which has been shown to promote breast cancer metastasis by mediating adhesion to endothelial cells. Although Galectin-3 seems to be involved in breast cancer metastasis through its interaction with some cancer-associated O-glycans [31], however, the nature of its ligand remains to be clearly elucidated via a comprehensive characterization of the glycosylation pattern required for this interaction.

To summarize, there is strong evidence showing that T antigen is frequently overexpressed in breast cancer, suggesting that the changes in O-glycosylation provide some advantage to the tumour development. Relation to prognosis or metastatic behaviour, however, suffers from





contradictory studies – partially due to the use of different probes – and remains to be unambiguously demonstrated.

#### Thomsen-nouvelle antigen


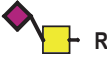

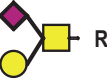


Tn antigen is the cryptic precursor of the T antigen (Core1) that can be unmasked if a cell loses its ability to synthesize the Core1 structure (see Figure 1).

Tn (GalNAc-α-R) expression on blood cells is responsible for Tn syndrome, which is a rare autoimmune haematological disorder [32]. Tn syndrome occurs due to mutations in the *COSMC* gene coding the C1β3GalT-specific molecular chaperone, leading to a drastic decrease of C1β3GalT (T-synthase) activity [33]. Mutations and loss of heterozygosity of *COSMC* were described in colon cancer and melanoma cancer Tn-positive cells, as well as in tissues from two Tn-positive cervical cancers [34]. Extensive studies of *COSMC* in epithelial cancers,

however, showed that these events were rare and could only partially explain Tn expression in cancers [35].

A range of GalNAc-specific lectins, including *Helix pomiana* lectin (HPA) and plant lectins from *Dolichos biflorus*, *Griffonia simplicifolia*, *Wistaria floribundia*, *Glycine max* soybean, *Vicia villosa* isolectin B4 (VVA) and *Salvia sclarea* agglutinin, can be used to detect Tn antigen [32,36]. These lectins bind to terminal GalNAc and therefore react with Tn antigen, but also with Forssman antigen (GalNAc-α1-3GalNAc-β-R) and to some extent with blood group A (GalNAc-α1-3[Fuc-α1-2]Gal-β-R) or glycolipids [36]. HPA, which has been extensively used to study Tn expression in breast cancer [37], has been shown by some authors to bind T antigen [36]. There is also a range of mAbs available to detect Tn antigen [32]. Some of them, however, can slightly cross-react with sTn.

Tn antigen was found to be expressed in almost 90% of breast cancers while it is barely detected in normal tissue

Structures		Name	ACA and AIA	PNA and HH8
GalNAc $\alpha$ -R		Tn antigen	Yes	No
Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ -R		Sialyl-Tn antigen	No	No
Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -R		T or TF antigen Core1	Yes	Yes
Gal $\beta$ 1-3(Neu5Ac $\alpha$ 2-6)GalNAc $\alpha$ -R		Sialyl(6)T	No	Yes
Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -R		Sialyl(3)T	Yes	No
Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6(Gal $\beta$ 1-3)GalNAc $\alpha$ -R		Core2	-	Yes

**Figure 2. Short O-glycans observed in breast epithelial cells during carcinogenesis.** Structures of short O-glycans observed in breast epithelial cells during carcinogenesis and their binding to *Arachis hypogea* agglutinin/peanut lectin (PNA) lectin or HH8 mAb, and to *Amaranthus caudatus* agglutinin (ACA) or *Artocarpus integrifolia* agglutinin/jacalin (AIA). T or TF, Thomsen–Friedenreich; Tn, Thomsen-nouvelle.

[38]. Association with high grade has been reported for invasive ductal carcinomas (IDC) using a pool of anti-Tn antibodies [39] and for ductal carcinoma *in situ* using VVA and *G. simplicifolia* agglutinin [40]. Using VVA, *G. simplicifolia* agglutinin and 83D4 mAb, other authors reported a tendency to lose Tn expression in grade III tumours [41]. Using either anti-Tn mAb or VVA, Tn was found associated with the Pathological Tumor-Node-Metastasis (pTNM) tumour stage in IDC [39,42]. Tn expression was also associated with decreased overall survival using antibodies [35] or HPA [43] and with increased risks of recurrence using VVA [42] or HPA [44].

Strikingly, Tn expression was always observed in lymph node metastatic cells using either mAb or lectins [39,41] with 100% of Tn-positive metastatic cells, while primary tumours could exhibit various percentages of cell positivity [39,41,42]. Tn expression in primary tumours seems consistently associated with lymph node involvement using mAbs [41,42], HPA [43] or VVA [42], and even with invasion of lymphatic vessels within the

primary tumour [42]. This observation strongly suggests that Tn antigen may play a role in the mechanism involved in lymph node metastasis. Indeed, Danussi and colleagues have recently shown that a newly generated anti-Tn antibody could block Tn-positive MCF-7 breast cancer cell line interaction with lymphatic endothelium of the mammary pad in an animal model [45]. A putative receptor(s) for Tn antigen in lymphatic cells, however, remains to be identified.

One known receptor for Tn antigen is the macrophage galactose-type lectin (MGL), which, in human, is specific for GalNAc [46]. MGL is expressed in immature dendritic cells and macrophages, and is proposed as an immunomodulatory receptor [46]. MGL has been shown to bind Tn antigen carried by MUC1 in colon carcinoma cells [47], and human immature dendritic cells can uptake MUC1-Tn peptide in a MGL-mediated way [48]. The MGL-Tn interaction, however, has not yet been investigated regarding its possible functional involvement in breast cancer development.

### Sialyl-Thomsen-nouvelle antigen

Tn antigen can be sialylated at the C6 position of GalNAc, resulting in the disaccharide Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc-R (sTn). STn is absent in normal healthy tissues but can be detected at various frequencies in almost all kinds of carcinomas [49].

ST6GalNAc I is the enzyme catalysing the transfer of sialic acid onto GalNAc *in vivo* [50]. It has been proposed that *COSMC* mutation was necessary to provide the Tn acceptor substrate for ST6GalNAc I to synthesize sTn antigen [34]. Transfection of ST6GalNAc I cDNA, however, has been shown to be sufficient to induce sTn expression in various breast cancer cell lines expressing Core1 and Core2 glycans [11,50,51], proving that ST6GalNAc I can compete with active Core1  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase.

Several mAbs have been raised against sTn antigen using various immunogens, leading to subtle differences in the way they recognize sTn [49]. The most commonly used mAbs in breast cancer investigations are B72.3, TKH2 and HB-STn1. B72.3 appeared to be specific for clustered sTn but also cross-reacts with Tn clusters [52,53]. In contrast, TKH2 reacts more strongly to monomeric sTn conjugated to keyhole limpet hemocyanin (STn-KLH) than B72.3 [54].

The reported occurrence of sTn expression in breast cancer is highly variable. It is commonly accepted that at least 25 to 30% of breast cancers are sTn-positive [51]. The reported ranges are 20 to 80% using B72.3 and 30 to 60% using HB-STn1 [49], and correlation with known prognosis markers varies from one study to another. Correlation with a decreased overall survival seems to be the more consistent correlation through the literature. Kinney and colleagues proposed that sTn was an independent predictor of poor prognosis of breast cancers [55]. Miles and colleagues, however, reported a significant correlation of sTn expression with the decreased survival in the restricted node-positive patient group [7], whereas Leivonen and colleagues limited the association to the short-term prognosis [56].

Induction of sTn expression by transfection of the breast cancer cell line with ST6GalNAc I cDNA decreased the adhesion of cells to matrix proteins, and increased mobility and tumour growth in a xenograft model [10,11,50]. These observations are in accordance with a more aggressive phenotype of cancer cell that is usually associated with sTn expression but remain to be elucidated at the molecular level. Of the various sTn-positive proteins present in these transfected cell lines, only four have been identified: MUC1 and CD44 in human [10], and integrin  $\beta$ <sub>1</sub> [57] and osteopontin [58] in mouse. All of these molecules have described functions in adhesion and/or migration, and it has been suggested that the modification of their O-glycosylation may influence this function and the mobility of the cancer cells.

### Lewis antigens in breast cancer

#### Structure and biosynthesis of Lewis antigens

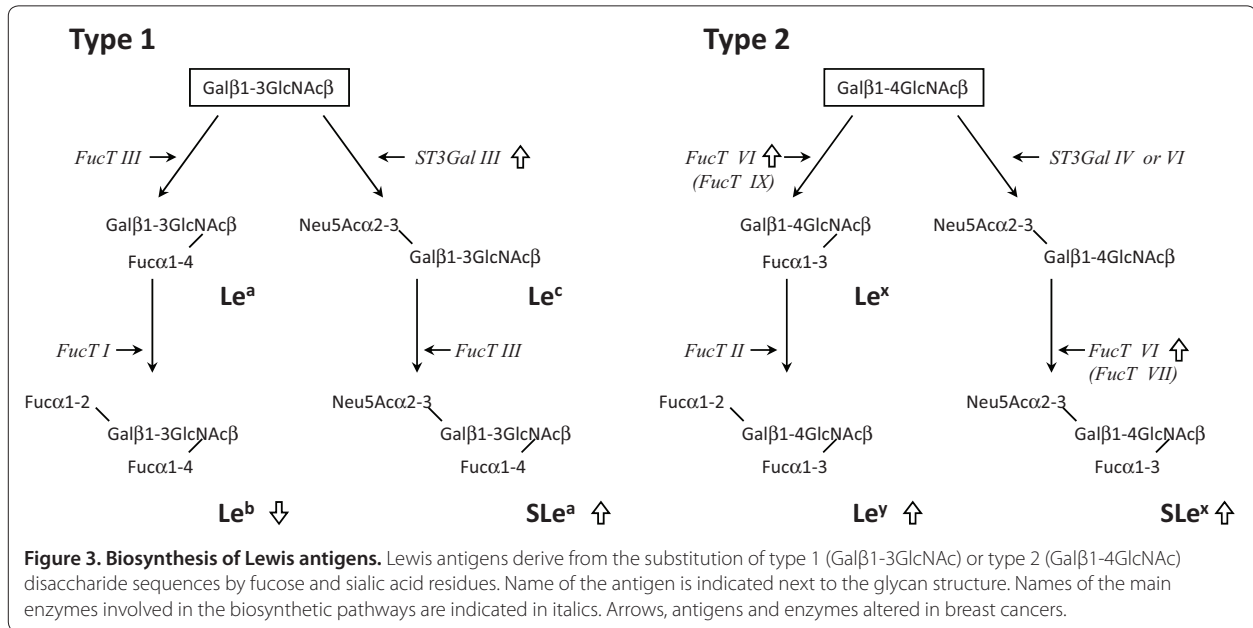
The histoblood group Lewis antigens are found in most human epithelial tissues, where they are expressed at the terminal part of glycolipid and glycoprotein glycan chains [59]. These antigens derive from the substitution of type 1 (Gal $\beta$ 1-3GlcNAc) or type 2 (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) disaccharide sequences by fucose and sialic acid residues (Figure 3). Le<sup>a</sup>, Le<sup>b</sup> and sLe<sup>a</sup> derive from type 1 sequences, and Le<sup>x</sup>, Le<sup>y</sup> and sLe<sup>x</sup> derive from type 2. In healthy individuals, type 1 (Le<sup>a</sup> and Le<sup>b</sup>) antigens are widely expressed, while type 2 (Le<sup>x</sup> and Le<sup>y</sup>) antigens are only expressed at relatively low levels. The biosynthesis of these antigens requires specific fucosyltransferases and sialyltransferases (Table 1).

The GlcNAc  $\alpha$ 1,4-fucosylation of type 1 disaccharide generates Le<sup>a</sup> antigen, whereas the  $\alpha$ 1,3-fucosylation of type 2 gives Le<sup>x</sup> (Figure 3). The fucosyltransferases FucT III, FucT IV, FucT VI and FucT IX catalyse the transfer of a fucose residue onto GlcNAc of type 1 or type 2 disaccharides, thus synthesizing  $\alpha$ 1,3-fucosylated and, in the case of FucT III,  $\alpha$ 1,4-fucosylated glycans [60-62]. FucT III is the only enzyme responsible for the synthesis of Le<sup>a</sup> and sLe<sup>a</sup> *in vivo* and is called the Lewis enzyme. The fucosyltransferases FucT I and FucT II are responsible for the Gal  $\alpha$ 1,2-fucosylation of Le<sup>a</sup> or Le<sup>x</sup>, generating Le<sup>b</sup> or Le<sup>y</sup> antigens, respectively (Figure 3). FucT I (H enzyme) preferentially fucosylates type 1, whereas FucT II (Se enzyme) determines the expression of H-type 2 (Fuc $\alpha$ 1-2Gal $\beta$ 1-4GlcNAc) and Le<sup>y</sup> antigens.

The biosynthesis of sialylated Lewis antigens (sLe<sup>a</sup> and sLe<sup>x</sup>) requires first the  $\alpha$ 2,3-sialylation of Gal prior to  $\alpha$ 1,3/4-fucosylation. ST3Gal III [63], preferentially acting on type 1 rather than on type 2 disaccharides, is involved in sLe<sup>a</sup> synthesis. ST3Gal IV and ST3Gal VI mainly act on type 2 disaccharide, leading to the biosynthesis of sLe<sup>x</sup> [64], but both also share acceptor specificity with ST3Gal III. For the subsequent fucosylation, FucT III is the main enzyme involved in the biosynthesis of sLe<sup>a</sup> [65], whereas FucT VII [62,66] shows a restricted substrate specificity since it can form only sLe<sup>x</sup> [67].

#### Overexpression of Lewis antigens in breast cancer

The expression of sialyl-Lewis antigens is usually altered in breast cancer. Normal breast commonly expresses Le<sup>x</sup>, mainly in the apical part of cell ducts, together with MUC1. sLe<sup>x</sup> and sLe<sup>y</sup> epitopes may also be sometimes detected in normal breast, but with a low intensity [16]. On the contrary, sLe<sup>a</sup> and sLe<sup>x</sup> expression is found to be increased in breast cancer tissues, including primary breast carcinoma lesions [68]. Furthermore, levels of expression of sLe<sup>x</sup> are higher in patients who had distant metastasis compared with patients presenting nonmetastatic cancers [69]. The expression of sialyl-Lewis



**Table 1. Fucosyltransferases and sialyltransferases potentially involved in biosynthesis of histoblood group Lewis antigens in breast tissues**

Gene name	Common name	Accession number	Main acceptor substrate
<i>α</i> 1,2-Fucosyltransferases			
<i>FUT1</i>	FucT I	NM_000148	<b>Galβ1-3[Fuca1-4]0-1GlcNAc</b>
<i>FUT2</i>	FucT II	NM_000511	<b>Galβ1-4[Fuca1-3]0-1GlcNAc</b>
<i>α</i> 1,3/4-Fucosyltransferases			
<i>FUT3</i>	FucT III	NM_000149	Galβ1-3/4 <b>GlcNAc</b>
<i>FUT6</i>	FucT VI	NM_000150	Galβ1-4 <b>GlcNAc</b>
<i>FUT7</i>	FucT VII	NM_004479	NeuAca2-3Galβ1-4 <b>GlcNAc</b>
<i>FUT9</i>	FucT IX	NM_006581	Galβ1-4 <b>GlcNAc</b>
<i>α</i> 2,3-Sialyltransferases			
<i>ST3GAL3</i>	ST3Gal III	NM_174972	<b>Galβ1-3GlcNAc</b>
<i>ST3GAL4</i>	ST3Gal IV	NM_006278	<b>Galβ1-4GlcNAc</b>
<i>ST3GAL6</i>	ST3Gal VI	NM_006100	<b>Galβ1-4GlcNAc</b>

The acceptor monosaccharide is indicated in bold.

antigens is weak in carcinoma *in situ*, is moderate in invasive carcinomas without metastases and is high in primary carcinoma with lymph node metastases, showing a good correlation with the metastatic risk in breast cancer patients [70]. Immunohistochemistry of breast cancer tissue suggests that sLe<sup>x</sup> expression is an independent prognostic indicator of survival regardless of the size of the primary tumour and lymph node involvement [71].

RNA analysis of tumours indicated that FucT VI expression correlates with the levels of sLe<sup>x</sup>. Furthermore, transfection of the *FUT6* gene into MCF-7 breast cancer cells showed that FucT VI is responsible for an

enhancement of sLe<sup>x</sup> expression [72]. The downregulation of ST3Gal IV increased MCF-7 cell adhesion and decreased MDA-MB-231 cell migration, suggesting that α2,3-sialylation played a crucial role in the adhesion and tumour metastases [73]. In parallel, the level of ST3Gal III expression is associated with axillary lymph node involvement and a reduced overall survival of patients [8,9].

A general reduced expression of type 1 carbohydrate antigens and increased expression of type 2 antigens in breast cancer tissues has also been reported [4,6], and the relative expression of type 2 carbohydrate antigens seems capable of serving as a prognostic factor. As much as 80%

of breast tumours have lost the expression of Le<sup>b</sup> antigen, which correlates with the degree of malignancy and invasiveness [74].

The expression level of sLe<sup>x</sup> is also increased in the serum of patients with advanced breast cancer [69,75] and is therefore a good candidate as a diagnosis marker. In combination with serum CA15-3, the most commonly used breast cancer marker, the measurement of serum sLe<sup>x</sup> improves monitoring – for 78.5% of detected metastatic breast cancer, compared with 61.5% when CA15-3 is used alone [76].

The Le<sup>y</sup> antigen is also overexpressed in 60 to 90% of cancer of epithelial origin, including breast cancer [77]. A clinical study showed that high expression of Le<sup>y</sup> correlated with high grade and poor prognosis, and significantly decreased patient survival in lymph node-negative breast carcinoma [78]. Showing restricted expression on epithelial surfaces in normal tissues, Le<sup>y</sup> also constitutes a good candidate for cancer immunotherapy [79].

#### Implication of sialyl-Lewis antigens in metastasis

The expression of sLe<sup>x</sup> on leukocytes contributes to their function in the inflammatory response via interaction with E-selectin expressed on endothelial cells. By exposing sLe<sup>x</sup> at the cell surface, malignant cells can use a similar strategy for the extravasation from the blood circulation and metastasis, targeting tissues where E-selectin is highly expressed.

Both P-selectin and E-selectin expression is significantly enhanced on endothelial cells of breast cancer patients [68], consistent with the proposal that sLe<sup>x</sup> binding to selectins aids cancer cell metastasis. A high tumour-associated ST3Gal III expression and a high E-selectin serum concentration were associated with a bad prognosis for relapse-free survival and overall survival in patients with node-negative breast cancer [8]. In both canine mammary carcinoma and the human inflammatory breast cancer model, the cellular expression of E-cadherin and sLe<sup>x</sup> are inversely correlated, suggesting a biologically coordinated mechanism of E-cadherin and sLe<sup>x</sup> expression essential for tumour establishment and metastatic progression [80].

### Gangliosides in breast cancer

#### Structure and biosynthesis of gangliosides

Gangliosides are expressed at the plasma membrane of cells, especially in developing tissues and the adult central nervous system. Gangliosides structurally and biosynthetically derive from lactosylceramide (LacCer), and additional sugar residues – including sialic acid, *N*-acetylgalactosamine and galactose – are transferred in a step-wise manner by a series of specific GTs [81] (Figure 4). G<sub>M3</sub>, G<sub>D3</sub> and G<sub>T3</sub> are the starting points for the biosynthesis of a-series, b-series and c-series gangliosides,

respectively (Figure 4). The relative amounts of these glycosphingolipids determine the amount of complex gangliosides of each series. The amount of complex gangliosides is therefore dependent on the level of expression and activity of several GTs, including G<sub>M3</sub> synthase (ST3Gal V), G<sub>D3</sub> synthase (ST8Sia I), G<sub>T3</sub> synthase (ST8Sia V) and G<sub>M2/D2</sub> synthase (β1,4-GalNAc T1) (Table 2).

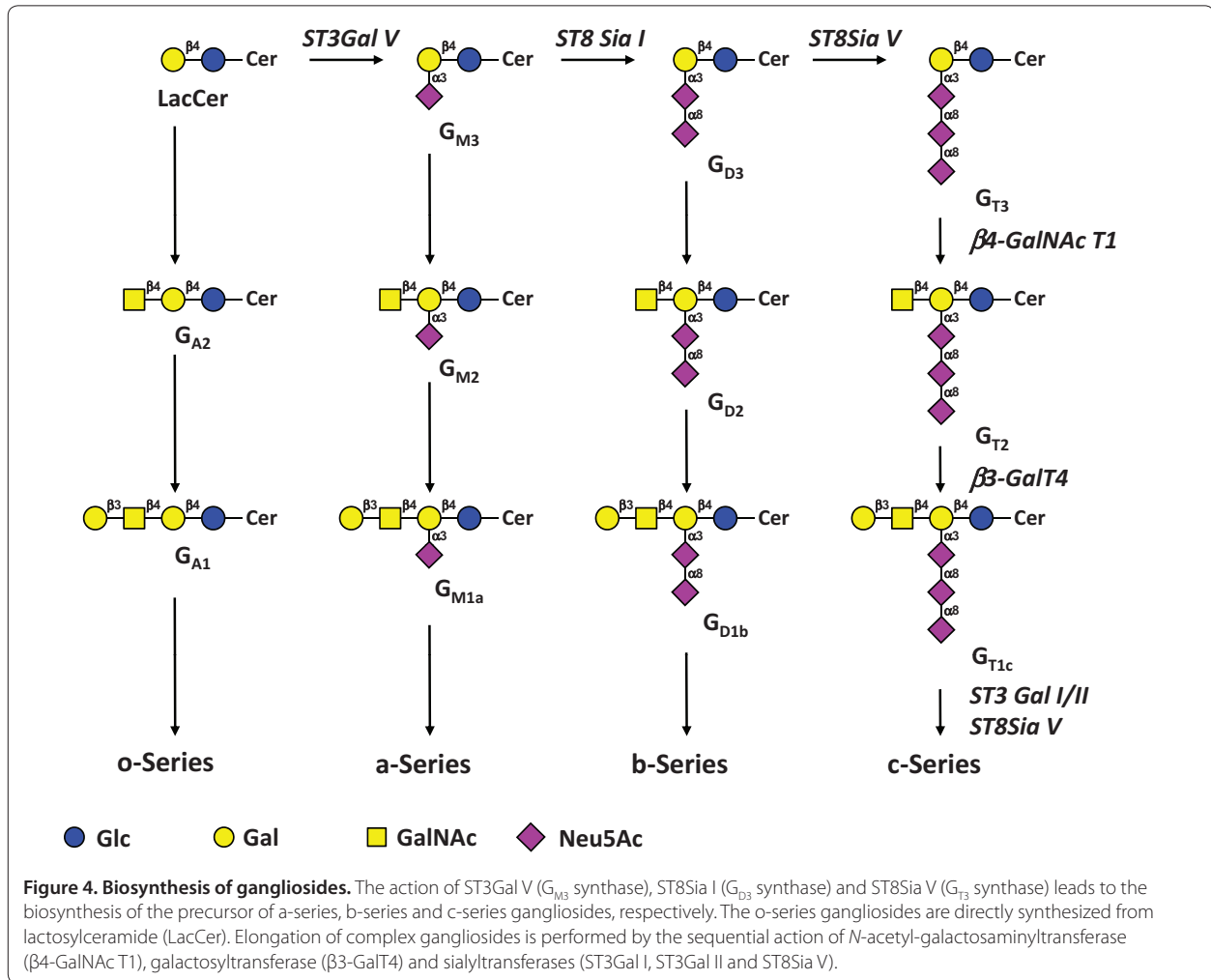
#### Overexpression or neo-expression of gangliosides in breast cancer

The neo-expression of gangliosides has been usually demonstrated in a variety of cancers – especially in neuroectoderm-derived tumours, in which they play a key role in invasion and metastasis. Breast tumour tissues were shown to be distinct from normal mammary tissues in terms of ganglioside composition. The gangliosides G<sub>M3</sub>, G<sub>D3</sub> and the derivatives 9-*O*-acetyl-G<sub>D3</sub> (CDw60 antigen) and 9-*O*-acetyl-G<sub>T3</sub>, which show a very restricted expression in normal breast tissues, are overexpressed in about 50% of IDC [82].

The *N*-glycolyl-G<sub>M3</sub> is also detected in IDC, with 100% efficiency in primary tumours for women diagnosed with stage II breast cancer [82,83]. Neu5Gc is normally absent in human due to the irreversible inactivation of the *CMAH* gene encoding the CMP-Neu5Ac hydroxylase. The lack of the enzyme responsible for the conversion of CMP-Neu5Ac in CMP-Neu5Gc results in the total absence of Neu5Gc in healthy human tissues. On the contrary, Neu5Gc was shown to be expressed on glycoproteins and gangliosides in melanoma, colon, retinoblastoma and breast cancers.

The expression of GTs implicated in ganglioside biosynthesis can be also altered in breast cancer tumours. Two clinical studies have shown that the G<sub>D3</sub> synthase (ST8Sia I) displayed higher expression among oestrogen receptor-negative breast cancer tumours [84]. *ST8SIA1* overexpression was associated with poor pathohistological grading in oestrogen receptor-negative tumours and lower survival of patients [85]. In contrast, a better prognosis for oestrogen receptor-positive samples with high expression of *ST8SIA1* was noticed [85].

It has been shown that silencing of G<sub>M3</sub> synthase in mammary murine 4T1 cells significantly inhibited cell migration, invasion and anchorage-independent growth *in vitro*, as well as lung metastasis *in vivo*. In parallel, overexpression of G<sub>M3</sub> synthase in nonmetastatic 67NR cells significantly restores the malignant phenotype [86]. We have recently demonstrated that overexpression of G<sub>D3</sub> synthase in MDA-MB-231 cells is associated with increased proliferation, especially in the absence of serum or exogenous growth factors [13]. G<sub>D3</sub> synthase-overexpressing cells bypass the need of serum for cell growth by the activation of Erk/MAPK, PI3K/Akt and SAPK/JNK pathways (unpublished results). These data



suggest that  $G_{M3}$  or  $G_{D3}$  synthase overexpression may contribute to increasing the malignant properties of breast cancer cells by mediating cell proliferation and migration. Recently, the role of ST6GalNAc V, a sialyltransferase involved in the biosynthesis of  $\alpha$ -series gangliosides, in breast cancer metastasis to the brain has been clearly demonstrated. Normally restricted to the brain, the expression of ST6GalNAc V enhances the adhesion of breast cancer cells to brain endothelium and their passage through the blood-brain barrier, highlighting the role of cell surface glycosylation in organ-specific metastatic interactions [12].

#### Future perspectives for therapy

From the data summarized above, it appears that a limited number of TACAs are expressed in breast cancer and associated with restricted histopathological markers such as the oestrogen receptor status of tumours (Table 3). Breast cancer cells express truncated Core1-based

O-glycans, including T, Tn and sTn antigens. The expression of sialyl-Lewis antigens is also altered in breast carcinoma with a good correlation with metastatic risk, and complex gangliosides are overexpressed in IDC.

Although some TACAs have been shown as strong markers of a poor prognosis (for example, sLe<sup>x</sup> or sTn), they have not yet reached the clinic. Indeed, the strongest marker of prognosis in breast cancer remains the invasion of the lymph nodes determined during surgery. Unless another marker proves to be of superior quality or independent of lymph node involvement, it is very unlikely to be useful for clinic application. As TACAs are more or less associated with lymph node invasion and/or restricted to specific groups of patients, their use as prognosis markers appears rather limited. However, since TACAs seem to be functionally involved in cancer progression, one of their most promising uses in the future remains being targets for treatments designed for specific groups of patients.

**Table 2. Main glycosyltransferases involved in biosynthesis of gangliosides**

Gene name	Common name	Accession number	Main acceptor substrate
Glucosyltransferase			
<i>UGCG</i>	GlcCer synthase	NM_003358.1	Ceramide (Cer)
Galactosyltransferases			
<i>B4GALT6</i>	LacCer synthase	NM_004775	<b>Glc</b> 1-Cer
<i>B3GALT4</i>	β3-GalT4	NM_003782.3	<b>GalNAc</b> β1-4[NeuAc0-3]Galβ1-4Glc1-Cer
N-Acetyl-galactosaminyltransferase			
<i>B4GALNACT1</i>	G <sub>M2'</sub> G <sub>D2'</sub> G <sub>T2</sub> synthase	NM_001478.2	[NeuAc0-3] <b>Gal</b> β1-4Glc1-Cer
Sialyltransferases			
<i>ST3GAL1</i>	ST3Gal I	NM_003033.3	<b>Gal</b> β1-3GalNAcβ1-4[NeuAc0-3]Galβ1-4Glc1-Cer
<i>ST3GAL2</i>	ST3Gal II	NM_006927.3	<b>Gal</b> β1-3GalNAcβ1-4[NeuAc0-3]Galβ1-4Glc1-Cer
<i>ST3GAL5</i>	ST3Gal V	NM_003896.3	<b>Gal</b> β1-4Glc1-Cer
<i>ST6GALNAC5</i>	ST6GalNAc V	NM_030965.1	NeuAca2-3Galβ1-3 <b>GalNAc</b> β1-4Galβ1-4Glc1-Cer
<i>ST8SIA1</i>	ST8Sia I	NM_003034.3	<b>NeuAca</b> 2-3Galβ1-4Glc1-Cer
<i>ST8SIA5</i>	ST8Sia V	NM_013305.4	<b>NeuAca</b> 2-8NeuAca2-3Galβ1-4Glc1-Cer

The acceptor monosaccharide is indicated in bold.

**Table 3. Main tumour-associated carbohydrate antigens expressed in breast carcinomas**

TACA	DCIS	IDC	Altered pathway	Comments
Mucin-type antigens				
Thomsen-nouvelle	High	High	<i>COSMC</i> mutation, decrease in C1β3GalT activity	Expressed in almost 90% of breast cancers
Thomsen-Friedenreich	ND	High	Decrease in Core2 β6-GlcNAc-T expression, decrease in Core1 sialylation	
Sialyl-Thomsen-nouvelle	ND	High	Increase in ST6GalNAc I expression, decrease in Core2 β6-GlcNAc-T expression, alteration of <i>COSMC</i> function	25 to 30% of breast cancers, correlated with a decreased survival in node-positive patients
Lewis antigens				
Sialyl-Lewis <sup>x</sup>	Weak	High	Increased expression of FucT (FucT VI and FucT VII)	Higher in metastatic compared with nonmetastatic cancers
Sialyl-Lewis <sup>a</sup>	Weak	High	Increased expression of FucT (FucT III)	
Lewis <sup>y</sup>	Low	High	Increased expression of FucT	Overexpressed in 60 to 90% of breast cancer
Gangliosides				
G <sub>M3</sub>	ND	Increased	Increased expression of ST3Gal V	2.8-fold compared with normal tissue
G <sub>D3</sub>	ND	Increased	Increased expression of ST8Sia I	1.7-fold compared with normal tissue
9-O-acetyl-G <sub>D3</sub>	ND	Neo-expression	Increase of sialic acid acetylation	
9-O-acetyl-G <sub>T3</sub>	ND	Neo-expression	Increase of sialic acid acetylation	
N-glycolyl-G <sub>M3</sub>	ND	65 to 70%	Unknown	100% in stage II primary tumours

DCIS, ductal carcinoma *in situ*; IDC, invasive ductal carcinoma; ND, not determined; TACA, tumour-associated carbohydrate antigen.

Different methods can take advantage of TACA expression to treat breast cancer, such as blocking their biosynthesis or biological function, or using them as molecular targets in immunotherapy. Blocking the biosynthesis of glycans using chemical inhibitors has been shown to change the phenotype of breast cancer cells in culture, making them less aggressive [87,88]. Such an

approach, however, is difficult to adapt to human therapy because both healthy and diseased cells are using their glycans in a variety of functions. There are high risks that detrimental effects of a chemical inhibitor on healthy cells would counterbalance or avoid the beneficial effect of the molecule on cancer cells. In order to develop further, this field will have to await improvement in the

drug-targeting or drug delivery systems, such as the booming nanotechnologies [89].

Alternatively, one may consider specifically altering the expression of GTs involved in TACA biosynthesis. Little is still known about the molecular mechanisms leading to aberrant expression of GTs in cancer. Gain or loss of GT expression could be attributed to loss of chromosomal integrity often observed in cancers, leading to duplication, deletion or transposition of chromosomal segments involving glycosyltransferase genes. As an example, elevated ST6Gal I expression in murine W16 cells has been shown to be the result of DNA rearrangement in the *st6gal1* locus resulting from the transposition of a retroviral-like transposable element upstream of the *st6gal1* ORF [90]. Changes of gene expression do not always reflect genomic rearrangements, however, as comparison of the Comparative Genomic Hybridization Array and the RNA microarray do not always show absolute correlation. Expression of GT genes is often regulated at the transcriptional level [91], and several examples have shown that GT genes, including *ST6GAL1* [2] and *MGAT5* [3], can be regulated by oncogenes. Only a limited number of promoters of GT genes have been characterized [91], and this field is in need of further data in order to understand which factors of transcription, signalling pathways and, eventually, membrane receptors are involved in this cancer-specific deregulation. The knowledge of the intracellular molecular mechanisms regulating the expression of GTs might open new options to specifically impair TACA expression in cancer cells.

Functions of TACAs often involve interaction with glycan-specific receptors, such as selectins with sialyl-Lewis antigens. Attempts can be made to block this interaction, by masking either the glycans or its receptor. Several studies have shown that masking T antigens with specific peptides [92] or mAbs [93] can inhibit interaction of breast cancer cells with the endothelium and protect from metastasis. One advantage of this approach is that the lectin(s) recognizing the TACA does not need to be identified to block the interaction. Some limitations remain, however, such as the risk to induce unwanted physiological responses triggered by the same type of interactions (or loss of interaction), or the clinical viability of these compounds in terms of toxicity, body clearance or administration.

Active immunotherapy has been thoroughly investigated during the past 40 years as an alternative approach for cancer treatment. As glycans are naturally highly immunogenic, they have been extensively used for the design of immunotherapy strategies against breast cancer.

As early as in 1977, Springer and collaborators attempted to immunize patients with desialylated autologous red blood cells, in order to trigger a response to T

antigen. He reported a significantly improved 5-year survival (100%) and 10-year survival (44%) compared with the nonimmunized population [38]. Although of small scale and somewhat unorthodox, this study paved the way for further development of anti-TACA vaccines.

Ganglioside-based anti-idiotype vaccines focusing on *N*-glycolyl- $G_{M3}$  have been developed for specific active immunotherapy against breast cancer [94]. The 1E10 mAb (Racotumomab) is an anti-idiotype vaccine to P3 mAb, which recognized Neu5Gc- $G_{M3}$ . Vaccination with 1E10 of BALB/c mice challenged with the murine F3II mammary carcinoma leads to breast tumour growth suppression and a decrease of lung metastasis [95]. Moreover, the anti-tumour effect of 1E10 is enhanced by combination with a low-dose of cyclophosphamide [96]. Results of phase I clinical trials have shown that 1E10 vaccine was relatively well tolerated and able to produce a specific response against Neu5Gc-containing gangliosides in high-risk (stage III) or metastatic breast cancer [97,98].

Clustered sTn haptens conjugated to keyhole limpet hemocyanin (Theratope™; Biomira, Edmonton, AB, Canada) have also been used to immunize breast cancer patients [99]. Although the results of the first phase III clinical trial failed to show significant benefit, it has to be mentioned that patients were never screened for expression of sTn antigen in the tumours. The lack of significant benefit for the total population could therefore be explained by the low representation of patients presenting sTn-positive tumours (25 to 30%). Recently, we clearly demonstrated that Theratope™ induced tumour protection in a relevant murine model. The protection was dependent on both the presence of the sTn antigen in the tumour and the anti-sTn antibodies raised by immunization. Interestingly anti-sTn antibodies were able to recognize a wide range of sTn-positive proteins expressed by mammary carcinomas, suggesting that multi-targeting of the response was important to induce tumour protection [58].

Despite decades of research and evident proofs of concept in favour of anti-TACA cancer vaccines, one has to acknowledge that none of them have reached the clinic. One possible method of improvement is a better definition of patients who are most susceptible to benefit from the designed treatment. As TACAs are expressed in distinguishable groups of patients based on immunohistology or gene profiling expression, one may therefore consider personalizing the treatment according to expression of putative targets. Another way is to design multi-epitope targeting vaccines to cover a variety of targets found in different patient populations and to possibly trigger multi-antigenic response in each of the patients. Glycopeptide dendrimers have been developed to present simultaneously up to six different antigens (Tn, T, Globo H,  $G_{M2}$ , Le<sup>x</sup>, and MUC1-Tn antigens) and



have been assessed in immunization trials to compare multi-antigenic responses with mono-antigenic responses [100].

As the future of breast cancer treatment lies in a combination of patient-tailored and multi-targeting strategies, we believe that TACAs – because of their profile of expression and their proaggressive function – will be considered potent molecular targets.

#### Abbreviations

C1 $\beta$ 3GalT, Core1  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase (EC 2.4.1.122); GT, glycosyltransferase; HPA, *Helix pomatia* agglutinin; IDC, invasive ductal carcinoma; Le, Lewis; mAb, monoclonal antibody; MGL, macrophage galactose-type lectin; ORF, open reading frame; PNA, *Arachis hypogaea* agglutinin; sLe, sialyl-Lewis; sTn, sialyl-Thomsen-nouvelle; T, Thomsen-Friedenreich; TACA, tumour-associated carbohydrate antigen; Tn, Thomsen-nouvelle; VVA, *Vicia villosa* agglutinin isolectin B<sub>4</sub>.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Acknowledgements

The present work was supported by the University of Sciences and Technologies of Lille, the Association pour la Recherche sur le Cancer (grant numbers 7936 and 5023), La Ligue régionale contre le Cancer and the PAI Hubert Curien France-Korea STAR.

#### Author details

<sup>1</sup>Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576, University of Sciences and Technologies of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. <sup>2</sup>Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France. <sup>3</sup>Breast Cancer Biology Group, Research Oncology, King's College London, London SE1 9RT, UK.

Published: 8 June 2010

#### References

1. Varki A: **Selectin ligands.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:7390-7397.
2. Le Marer N, Laudet V, Svensson EC, Cazlaris H, Van Hille B, Lagrou C, Stehelin D, Montreuil J, Verbert A, Delannoy P: **The c-Ha-ras oncogene induces increased expression of beta-galactoside alpha-2, 6-sialyltransferase in rat fibroblast (FR3T3) cells.** *Glycobiology* 1992, **2**:49-56.
3. Buckhaults P, Chen L, Fregien N, Pierce M: **Transcriptional regulation of N-acetylglucosaminyltransferase V by the src oncogene.** *J Biol Chem* 1997, **272**:19575-19581.
4. Narita T, Funahashi H, Satoh Y, Watanabe T, Sakamoto J, Takagi H: **Association of expression of blood group-related carbohydrate antigens with prognosis in breast cancer.** *Cancer* 1993, **71**:3044-3053.
5. Soares R, Marinho A, Schmitt F: **Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters.** *Pathol Res Pract* 1996, **192**:1181-1186.
6. Ura Y, Dion AS, Williams CJ, Olsen BD, Redfield ES, Ishida M, Herlyn M, Major PP: **Quantitative dot blot analyses of blood-group-related antigens in paired normal and malignant human breast tissues.** *Int J Cancer* 1992, **50**:57-63.
7. Miles DW, Happerfield LC, Smith P, Gillibrand R, Bobrow LG, Gregory WM, Rubens RD: **Expression of sialyl-Tn predicts the effect of adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer.** *Br J Cancer* 1994, **70**:1272-1275.
8. Hebbbar M, Krzewinski-Recchi MA, Hornez L, Verdier A, Harduin-Lepers A, Bonnetterre J, Delannoy P, Peyrat JP: **Prognostic value of tumoral sialyltransferase expression and circulating E-selectin concentrations in node-negative breast cancer patients.** *Int J Biol Markers* 2003, **18**:116-122.
9. Recchi MA, Hebbbar M, Hornez L, Harduin-Lepers A, Peyrat JP, Delannoy P: **Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer.** *Cancer Res* 1998, **58**:4066-4070.
10. Julien S, Adriaenssens E, Ottenberg K, Furlan A, Courtand G, Vercoutter-Edouart AS, Hanisch FG, Delannoy P, Le Bourhis X: **ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumorigenicity.** *Glycobiology* 2006, **16**:54-64.
11. Julien S, Lagadec C, Krzewinski-Recchi MA, Courtand G, Le Bourhis X, Delannoy P: **Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration.** *Breast Cancer Res Treat* 2005, **90**:77-84.
12. Bos PD, Zhang XH, Nadal C, Shu W, Gomis RR, Nguyen DX, Minn AJ, van de Vijver MJ, Gerald WL, Foekens JA, Massagué J: **Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain.** *Nature* 2009, **459**:1005-1009.
13. Cazet A, Groux-Degroote S, Teylaert B, Kwon KM, Lehoux S, Sliomanny C, Kim CH, Le Bourhis X, Delannoy P: **GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells.** *Biol Chem* 2009, **390**:601-609.
14. Rakha EA, Boyce RW, Abd El-Rehim D, Kurien T, Green AR, Paish EC, Robertson JF, Ellis IO: **Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer.** *Mod Pathol* 2005, **18**:1295-1304.
15. Hanisch FG, Uhlenbruck G, Peter-Katalinic J, Egge H, Dabrowski J, Dabrowski U: **Structures of neutral O-linked poly(lactosaminoglycans on human skim milk mucins. A novel type of linearly extended poly-N-acetyllactosamine backbones with Gal beta(1-4)GlcNAc beta(1-6) repeating units.** *J Biol Chem* 1989, **264**:872-883.
16. Croce MV, Isla-Larrain M, Rabassa ME, Demichelis S, Colussi AG, Crespo M, Lacunza E, Segal-Eiras A: **Lewis x is highly expressed in normal tissues: a comparative immunohistochemical study and literature revision.** *Pathol Oncol Res* 2007, **13**:130-138.
17. Muller S, Hanisch FG: **Recombinant MUC1 probe authentically reflects cell-specific O-glycosylation profiles of endogenous breast cancer mucin. High density and prevalent core 2-based glycosylation.** *J Biol Chem* 2002, **277**:26103-26112.
18. Abecassis J, Collard R, Eber M, Pusel J, Fricker JP, Methlin G: **Proteinases and sialyltransferase in human breast tumors.** *Int J Cancer* 1984, **33**:821-824.
19. Springer GF: **T and Tn, general carcinoma autoantigens.** *Science* 1984, **224**:1198-1206.
20. Springer GF, Desai PR, Murthy MS, Scanlon EF: **Human carcinoma-associated precursor antigens of the NM blood group system.** *J Surg Oncol* 1979, **11**:95-106.
21. Schmitt FC, Figueiredo P, Lacerda M: **Simple mucin-type carbohydrate antigens (T, sialosyl-T, Tn and sialosyl-Tn) in breast carcinogenesis.** *Virchows Arch* 1995, **427**:251-258.
22. Tachibana K, Nakamura S, Wang H, Iwasaki H, Maebara K, Cheng L, Hirabayashi J, Narimatsu H: **Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography.** *Glycobiology* 2006, **16**:46-53.
23. Wu AM, Wu JH, Yang Z, Singh T, Goldstein IJ, Sharon N: **Differential contributions of recognition factors of two plant lectins, *Amaranthus caudatus* lectin and *Arachis hypogaea* agglutinin, reacting with Thomsen-Friedenreich disaccharide (Gal $\beta$ 1-3GalNAc1-Ser/Thr).** *Biochimie* 2008, **90**:1769-1780.
24. Lotan R, Skutelsky E, Danon D, Sharon N: **The purification, composition, and specificity of the anti-T lectin from peanut (*Arachis hypogaea*).** *J Biol Chem* 1975, **250**:8518-8523.
25. Pereira ME, Kabat EA, Lotan R, Sharon N: **Immunochemical studies on the specificity of the peanut (*Arachis hypogaea*) agglutinin.** *Carbohydr Res* 1976, **51**:107-118.
26. Hanisch FG, Baldus SE: **The Thomsen-Friedenreich (TF) antigen: a critical review on the structural, biosynthetic and histochemical aspects of a pancarcinoma-associated antigen.** *Histol Histopathol* 1997, **12**:263-281.
27. Cao Y, Stosiek P, Springer GF, Karsten U: **Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study.** *Histochem Cell Biol* 1996, **106**:197-207.
28. Schindlbeck C, Jeschke U, Schulze S, Karsten U, Janni W, Rack B, Krajewski S, Sommer H, Friese K: **Prognostic impact of Thomsen-Friedenreich tumor antigen and disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients.** *Breast Cancer Res Treat* 2007, **101**:17-25.
29. Schindlbeck C, Jeschke U, Schulze S, Karsten U, Janni W, Rack B, Sommer H, Friese K: **Characterisation of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich tumor antigen.** *Histochem Cell Biol* 2005, **123**:631-637.
30. Glinisky VV, Glinisky GV, Gliniskii OV, Huxley VH, Turk JR, Mossine VV, Deutscher SL, Pienta KJ, Quinn TP: **Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium.**

- Cancer Res* 2003, **63**:3805-3811.
31. Yu LG, Andrews N, Zhao Q, McKean D, Williams JF, Connor LJ, Gerasimenko OV, Hilkens J, Hirabayashi J, Kasai K, Rhodes JM: **Galectin-3 interaction with Thomsen-Friedenreich disaccharide on cancer-associated MUC1 causes increased cancer cell endothelial adhesion.** *J Biol Chem* 2007, **282**:773-781.
  32. Berger EG: **Tn-syndrome.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1455**:255-268.
  33. Ju T, Cummings RD: **Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn syndrome.** *Nature* 2005, **437**:1252.
  34. Ju T, Lanneau GS, Gautam T, Wang Y, Xia B, Stowell SR, Willard MT, Wang W, Xia JY, Zuna RE, Laszik Z, Benbrook DM, Hanigan MH, Cummings RD: **Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc.** *Cancer Res* 2008, **68**:1636-1646.
  35. Yoo NJ, Kim MS, Lee SH: **Absence of COSMC gene mutations in breast and colorectal carcinomas.** *Apms* 2008, **116**:154-155.
  36. Piller V, Piller F, Cartron JP: **Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins.** *Eur J Biochem* 1990, **191**:461-466.
  37. Brooks SA: **The involvement of Helix pomatia lectin (HPA) binding N-acetylgalactosamine glycans in cancer progression.** *Histol Histopathol* 2000, **15**:143-158.
  38. Springer GF: **Immunoreactive T and Tn epitopes in cancer diagnosis, prognosis, and immunotherapy.** *J Mol Med* 1997, **75**:594-602.
  39. Wang BL, Springer GF, Carlstedt SC: **Quantitative computerized image analysis of Tn and T (Thomsen-Friedenreich) epitopes in prognostication of human breast carcinoma.** *J Histochem Cytochem* 1997, **45**:1393-1400.
  40. Korourian S, Siegel E, Kieber-Emmons T, Monzavi-Karbassi B: **Expression analysis of carbohydrate antigens in ductal carcinoma in situ of the breast by lectin histochemistry.** *BMC Cancer* 2008, **8**:136.
  41. Kanska G, Guerry M, Caldefie-Chezet F, De Latour M, Guillot J: **Study of the expression of Tn antigen in different types of human breast cancer cells using VVA-B4 lectin.** *Oncol Rep* 2006, **15**:305-310.
  42. Kawaguchi T, Takazawa H, Imai S, Morimoto J, Watanabe T, Kanno M, Igarashi S: **Expression of Vicia villosa agglutinin (VVA)-binding glycoprotein in primary breast cancer cells in relation to lymphatic metastasis: is atypical MUC1 bearing Tn antigen a receptor of VVA?** *Breast Cancer Res Treat* 2006, **98**:31-43.
  43. Brooks SA, Leatham AJ: **Prediction of lymph node involvement in breast cancer by detection of altered glycosylation in the primary tumour.** *Lancet* 1991, **338**:71-74.
  44. Leatham AJ, Brooks SA: **Predictive value of lectin binding on breast-cancer recurrence and survival.** *Lancet* 1987, **1**:1054-1056.
  45. Danussi C, Coslovi A, Campa C, Mucignat MT, Spessotto P, Uggeri F, Paoletti S, Colombatti A: **A newly generated functional antibody identifies Tn antigen as a novel determinant in the cancer cell-lymphatic endothelium interaction.** *Glycobiology* 2009, **19**:1056-1067.
  46. van Vliet SJ, Saeland E, van Kooyk Y: **Sweet preferences of MGL: carbohydrate specificity and function.** *Trends Immunol* 2008, **29**:83-90.
  47. Saeland E, van Vliet SJ, Backstrom M, van den Berg VC, Geijtenbeek TB, Meijer GA, van Kooyk Y: **The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma.** *Cancer Immunol Immunother* 2007, **56**:1225-1236.
  48. Napoletano C, Rughetti A, Agervig Tarp MP, Coleman J, Bennett EP, Picco G, Sale P, Denda-Nagai K, Irimura T, Mandel U, Clausen H, Frati L, Taylor-Papadimitriou J, Burchell J, Nuti M: **Tumor-associated Tn-MUC1 glycoform is internalized through the macrophage galactose-type C-type lectin and delivered to the HLA class I and II compartments in dendritic cells.** *Cancer Res* 2007, **67**:8358-8367.
  49. Julien S, Delannoy P: **Sialyl-Tn antigen in cancer: from diagnosis to therapy.** In *Recent Research Developments in Cancer. Volume 5*. Edited by Pandalai SG. Kerala: Transworld Research Network; 2003:185-199.
  50. Julien S, Krzewinski-Recchi MA, Harduin-Lepers A, Gouyer V, Huet G, Le Bourhis X, Delannoy P: **Expression of sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc alpha2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I) cDNA.** *Glycoconj J* 2001, **18**:883-893.
  51. Sewell R, Backstrom M, Dalziel M, Gschmeissner S, Karlsson H, Noll T, Gatgens J, Clausen H, Hansson GC, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J: **The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer.** *J Biol Chem* 2006, **281**:3586-3594.
  52. Gold DV, Mattes MJ: **Monoclonal antibody B72.3 reacts with a core region structure of O-linked carbohydrates.** *Tumour Biol* 1988, **9**:137-144.
  53. Reddish MA, Jackson L, Koganty RR, Qiu D, Hong W, Longenecker BM: **Specificities of anti-sialyl-Tn and anti-Tn monoclonal antibodies generated using novel clustered synthetic glycopeptide epitopes.** *Glycoconj J* 1997, **14**:549-560.
  54. Ogata S, Koganty R, Reddish M, Longenecker BM, Chen A, Perez C, Itzkowitz SH: **Different modes of sialyl-Tn expression during malignant transformation of human colonic mucosa.** *Glycoconj J* 1998, **15**:29-35.
  55. Kinney AY, Sahin A, Vernon SW, Frankowski RF, Annegers JF, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Frye DK, Dhingra K: **The prognostic significance of sialyl-Tn antigen in women treated with breast carcinoma treated with adjuvant chemotherapy.** *Cancer* 1997, **80**:2240-2249.
  56. Leivonen M, Nordling S, Lundin J, von Boguslawski K, Haglund C: **STn and prognosis in breast cancer.** *Oncology* 2001, **61**:299-305.
  57. Clement M, Rocher J, Loirand G, Le Pendu J: **Expression of sialyl-Tn epitopes on beta1 integrin alters epithelial cell phenotype, proliferation and haptotaxis.** *J Cell Sci* 2004, **117**(Pt 21):5059-5069.
  58. Julien S, Picco G, Sewell R, Vercoutter-Edouart AS, Tarp M, Miles D, Clausen H, Taylor-Papadimitriou J, Burchell JM: **Sialyl-Tn vaccine induces antibody-mediated tumour protection in a relevant murine model.** *Br J Cancer* 2009, **100**:1746-1754.
  59. Ravn V, Dabelsteen E: **Tissue distribution of histo-blood group antigens.** *Apms* 2000, **108**:1-28.
  60. Kaneko M, Kudo T, Iwasaki H, Ikehara Y, Nishihara S, Nakagawa S, Sasaki K, Shiina T, Inoko H, Saitou N, Narimatsu H: **Alpha1,3-fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX.** *FEBS Lett* 1999, **452**:237-242.
  61. Mollicone R, Gibaud A, Francois A, Ratcliffe M, Oriol R: **Acceptor specificity and tissue distribution of three human alpha-3-fucosyltransferases.** *Eur J Biochem* 1990, **191**:169-176.
  62. Natsuka S, Gersten KM, Zenita K, Kannagi R, Lowe JB: **Molecular cloning of a cDNA encoding a novel human leukocyte alpha-1,3-fucosyltransferase capable of synthesizing the sialyl Lewis x determinant.** *J Biol Chem* 1994, **269**:16789-16794.
  63. Kitagawa H, Paulson JC: **Cloning and expression of human Gal beta 1,3(4) GlcNAc alpha 2,3-sialyltransferase.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **194**:375-382.
  64. Ellies LG, Sperandio M, Underhill GH, Yousif J, Smith M, Priatel JJ, Kansas GS, Ley K, Marth JD: **Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation.** *Blood* 2002, **100**:3618-3625.
  65. Kukowska-Latallo JF, Larsen RD, Nair RP, Lowe JB: **A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase.** *Genes Dev* 1990, **4**:1288-1303.
  66. Sasaki K, Kurata K, Kojima N, Kurosawa N, Ohta S, Hanai N, Tsuji S, Nishi T: **Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase).** *J Biol Chem* 1994, **269**:15950-15956.
  67. Maly P, Thall A, Petryniak B, Rogers CE, Smith PL, Marks RM, Kelly RJ, Gersten KM, Cheng G, Saunders TL, Camper SA, Camphausen RT, Sullivan FX, Isogai Y, Hindsgaul O, von Andrian UH, Lowe JB: **The alpha(1,3)fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis.** *Cell* 1996, **86**:643-653.
  68. Renkonen J, Paavonen T, Renkonen R: **Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis(x) and sialyl Lewis(a) in lesions of breast carcinoma.** *Int J Cancer* 1997, **74**:296-300.
  69. Matsuura N, Narita T, Mitsuoaka C, Kimura N, Kannagi R, Imai T, Funahashi H, Takagi H: **Increased level of circulating adhesion molecules in the sera of breast cancer patients with distant metastases.** *Jpn J Clin Oncol* 1997, **27**:135-139.
  70. Jeschke U, Mylonas I, Shabani N, Kunert-Keil C, Schindlbeck C, Gerber B, Friese K: **Expression of sialyl lewis X, sialyl Lewis A, E-cadherin and cathepsin-D in human breast cancer: immunohistochemical analysis in mammary carcinoma in situ, invasive carcinomas and their lymph node metastasis.** *Anticancer Res* 2005, **25**:1615-1622.
  71. Nakagoe T, Fukushima K, Itoyanagi N, Ikuta Y, Oka T, Nagayasu T, Ayabe H, Hara S, Ishikawa H, Minami H: **Expression of ABH/Lewis-related antigens as prognostic factors in patients with breast cancer.** *J Cancer Res Clin Oncol* 2002, **128**:257-264.
  72. Matsuura N, Narita T, Hiraiwa N, Hiraiwa M, Murai I, Iwase T, Funahashi H, Imai T, Takagi H, Kannagi R: **Gene expression of fucosyl- and sialyl-transferases which synthesize sialyl Lewisx, the carbohydrate ligands for E-selectin, in**

- human breast cancer. *Int J Oncol* 1998, **12**:1157-1164.
73. Hsu CC, Lin TW, Chang WW, Wu CY, Lo WH, Wang PH, Tsai YC: Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids. *Gynecol Oncol* 2005, **96**:415-422.
  74. Idikio HA, Manickavel V: Lewis blood group antigens (a and b) in human breast tissues. Loss of Lewis-b in breast cancer cells and correlation with tumor grade. *Cancer* 1991, **68**:1303-1308.
  75. Abd Hamid UM, Royle L, Saldova R, Radcliffe CM, Harvey DJ, Storr SJ, Pardo M, Antrobus R, Chapman CJ, Zitzmann N, Robertson JF, Dwek RA, Rudd PM: A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression. *Glycobiology* 2008, **18**:1105-1118.
  76. Kurebayashi J, Nomura T, Hirono M, Okubo S, Udagawa K, Shiiki S, Ikeda M, Nakashima K, Tanaka K, Sonoo H: Combined measurement of serum sialyl Lewis X with serum CA15-3 in breast cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 2006, **36**:150-153.
  77. Hellstrom I, Garrigues HJ, Garrigues U, Hellstrom KE: Highly tumor-reactive, internalizing, mouse monoclonal antibodies to Le(y)-related cell surface antigens. *Cancer Res* 1991, **50**:2183-2190.
  78. Madjd Z, Parsons T, Watson NF, Spendlove I, Ellis I, Durrant LG: High expression of Lewis y/b antigens is associated with decreased survival in lymph node negative breast carcinomas. *Breast Cancer Res* 2005, **7**:R780-R787.
  79. Kelly MP, Lee FT, Smyth FE, Brechbiel MW, Scott AM: Enhanced efficacy of 90Y-radiolabeled anti-Lewis Y humanized monoclonal antibody hu3S193 and paclitaxel combined-modality radioimmunotherapy in a breast cancer model. *J Nucl Med* 2006, **47**:716-725.
  80. Pinho SS, Reis CA, Gartner F, Alpaugh ML: Molecular plasticity of E-cadherin and sialyl lewis x expression, in two comparative models of mammary tumorigenesis. *PLoS One* 2009, **4**:e6636.
  81. Tettamanti G: Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj J* 2004, **20**:301-317.
  82. Marquina G, Waki H, Fernandez LE, Kon K, Carr A, Valiente O, Perez R, Ando S: Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res* 1996, **56**:5165-5171.
  83. Oliva JP, Valdes Z, Casaco A, Pimentel G, Gonzalez J, Alvarez I, Osorio M, Velazco M, Figueroa M, Ortiz R, Escobar X, Orozco M, Cruz J, Franco S, Diaz M, Roque L, Carr A, Vázquez AM, Mateos C, Rubio MC, Pérez R, Fernández LE: Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14F7 monoclonal antibody labelled with (99m)Tc. *Breast Cancer Res Treat* 2006, **96**:115-121.
  84. Ruckhaberle E, Rody A, Engels K, Gaetje R, von Minckwitz G, Schiffmann S, Grosch S, Geisslinger G, Holtrich U, Karn T, Kaufmann M: Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008, **112**:41-52.
  85. Ruckhaberle E, Karn T, Rody A, Hanka L, Gaetje R, Metzler D, Holtrich U, Kaufmann M: Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009, **135**:1005-1013.
  86. Gu Y, Zhang J, Mi W, Yang J, Han F, Lu X, Yu W: Silencing of GM3 synthase suppresses lung metastasis of murine breast cancer cells. *Breast Cancer Res* 2008, **10**:R1.
  87. Goss PE, Baker MA, Carver JP, Dennis JW: Inhibitors of carbohydrate processing: a new class of anticancer agents. *Clin Cancer Res* 1995, **1**:935-944.
  88. Paszkiewicz-Gadek A, Porowska H, Lemancewicz D, Wolczynski S, Gindziński A: The influence of N- and O-glycosylation inhibitors on the glycosylation profile of cellular membrane proteins and adhesive properties of carcinoma cell lines. *Int J Mol Med* 2006, **17**:669-674.
  89. Tanaka T, Decuzzi P, Cristofanilli M, Sakamoto JH, Tasciotti E, Robertson FM, Ferrari M: Nanotechnology for breast cancer therapy. *Biomed Microdevices* 2009, **11**:49-63.
  90. Lo NW, Dennis JW, Lau JT: Overexpression of the alpha2,6-sialyltransferase, ST6Gal I, in a low metastatic variant of a murine lymphoblastoid cell line is associated with appearance of a unique ST6Gal I mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, **264**:619-621.
  91. Taniguchi A: Promoter structure and transcriptional regulation of human beta-galactoside alpha2, 3-sialyltransferase genes. *Curr Drug Targets* 2008, **9**:310-316.
  92. Glinsky VV, Huflejt ME, Glinsky GV, Deutscher SL, Quinn TP: Effects of Thomsen-Friedenreich antigen-specific peptide P-30 on beta-galactoside-mediated homotypic aggregation and adhesion to the endothelium of MDA-MB-435 human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 2000, **60**:2584-2588.
  93. Heimbürg J, Yan J, Morey S, Glinskii OV, Huxley VH, Wild L, Klick R, Roy R, Glinsky VV, Rittenhouse-Olson K: Inhibition of spontaneous breast cancer metastasis by anti-Thomsen-Friedenreich antigen monoclonal antibody JAA-F11. *Neoplasia* 2006, **8**:939-948.
  94. Fernandez LE, Alonso DF, Gomez DE, Vazquez AM: Ganglioside-based vaccines and anti-idiotype antibodies for active immunotherapy against cancer. *Expert Rev Vaccines* 2003, **2**:817-823.
  95. Vazquez AM, Gabri MR, Hernandez AM, Alonso DF, Beausoleil I, Gomez DE, Perez R: Antitumor properties of an anti-idiotypic monoclonal antibody in relation to N-glycolyl-containing gangliosides. *Oncol Rep* 2000, **7**:751-756.
  96. Fuentes D, Avellanet J, Garcia A, Iglesias N, Gabri MR, Alonso DF, Vazquez AM, Perez R, Montero E: Combined therapeutic effect of a monoclonal anti-idiotype tumor vaccine against NeuGc-containing gangliosides with chemotherapy in a breast carcinoma model. *Breast Cancer Res Treat* 2010, **120**:379-389.
  97. Diaz A, Alfonso M, Alonso R, Saurez G, Troche M, Catala M, Diaz RM, Perez R, Vazquez AM: Immune responses in breast cancer patients immunized with an anti-idiotype antibody mimicking NeuGc-containing gangliosides. *Clin Immunol* 2003, **107**:80-89.
  98. Guthmann MD, Castro MA, Cinat G, Venier C, Koliren L, Bitton RJ, Vazquez AM, Fainboim L: Cellular and humoral immune response to N-Glycolyl-GM3 elicited by prolonged immunotherapy with an anti-idiotypic vaccine in high-risk and metastatic breast cancer patients. *J Immunother* 2006, **29**:215-223.
  99. Miles D, Papazisis K: Rationale for the clinical development of STn-KLH (Theratope) and anti-MUC-1 vaccines in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2003, **3**(Suppl 4):S134-S138.
  100. Slovin SF, Ragupathi G, Fernandez C, Diani M, Jefferson MP, Wilton A, Kelly WK, Morris M, Solit D, Clausen H, Livingston P, Scher HI: A polyvalent vaccine for high-risk prostate patients: 'are more antigens better?' *Cancer Immunol Immunother* 2007, **56**:1921-1930.

doi:10.1186/bcr2577

Cite this article as: Cazet A, et al.: Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Research* 2010, **12**:204.



### **III. LES GANGLIOSIDES COMPLEXES : FONCTIONS AU CŒUR DE LA CELLULE ET DANS LE PROCESSUS DE CANCERISATION**

#### **III. A. La biosynthèse des gangliosides**

##### **III. A. 1. Structure**

###### ***III. A. 1. a) Les glycosphingolipides***

Les glycosphingolipides (GSLs) sont des molécules amphipatiques, ancrées principalement au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique *via* un céramide hydrophobe. Les céramides sont composés d'un acide gras à longue chaîne, relié par une liaison amide à une base sphingoïde, généralement la sphingosine (**Figure 14**). Leur partie hydrophile, composée d'une chaîne glycanique plus ou moins complexe, participe à la formation du glycocalix de la cellule, au même titre que les chaînes portées par les glycoprotéines et les protéoglycannes.

Les GSLs présentent donc une grande hétérogénéité de structure de par les multiples combinaisons envisageables pour la formation des épitopes glycaniques et de la partie hydrophobe céramide (Degroote *et al*, 2004). Ainsi, plus de 60 bases sphingoïdes et 300 chaînes oligosaccharidiques différentes ont été caractérisées, offrant par combinaison des centaines de structures théoriquement possibles. La base sphingoïde peut varier en longueur, en degré de saturation, d'hydroxylation ou encore en branchement. La sphingosine (18 :1) constitue la base la plus représentée chez les mammifères, avant ses dérivés sphinganine et phytosphingosine. L'acide gras est quant à lui généralement long ( $\geq 16$ ) et saturé. Les conséquences fonctionnelles de l'hétérogénéité structurale des céramides sont encore mal définies. Il semblerait toutefois que la partie lipidique puisse influencer la localisation et les fonctions des GSLs au sein de la membrane plasmique, notamment par une interaction directe avec le cholestérol, les phospholipides et les domaines transmembranaires des protéines. La structure glycanique peut contenir plusieurs résidus de monosaccharides comprenant essentiellement des hexoses (glucose, galactose, fucose), des *N*-acétylhexosamines (*N*-acétylglucosamine, *N*-acétylgalactosamine) et des acides sialiques (*N*-acétylneuraminique ou *N*-glycosylneuraminique). Un groupement sulfate peut également y être ajouté.

La classification et la nomenclature des GSLs sont basées sur la structure centrale (ou core) de leur chaîne oligosaccharidique. Ils sont ainsi regroupés en série lacto, globo et ganglio (**Tableau 4**).

**Tableau 4 : Structures oligosaccharidiques déterminant les différentes séries de glycosphingolipides.** Cer : céramide ; Glc : glucose ; Gal : galactose ; GlcNAc : *N*-acétylglucosamine ; GalNAc : *N*-acétylgalactosamine (adapté des recommandations concernant la nomenclature des glycolipides du site <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/glylp.html>; Hakomori, 2003 ; Degroote *et al.*, 2004)

Nom de la série	Sous-classe	Symbole	Structure
Lacto	Lacto	Lc	Gal $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1Cer
	Neolacto	nLc	Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1Cer
Globo	Globo	Gb	GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1Cer
	Isoglobo	iGb	GalNAc $\beta$ 1-3Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1Cer
Ganglio		Gg	Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\beta$ 1-4Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1Cer

De manière simplifiée, les GSLs peuvent également être classés selon trois grandes catégories :

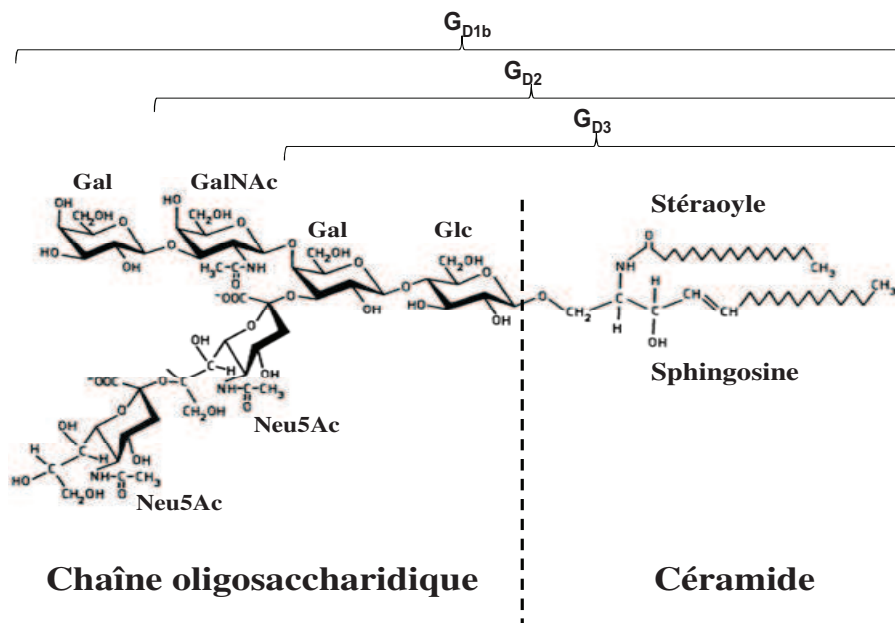
- les GSL neutres dont la chaîne oligosaccharidique ne contient que des monosaccharides neutres : glucosylcéramide (Glc $\beta$ 1-Cer ou GlcCer), galactosylcéramide (Gal $\beta$ 1-Cer ou GalCer), lactosylcéramide (Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer ou LacCer) ainsi que les séries globo- et lacto- (**Tableau 4**).
- les sulfatides comprenant notamment le galactosylcéramide-sulfate (HSO<sub>3</sub>-3GalCer) et le lactosylcéramide-sulfate (HSO<sub>3</sub>-3LacCer).
- les gangliosides dont la chaîne glycanique contient un ou plusieurs résidus d'acides sialiques.

### III. A. 1. b) Les GSLs de la famille ganglio

Chez l'homme, les gangliosides sont des GSLs dont le céramide est substitué par un core glycanique porteur de résidus de *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) ou de *N*-glycosylneuraminique (Neu5Gc), respectivement en conditions physiologiques et pathologiques, (**Figure 15**). Des dérivés de l'acide sialique, tels que des dérivés *O*-acétylés, peuvent également être détectés. Les gangliosides appartiennent à la série ganglio, mais peuvent éga-

lement être retrouvés au niveau des GSLs des séries lacto et globo. Dans ce manuscrit, pour simplifier les propos, le terme « ganglioside » définit les GSLs de la série ganglio.

Selon la classification de Svennerholm, ces sialoglycosphingolipides sont nommés par des abréviations correspondant au nombre de résidus d'acides sialiques présents dans la molécule ( $G_M$  pour monosialoganglioside,  $G_D$  pour disialoganglioside,  $G_T$  pour trisialoganglioside...) et à leur ordre de migration en chromatographie sur couche mince ( $G_{M3}$ ,  $G_{M2}$ ,  $G_{M1}$ ...) (**Tableau 5**) (Svennerholm, 1964). Une nouvelle nomenclature, fondée sur la connaissance précise des structures glycaniques des gangliosides, a été recommandée par la commission de nomenclature biochimique (IUPAC-IUB, 1978). Dans ce système, l'abréviation Cer pour nommer le céramide est précédée du préfixe Lac ou, si la chaîne est plus complexe, du nom ose indicé du nombre de résidus glucidiques présents et précédé des lettres Gg pour la série ganglio. La position de l'acide sialique substitué est indiquée par un chiffre romain et son point d'ancrage sur le carbone du monosaccharide accepteur par un chiffre arabe (**Tableau 5**). Cependant, la classification de Svennerholm reste la plus couramment utilisée et celle qui sera employée dans ce manuscrit, par souci de simplicité.



**Figure 14 : Représentation schématique de gangliosides complexes disialylés : le  $G_{D3}$ , le  $G_{D2}$  et le  $G_{D1b}$ .** La chaîne glycanique des gangliosides, qui constitue la partie hydrophile, est reliée par une liaison *O*-glycosidique à l'alcool primaire de la base sphingoïde du céramide. Le motif lactosylcéramide ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{Glc}\beta 1\text{-Cer}$ ) représente l'élément précurseur pour la synthèse des chaînes sialylées des gangliosides. Glc : glucose ; Gal : galactose ; GalNAc : *N*-acétylgalactosamine ; Neu5Ac : acide *N*-acétylneuraminique (adapté de Tettamanti, 2004).

**Table 5 : Nomenclature et structures des principaux gangliosides.** Gg : ganglioside ; Cer : céramide ; Lac : lactose ; Neu5Ac : *N*-acétylneuraminique. Résidus : ● : glucose ; ● : galactose ; ■ : *N*-acétylgalactosamine ; ◆ : acide sialique.

Nomenclature de Svennerholm	Nomenclature IUPAC-IUB	Structure
G <sub>M3</sub>	II <sup>3</sup> Neu5Ac-Lac-Cer	
G <sub>M2</sub>	II <sup>3</sup> Neu5Ac-GgOse <sub>3</sub> -Cer	
G <sub>M1</sub>	II <sup>3</sup> Neu5Ac- GgOse <sub>4</sub> -Cer	
G <sub>D1a</sub>	IV <sup>3</sup> Neu5Ac,II <sup>3</sup> Neu5Ac-GgOse <sub>4</sub> -Cer	
G <sub>D3</sub>	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -Lac-Cer	
G <sub>D2</sub>	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -GgOse <sub>3</sub> -Cer	
G <sub>D1b</sub>	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -GgOse <sub>4</sub> -Cer	
G <sub>Q1b</sub>	IV <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> ,II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>2</sub> -GgOse <sub>4</sub> -Cer	
G <sub>T3</sub>	II <sup>3</sup> (Neu5Ac) <sub>3</sub> -Lac-Cer	



### **III. A. 2. Localisation**

Les gangliosides sont exprimés dans les tissus de mammifères selon un profil spécifique de l'espèce, de l'organe ou du tissu considéré, mais aussi en fonction du stade de développement et de différenciation cellulaire.

#### ***III. A. 2. a) Localisation tissulaire***

D'un point de vue histologique, les gangliosides sont particulièrement abondants au niveau du cerveau et du système nerveux central. Ils y jouent des rôles essentiels dans le développement et l'organisation tissulaire. Une absence d'expression des gangliosides (*via* une inhibition de la céramide glucosyltransférase ou un double knockout des  $G_{M3}$  et  $G_{M2}$  synthétases) induit une mortalité précoce des modèles murins, liée à une dégénérescence axonale et à une absence de différenciation neuronale (Yamashita *et al.*, 1999 ; Yamashita *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2010). Les gangliosides simples sont exprimés dans quasiment tous les tissus de l'organisme, et plus particulièrement le  $G_{M3}$ . Une dizaine de gangliosides ont également été détectés dans le sérum humain (Senn *et al.*, 1989).

#### ***III. A. 2. b) Localisation cellulaire***

A l'échelle de la cellule, de nombreuses études suggèrent que ces GSLs acides ne sont pas distribués au hasard mais sont, au contraire, concentrés au niveau de microdomaines particuliers de la membrane plasmique. Ces domaines, regroupés sous le nom de glycosynapse, présentent des fonctions spécifiques dans lesquels les gangliosides jouent un rôle prépondérant notamment dans la reconnaissance cellulaire et la transduction de signaux extracellulaires (Hakomori, 2002 ; Todeschini et Hakomori, 2008a). Ces domaines sont des radeaux lipidiques ou des cavéoles, riches en cholestérol, glycosphingolipides et sphingomyéline, et en protéines particulières (intégrines, tétraspanines, récepteurs aux facteurs de croissance, protéines de signalisation de la famille des Src-tyrosine kinases ou encore protéines à ancre glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)). Les GSLs et les gangliosides participent aux propriétés physico-chimiques de ces microdomaines membranaires (Degroote *et al.*, 2004 ; Gupta et Surolia, 2010).

## *Introduction bibliographique*

Dans le cadre du processus métabolique, les gangliosides sont retrouvés dans les vésicules d'endocytose et d'exocytose ainsi que dans les membranes des compartiments intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les endosomes et les lysosomes, où ils sont synthétisés, transportés ou dégradés.

De plus, des études ont permis de démontrer l'expression et l'activité de GTs impliquées dans la biosynthèse des motifs précurseurs des gangliosides (céramide glucosyltransférase, LacCer et G<sub>M3</sub> synthétases) au niveau des membranes associées aux mitochondries, ou MAM (Ardail *et al.*, 2003). Ceci conduit à l'accumulation de G<sub>M3</sub>, de G<sub>M1</sub> et à une faible quantité de G<sub>D3</sub> dans ce sous-compartiment du réticulum endoplasmique étroitement associé à la mitochondrie (Ardail *et al.*, 2003 ; Sano *et al.*, 2009).

Des expériences d'immunocytochimie et de microscopie confocale ont permis de mettre en évidence une interaction entre certains gangliosides et la vimentine, composant des filaments intermédiaires, en conditions normales et pathologiques (Kotani *et al.*, 1994; Mennel et Lell, 2005). Les gangliosides ont pu également être détectés dans le noyau de cellules lymphoblastiques HUT-78 ou neuronales (Tempera *et al.*, 2008 ; Copani *et al.*, 2002 ; Saito et Sugiyama, 2002).

Finalement, une accumulation du ganglioside disialylé G<sub>D3</sub> peut être retrouvée au niveau des mitochondries, suite à l'activation des récepteurs de mort cellulaire Fas ou TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptor*) par leurs ligands respectifs (De Maria *et al.*, 1997 ; Rippon *et al.*, 2000). Ceci contribue, par un mécanisme encore inconnu, à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et au relargage dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome *c* et la pro-caspase 9. Ce phénomène a été décrit *in vitro*, à la fois sur des mitochondries isolées et sur une variété de cellules en culture (Morales *et al.*, 2004). De manière intéressante, l'acétylation du G<sub>D3</sub> supprime l'activité pro-apoptotique de ce ganglioside. Contrairement au G<sub>D3</sub>, le 9-*O*-acétyl-G<sub>D3</sub> est incapable d'induire le relargage du cytochrome *c* à partir de mitochondries purifiées et confère aux cellules cancéreuses HEK-293 une résistance à la mort cellulaire programmée (Malisan *et al.*, 2002a).

### III. A. 3. Le métabolisme des GSLs de la série ganglio

#### III. A. 3. a) La biosynthèse des gangliosides

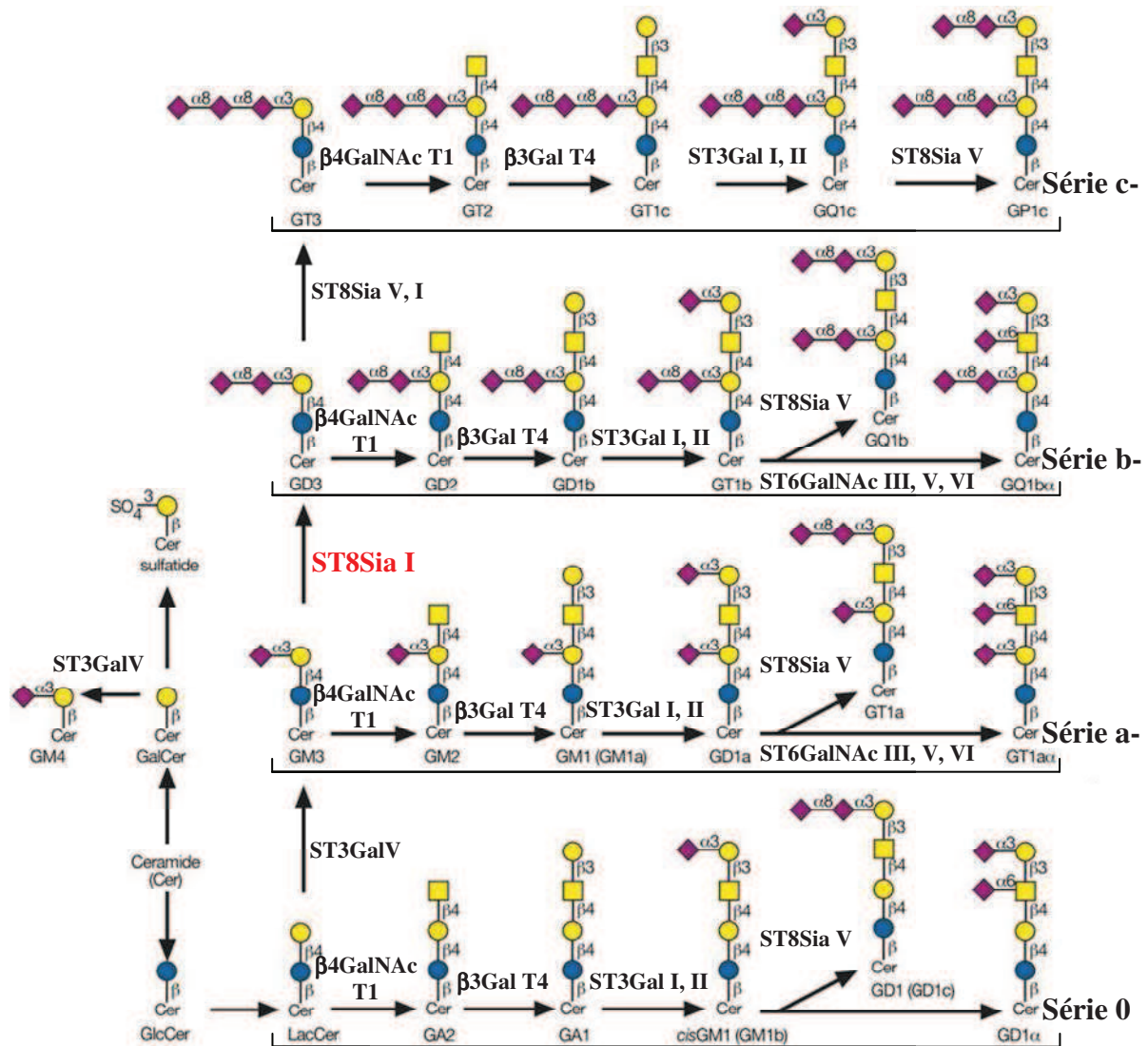
- Description

La biosynthèse des gangliosides débute par la formation du céramide au niveau de la face cytosolique du réticulum endoplasmique. Le céramide ainsi formé est transféré vers l'appareil de Golgi, à la fois par un transport vésiculaire et par un transport non vésiculaire impliquant la protéine CERT (*CERamide Transport protein*) (Perry et Ridgway, 2005 ; Hanada *et al.*, 2009). Le céramide y est transformé en glucosylcéramide (Glc $\beta$ 1-Cer ou GlcCer) *via* l'action d'une UDP-glucose : céramide glucosyltransférase (UGCG). Cette étape particulière semble être effectuée sur la face cytosolique du *cis*-Golgi. Après translocation du GlcCer dans la lumière de l'appareil de Golgi, la glycosylation du GlcCer par la lactosylcéramide synthétase conduit à la formation du lactosylcéramide (Gal $\beta$ 1-4Glc $\beta$ 1-Cer ou LacCer), motif précurseur de la synthèse des gangliosides. A noter, seul le G<sub>M4</sub> est synthétisé à partir du galactosylcéramide, et non du LacCer (Degroote *et al.*, 2004). Différentes sialyltransférases (ST3Gal V, ST8Sia I et ST8Sia V, correspondant respectivement à la G<sub>M3</sub> synthétase, la G<sub>D3</sub> synthétase et la G<sub>T3</sub> synthétase) catalysent la synthèse des gangliosides G<sub>M3</sub>, G<sub>D3</sub>, et G<sub>T3</sub>. Le lactosylcéramide et ces dérivés sialylés sont eux mêmes convertis en gangliosides plus complexes classés en familles 0-, a-, b- ou c-, *via* l'action coordonnée et successive de diverses glycosyltransférases (*N*-acétylgalactosaminyltransférase  $\beta$ 4GalNAc T1 ou G<sub>M2</sub>/G<sub>D2</sub> synthétase, galactosyltransférase  $\beta$ 3Gal T4 et les sialyltransférases ST3Gal I ou II et ST8Sia V) (**Figure 15**).

Les sialyltransférases citées ci-dessus présentent des spécificités de substrats différentes. Ainsi, ST3Gal I, ST3Gal II et ST3Gal V catalysent la formation d'une liaison en  $\alpha$ 2,3 sur un résidu de galactose alors que ST8Sia I et ST8Sia V participent à la synthèse de structures linéaires di- ou trisialylées en formant des liaisons en  $\alpha$ 2,8 sur un autre résidu d'acide sialique (Tettamanti, 2004). De manière intéressante, il a été démontré *in vitro* que la G<sub>D3</sub> synthétase est capable de participer à la biosynthèse du G<sub>T3</sub> (Nakayama *et al.*, 1996).

Il est possible de définir deux grandes classes de GSLs acides : les gangliosides simples des séries 0- et a-, caractérisés par l'absence ou le faible nombre de résidus d'acide sialique, et les gangliosides complexes des séries b- et c-, porteurs d'un plus grand nombre de résidus Neu5Ac (**Figure 15**). L'expression des gangliosides complexes est gouvernée par une enzyme

clef du métabolisme des gangliosides : la  $G_{D3}$  synthétase ou ST8Sia I (point développé dans le paragraphe III.A.2.d).



**Figure 15: Représentation schématique de la synthèse des gangliosides.** Les gangliosides dérivent du lactosylcéramide (LacCer) par l'addition séquentielle de différents monosaccharides, incluant l'acide sialique, par un ensemble de glycosyltransférases spécifiques. Le LacCer est sialylé en  $G_{M3}$ , le  $G_{M3}$  en  $G_{D3}$  et le  $G_{D3}$  en  $G_{T3}$  par l'action successive des sialyltransférases ST3Gal V, ST8Sia I et ST8Sia V. Il est intéressant de noter que la série 0- compte des asialogangliosides, qui dérivent du LacCer par ajout d'un résidu de *N*-acétylgalactosamine ( $G_{A2}$  ou asialo- $G_{M2}$ ), de galactose ( $G_{A1}$  ou asialo- $G_{M1}$ ) et de résidus d'acide sialique. La sialyltransférase ST8Sia I ou  $G_{D3}$  synthétase représente l'enzyme clef de la biosynthèse des gangliosides complexes des séries b- et c-, porteurs de plusieurs résidus d'acide sialique. Cer : céramide ; GalCer : galactosylcéramide ; GlcCer : glucosylcéramide ; LacCer : lactosylcéramide. Résidus : ● : glucose ; ● : galactose ; ■ : *N*-acétylgalactosamine ; ◆ : *N*-acétylneuraminique (adapté de Varki *et al.*, 2009)

- Organisation supramoléculaire des enzymes intervenant dans la biosynthèse des gangliosides

Les précurseurs LacCer, G<sub>M3</sub> et G<sub>D3</sub> semblent être formés dans le Golgi proximal et distal, alors que les gangliosides plus complexes se limiteraient au niveau du Golgi distal et ceci en raison de l'organisation et de la localisation des GTs impliquées dans leur biosynthèse. Ainsi, par des techniques de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) et d'immunoprécipitation, Giraudo et ses collaborateurs ont décrit un complexe supramoléculaire du réseau *trans*-Golgien composé des glycosyltransférases  $\beta$ 4GalNAc T1 et  $\beta$ 3Gal T4 (Giraudo *et al.*, 2001). Ces enzymes membranaires de type II interagissent par leur partie N-terminale, comprenant la queue cytosolique et la région transmembranaire. Ce complexe enzymatique convertit directement le G<sub>M3</sub> en G<sub>M1</sub> et pourrait expliquer pourquoi certains types cellulaires ou tissus tel que le cerveau sont enrichis en G<sub>M1</sub> et en G<sub>D1a</sub>, mais pas en G<sub>M2</sub> (Giraudo *et al.*, 2001 ; van Meer, 2001). De même, la lactosylcéramide, la G<sub>M3</sub> et la G<sub>D3</sub> synthétases s'organisent pour former un système multienzymatique dépendant de la G<sub>M3</sub> synthétase au niveau du Golgi proximal (Giraudo et Maccioni, 2003).

Les gangliosides ainsi formés gagnent leur destination principale, la membrane plasmique, *via* la voie des vésicules d'exocytose.

La biosynthèse des gangliosides semble également prendre part à la membrane plasmique, comme a pu le démontrer récemment l'équipe de Daniotti (Crespo *et al.*, 2010). L'expression de la G<sub>D3</sub> synthétase au niveau de la membrane plasmique de cellules épithéliales et de mélanome assure donc la sialylation du G<sub>M3</sub> en dehors des compartiments golgiens, à partir du donneur CMP-Neu5Ac endogène. L'expression de la G<sub>M2</sub>/G<sub>D2</sub> synthétase a pu également être mise en évidence à la surface de cellules CHO-K1, par des expériences d'immunocytochimie et de microscopie confocale, mais sans activité enzymatique apparente.

- Les gangliosides de la série  $\alpha$

La série  $\alpha$  des gangliosides représente un groupe mineur et peu décrit. Ces derniers portent un résidu d'acide sialique en position C6 sur le résidu GalNAc de la chaîne oligosaccharidique (Murayama *et al.*, 1986; Taki *et al.*, 1986 ; Hirabayashi *et al.*, 1990). Cette liaison est réalisée par des  $\alpha$ 2,6 sialyltransférases telle que ST6GalNAc V (paragraphe I.B.3.c ; **Figure 15**). Les précurseurs de cette série sont les gangliosides asialo-G<sub>M2</sub>, G<sub>M1a</sub>, G<sub>M1b</sub>, G<sub>D1a</sub> donnant nais-

sance au  $G_{M2\alpha}$ ,  $G_{D1\alpha\alpha}$ ,  $G_{D1\alpha}$ ,  $G_{T1\alpha\alpha}$  et  $G_{Q1b\alpha}$  respectivement. Le  $G_{D1\alpha}$  peut être converti en  $G_{T1\alpha\alpha}$  puis en  $G_{Q1b\alpha}$ .

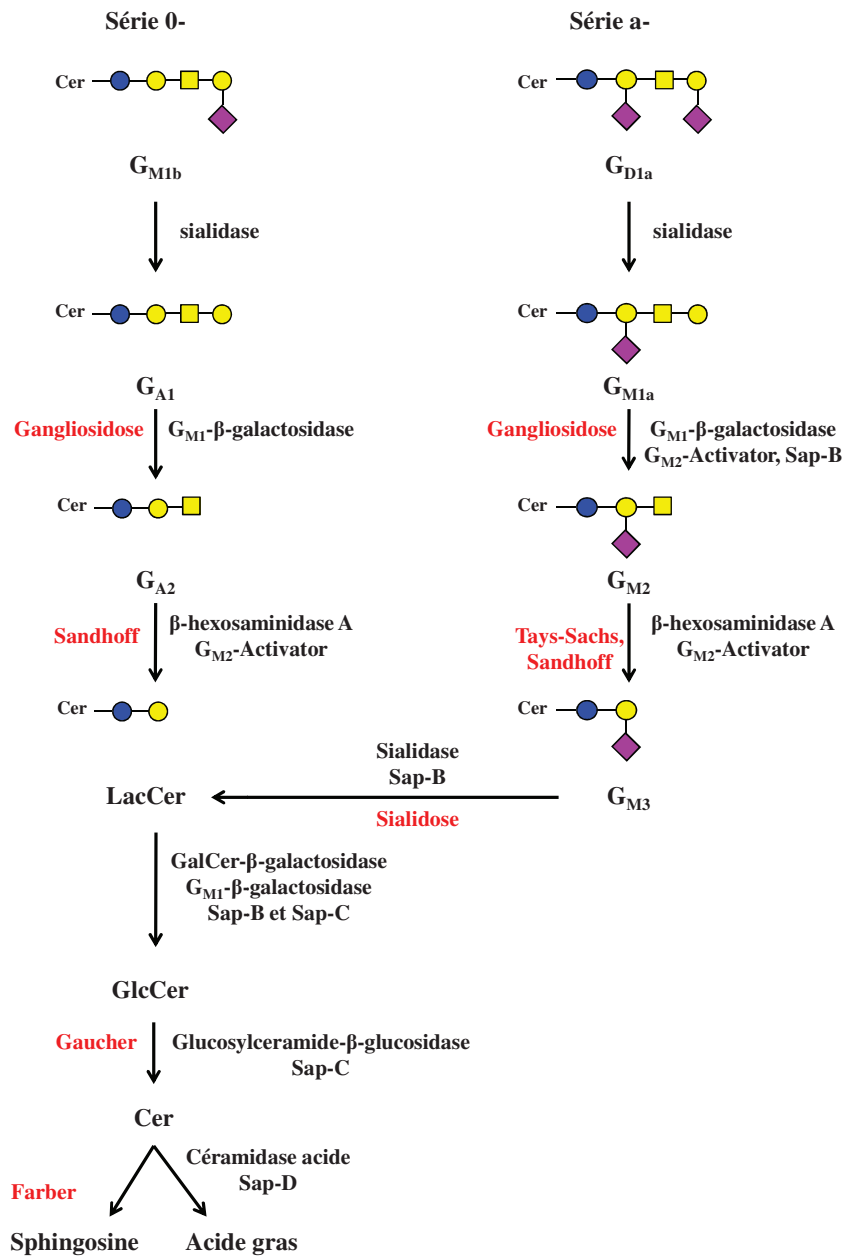
### **III. A. 3. b) Le catabolisme des gangliosides**

Afin d'être dégradés, les gangliosides exprimés au niveau de la membrane plasmique sont internalisés par un mécanisme d'endocytose puis acheminés jusqu'aux endosomes par l'intermédiaire de vésicules coatées. De là, une partie des gangliosides est redirigée vers la membrane plasmique, une autre rejoint l'appareil de Golgi, mais la majeure partie est acheminée vers les lysosomes, lieu de leur dégradation (Tettamanti, 2004 ; Schulze *et al.*, 2009).

La dégradation lysosomale est un processus séquentiel qui débute par le retrait de résidus monosaccharidiques en position non réductrice par des exoglycosidases (**Figure 16**). L'action de ces hydrolases est facilitée pour les gangliosides à la chaîne glucidique courte ( $\leq 4$  résidus) par la présence de cofacteurs protéiques nommés *Spingolipid Activator Proteins* (SAPs). Par exemple, la *G<sub>M2</sub>-Activator Protein* (GM2-AP) se lie avec une forte affinité aux glycosphingolipides  $G_{M2}$ ,  $G_{M1}$  et  $G_{A2}$  insérés dans la membrane des lysosomes et les extrait pour faciliter leur accessibilité aux hydrolases (Klima, 1993 ; Wilkening *et al.*, 2000). De même, la protéine Sap-C est nécessaire pour la dégradation lysosomale du GlcCer par la glucosylcéramide  $\beta$ -glucosidase. Cette molécule se lie à la fois au GlcCer et à la glucosidase lysosomale associée, favorisant ainsi directement l'activité de l'hydrolase (Wilkening *et al.*, 1998).

Les sialidases Neu1 lysosomale, Neu2 cytosolique et Neu4 lysosomale, mitochondriale et réticulaire catalysent l'hydrolyse des résidus d'acide sialique sur les gangliosides, mais également sur des glycopeptides et des oligosaccharides libres. La sialidase Neu3, localisée dans la membrane plasmique, est spécifique des gangliosides. Elle semblerait jouer un rôle dans la signalisation cellulaire, notamment dans l'apoptose et les interactions cellule-cellule, en contrôlant le taux des gangliosides à la surface cellulaire (Kakugawa *et al.*, 2002 ; Papini *et al.*, 2004 ; Miyagi *et al.*, 2008).

Une voie alternative pour la dégradation des glycosphingolipides s'effectue *via* l'action d'une endoglycocéramidase ou céramide glycanase, qui permet de couper la liaison  $\beta$ -glycosidique entre le glucose de la chaîne saccharidique et le céramide (**Figure 16**). Cependant, si la participation de ces enzymes ne fait aucun doute chez les bactéries, celle-ci est sujette à controverse chez les vertébrés (Tettamanti, 2004). Enfin, la liaison entre l'acide gras du céramide et la base sphingoïde est hydrolysée par une céramidase acide, en présence de la protéine Sap-D (Linke *et al.*, 2001).



**Figure 16: Représentation schématique de la dégradation des gangliosides des séries 0- et a-.** A droite des flèches sont notés les enzymes et les cofacteurs intervenant dans la dégradation des gangliosides; à gauche sont indiquées les pathologies associées à une anomalie du processus catabolique. Cer : céramide ; GlcCer : glucosylcéramide ; LacCer : lactosylcéramide. Résidus : ● : glucose ; ● : galactose ; ■ : *N*-acétylgalactosamine ; ◆ : *N*-acétylneuraminique (adapté de Tettamanti, 2004).

### **III. A. 3. c) La régulation du métabolisme gangliosidique**

L'équilibre entre biosynthèse et catabolisme des gangliosides est finement contrôlé par un ensemble de phénomènes de régulation allant de la disponibilité des substrats accepteurs à une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des glycosyltransférases. Ainsi, des changements majeurs et essentiels du profil d'expression gangliosidique ont été décrits au cours du développement cérébral de l'embryon, correspondant à des changements d'activité des GTs impliquées dans leur biosynthèse. La  $G_{D3}$  synthétase est fortement exprimée dans les premiers jours du développement embryonnaire de la souris, alors que la  $G_{M2}/G_{D2}$  synthétase est active dans les stades plus tardifs du développement neuronal (Yamamoto *et al.*, 1996 ; Furukawa *et al.*, 2002). Ces niveaux d'expression des GTs sont en corrélation avec les gangliosides détectés aux différents stades du développement cérébral murin (Yu *et al.*, 1988).

En parallèle, un déséquilibre dans le processus de dégradation engendre l'accumulation de gangliosides dans les lysosomes et l'apparition de pathologies héréditaires neurodégénératives tel que les gangliosidoses. A titre d'exemple, la maladie de Sandhoff est liée à un déficit en hexosaminidases A et B, lié à une anomalie de la sous-unité  $\beta$ . Ce déficit enzymatique conduit à une surcharge lysosomale de  $G_{M2}$  dans les neurones et les tissus périphériques, et se traduit par une dégénérescence du système nerveux central (**Figure 16**) (Jeyakumar *et al.*, 2005).

Plusieurs mécanismes de régulation ont été étudiés, et seront décrits dans ce paragraphe.

- Régulation dépendante de l'équipement enzymatique, de la disponibilité des substrats donneur/accepteur et de l'organisation supramoléculaire des GTs.

L'équipement enzymatique est important car il conditionne la composition en gangliosides de la cellule. Les éléments qui gouvernent le métabolisme de ces GSLs acides tiennent aux caractéristiques même des enzymes : taux d'expression, spécificité d'action, paramètres cinétiques ( $K_m$ ) et organisation supramoléculaire dans l'appareil de Golgi. D'après le schéma de biosynthèse décrit précédemment (**Figure 15**), une même GT peut agir sur des substrats différents. La disponibilité en substrats joue donc un rôle essentiel dans la détermination du profil gangliosidique de la cellule et du tissu. Ce propos peut être illustré à travers les différents modèles cellulaires créés par transfection transitoire ou stable d'un ADNc codant une GT du métabolisme des gangliosides. A titre d'exemple, la transfection de la  $G_{D3}$  synthétase dans des cellules de hamster CHO-K1 conduit à l'accumulation de  $G_{D3}$  et de  $G_{T3}$ , alors que



l'expression de cette même enzyme dans la lignée neuronale PC12 conduit essentiellement à la synthèse de  $G_{D1b}$  et de  $G_{T1b}$  (Daniotti *et al.*, 2002 ; Fukumoto *et al.*, 2000).

Depuis plusieurs années, des études tendent à démontrer qu'une localisation précise des GTs au sein de l'appareil de Golgi soit également nécessaire à leur activité. Le manque d'information sur la localisation précise des GTs est principalement dû au faible nombre d'anticorps reconnaissant les protéines endogènes. Cependant, la formation de complexes multienzymatiques fonctionnels a pu être mise en évidence (paragraphe III.A.3.a). L'un de ces complexes est constitué de la lactosylcéramide synthétase (ou GalTI) et de la  $G_{M3}$  synthétase (ST3Gal V), qui agissent successivement sur le glucosylcéramide pour former le  $G_{M3}$  (**Figure 15**). Ce complexe est affecté par la surexpression ou l'inhibition de l'expression de la  $G_{D3}$  synthétase (ST8Sia I) dans des cellules de hamster CHO-K1. En effet, cette enzyme peut rejoindre le complexe GalT1-ST3Gal V pour former un complexe à trois partenaires qui est localisé différemment dans l'appareil de Golgi, dans une partie plus distale par rapport au précédent. Cette différence de localisation influe sur la biosynthèse des gangliosides (**Figure 15**) : le complexe trimérique GalT1-ST3Gal V-ST8Sia I serait dédié à la formation du  $G_{D3}$  et des gangliosides complexes, alors que le dimère GalT1-ST3Gal V formerait le précurseur  $G_{M3}$  dédié à la synthèse des gangliosides de la série a- (Uliana *et al.*, 2006). Ainsi, la localisation subcellulaire des GTs serait modulée en fonction du niveau d'expression relatif de chaque enzyme, et participerait, avec la régulation transcriptionnelle, au profil d'expression gangliosidique à la surface des cellules.

- Régulation transcriptionnelle

La régulation des activités glycosyltransférasiques s'effectue principalement au niveau transcriptionnel. Les premières études réalisées par Northern-Blotting ont mis en évidence une expression tissu-spécifique des ARNm codant les enzymes du métabolisme des gangliosides. Ainsi, par exemple, les ARNm issus du gène *B4GALNACT1* sont majoritairement retrouvés au niveau du cerveau humain embryonnaire ou adulte, des poumons et des testicules, alors que ceux du gène *ST3GAL5* sont exprimés de manière ubiquiste chez l'adulte (Hidari *et al.*, 1994 ; Ishii *et al.*, 1998 ; Fukumoto *et al.*, 1999). De plus, une régulation spatio-temporelle a pu être observée comme notamment pour le gène *B4GALNACT1* qui s'exprime tardivement lors du développement du système nerveux pour diminuer de manière graduelle à la naissance (Yamamoto *et al.*, 1995 ; Yamamoto *et al.*, 1996). La régulation de l'expression des GTs peut aussi s'effectuer en fonction des conditions physiologiques ; à titre d'exemple, le gène codant

ST8Sia I est surexprimé pendant l'apoptose, suite à l'activation des récepteurs de mort cellulaire, ce qui conduit à l'accumulation intracellulaire du  $G_{D3}$  (paragraphe III.A.2.b).

Ces régulations font appel à des promoteurs tissus spécifiques ou qui répondent à une situation physiologique particulière. Généralement, les transcrits qui découlent de l'activation de ces promoteurs sont différents au niveau de leurs extrémités 5' non codantes, mais possèdent en commun les exons qui composent la séquence codante : ainsi la protéine traduite est la même. Plusieurs ARNm ne différant que dans leurs extrémités 5' non traduites ont été identifiés pour la majorité des gènes de sialyltransférases comme pour le gène *ST3GAL5* (Kim *et al.*, 2001, Zeng *et al.*, 2003). L'expression de la  $G_{M3}$  synthétase est par exemple régulée positivement au cours de la différenciation mégacaryocytaire et dans les cellules HL-60 (*Human promyelocytic Leukemia cells*) par le facteur de transcription CREB, activé par la voie de signalisation PKC/ERK (Choi *et al.*, 2007 ; Chung *et al.*, 2005).

Bien que ce type de régulation soit essentiel, un ensemble d'autres facteurs semble agir pour réguler le métabolisme gangliosidique.

- Régulation post-transcriptionnelle

- ✓ Mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation

Plusieurs études ont démontré l'influence du processus dynamique de phosphorylation/déphosphorylation sur la régulation de certaines GTs. Ainsi, l'activation des protéines kinases PKC et PKA dans des cellules de neuroblastome induit une activité accrue de la  $G_{M2}/G_{D2}$  synthétase, alors que celle des sialyltransférases ST3Gal I/II ou  $G_{D1a}/G_{T1b}$  synthétase serait diminuée (Gu *et al.*, 1995 ; Bieberich *et al.*, 1998; Yu et Bieberich, 2001). Ce mécanisme de régulation expliquerait l'accumulation du ganglioside  $G_{M1}$  durant la différenciation neuronale des cellules NG108-15. En parallèle, la phosphorylation des GTs impliquées dans le métabolisme des gangliosides a été observée *in vitro* à partir de préparations microsomales et de l'utilisation d'enzymes solubles purifiées de cerveau de rat. L'incubation d'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) avec ces microsomes engendre une activation de la  $G_{M2}/G_{D2}$  synthétase et double consécutivement son activité, révélant ainsi une activation de l'enzyme dépendante de la protéine kinase AMPc (Scheideler et Dawson, 1986). De plus, l'activité des  $G_{M3}$  et  $G_{D1a}$  synthétases est diminuée de 50 à 60 % *via* une phosphorylation de résidus sérine et thréonine par la kinase PKC (Gu *et al.*, 1995). La pertinence de cette régulation reste cependant à démontrer *in vivo*.

✓ Régulation des enzymes par *N*-glycosylation

La  $G_{D3}$  synthétase et la  $G_{M2}/G_{D2}$  synthétase sont des enzymes transmembranaires de type II présentant plusieurs sites putatifs de *N*-glycosylation. Les travaux de Martina et de Bieberich et de leurs collaborateurs ont permis de mettre en avant l'importance de cette modification covalente aussi bien sur la demi-vie, l'activité et sur la localisation intracellulaire de ces enzymes. Il a alors été démontré qu'un défaut dans le processus de *N*-glycosylation provoque la rétention d'une forme moins stable de la  $G_{D3}$  synthétase dans le réticulum endoplasmique, en augmentant son *turnover* (Martina *et al.*, 1998 ; Bieberich *et al.*, 2000). A l'inverse, la déglycosylation totale de la  $G_{M2}/G_{D2}$  synthétase diminue de près de 90 % son activité sans affecter sa localisation subcellulaire (Haraguchi *et al.*, 1995). De même, l'inhibition du processus de *N*-glycosylation affecte la localisation et l'activité de la  $G_{M1}/G_{D1b}$  synthétase (Martina *et al.*, 2000). Récemment, le rôle de cette régulation sur la stabilité et l'activité des deux isoformes protéiques de la  $G_{M3}$  synthétase a été démontrée (Zava *et al.*, 2010).

• Autres facteurs de régulation

✓ Rétrocontrôle

Un rétrocontrôle négatif de la biosynthèse des gangliosides des séries a- et b- par les produits finaux de la réaction a pu être mis en évidence lors d'expériences *in vitro*. En effet, l'activité de la  $G_{M2}/G_{D2}$  synthétase est inhibée par le  $G_{M3}$ , mais encore plus efficacement par les gangliosides porteurs de 2 ou 3 résidus d'acide sialique tels que le  $G_{D1a}$ , et dans une moindre mesure, le  $G_{M1}$ , le  $G_{M2}$  et le  $G_{T1b}$  (Nores et Caputto, 1984 ; Yusuf *et al.*, 1987). De même, l'activité de la  $G_{D3}$  synthétase est inhibée par le  $G_{Q1b}$ , puis par le  $G_{T1b}$  et le  $G_{D1a}$  (Yusuf *et al.*, 1987).

L'enzyme bi-fonctionnelle UDP-*N*-acétylglucosamine 2-épimérase/*N*-acétylmannosamine 6-kinase (GNE), qui intervient dans le métabolisme de l'acide *N*-acétylneuraminique, joue également un rôle sur l'expression de la  $G_{M3}$  et de la  $G_{D3}$  synthétases, et sur la synthèse des gangliosides correspondants. Une surexpression de la GNE entraîne une augmentation du taux d'ARNm des gènes *ST3GAL5* et *ST8SIA1* ainsi que du  $G_{M3}$  et du  $G_{D3}$ , respectivement. A l'inverse, une inhibition de la GNE par la technique d'ARN interférence a un effet opposé (Wang *et al.*, 2006).

✓ Le pH

Le pH de l'environnement immédiat des enzymes peut également jouer un rôle régulateur. Le profil gangliosidique de cultures primaires de cellules neuronales change de manière réversible en fonction du pH du milieu de culture (Iber *et al.*, 1990). Ainsi, lorsque le pH s'acidifie, un changement d'expression des gangliosides de la série a- vers la série b- est observé (conversion du  $G_{M1}$  et  $G_{D1a}$  en  $G_{D1b}$ ,  $G_{T1b}$  et  $G_{Q1b}$ ). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le pH optimal de l'enzyme clef de la biosynthèse des gangliosides complexes : la  $G_{D3}$  synthétase (pH optimal de 6,2).

**III. A. 2. d) La biosynthèse des gangliosides complexes : rôle clef de la sialyltransférase ST8Sia 1 ou  $G_{D3}$  synthétase**

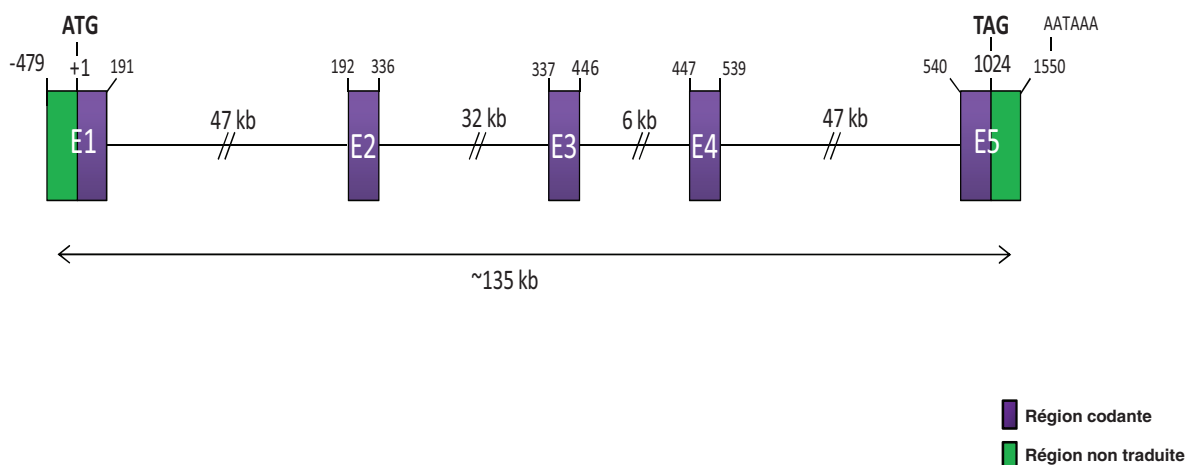
La  $G_{D3}$  synthétase se situe à un véritable carrefour métabolique dans la voie de biosynthèse des GSLs de la série ganglio (**Figure 15**). Alors que les gangliosides complexes des séries b- et c- ne sont pas ou très faiblement exprimés dans les tissus sains adultes, ils sont retrouvés en quantité abondante dans les tissus en croissance, au cours du développement embryonnaire ou encore dans certaines pathologies.

La  $G_{D3}$  synthétase humaine a été clonée par 3 équipes différentes au cours de la même année, par des techniques de complémentation ou par criblage de banque d'expression (Sasaki *et al.*, 1994; Nara *et al.*, 1994; Haraguchi *et al.*, 1994). Le clonage s'est ensuite poursuivi chez la souris, le rat et le poulet (Yoshida *et al.*, 1995 ; Watanabe *et al.*, 1996 ; Daniotti *et al.*, 1997). La  $G_{D3}$  synthétase semble être la seule enzyme capable de catalyser, *in vitro* et *in vivo*, le transfert d'un seul résidu d'acide sialique en position terminale de la chaîne oligosaccharidique du  $G_{M3}$ , participant ainsi à la synthèse du  $G_{D3}$ . Nara et ses collaborateurs ont rapporté l'existence d'une isoforme protéique courte de l'enzyme (341 acides aminés) dans les cellules de hamster CHO-P, pouvant mener à la biosynthèse du  $G_{D3}$  mais également du  $G_{D1c}$ ,  $G_{T1a}$  et  $G_{Q1b}$  *in vitro* (Nara *et al.*, 1994). Dans une moindre mesure, la forme longue de l'enzyme (356 acides aminés) peut ajouter un résidu Neu5Ac sur le  $G_{D3}$ , formant ainsi le  $G_{T3}$  (Nakayama *et al.*, 1996). La différence de taille entre les deux isoformes est retrouvée au niveau de la région cytoplasmique N-terminale de l'enzyme.

La  $G_{D3}$  synthétase est exprimée presque exclusivement dans le cerveau fœtal et adulte, mais également dans les tumeurs d'origine neuro-ectodermique. Plusieurs études ont ainsi démontré une corrélation entre l'expression de la  $G_{D3}$  synthétase et les gangliosides complexes tels que le  $G_{D3}$  et le  $G_{D2}$  dans des cellules de mélanome, de neuroblastome et de glioblastome

(Thampoe *et al.*, 1989 ; Ruan et Lloyd , 1992 ; Oblinger *et al.*, 2006). A l'inverse, son expression est faible voire inexistante dans le parenchyme sain.

Le gène *ST8SIA1* codant la G<sub>D3</sub> synthétase humaine est localisé sur le chromosome 12 en 12p12.1-p11.2. Il est composé de 5 exons distincts, séparés de régions introniques ; l'ensemble est étendu sur environ 135 kilobases (kb) (**Figure 17**) (Furukawa *et al.*, 2003). A l'image de diverses sialyltransférases, ce gène ne contient ni boîte TATA, ni boîte CAAT. La spécificité d'expression tissulaire de la G<sub>D3</sub> synthétase semble essentiellement contrôlée par l'intermédiaire d'un promoteur répondant à des stimuli particuliers et induisant la transcription d'ARNm possédant les mêmes exons codants mais des extrémités 5' non traduites différentes (Harduin-Lepers, 2010). La région 5' non traduite de *ST8SIA1* a été décrite dans le mélanome et le glioblastome. Des expériences d'extension en 5'RACE ont montré la présence de multiples sites d'initiation de la transcription entre -650 et -400 pb en amont du codon d'initiation de la traduction. L'un de ces transcrits, exprimé dans les cellules Jurkat lors de l'apoptose ou encore dans les cellules de mélanome SK-MEL-2, est sous le contrôle d'un promoteur qui possède un site de fixation pour le facteur de transcription NF-κB (Kang *et al.*, 2006 ; Kang *et al.*, 2007). Dans les cellules de glioblastome U-87MG et T98G, le contrôle de l'expression du gène *ST8SIA1* s'effectue par les facteurs de transcription AREB6 et Elk-1 (Dae *et al.*, 2009). Les promoteurs de la G<sub>D3</sub> synthétase de rat et de souris ont également été analysés, révélant la présence d'un site consensus pour la liaison du facteur SP1 (Zeng *et al.*, 1998 ; Takashima *et al.*, 2000).



**Figure 17 : Organisation génomique de la G<sub>D3</sub> synthétase humaine.** Le gène *ST8SIA1* est composé de 5 exons, notés de E1 à E5. Les tailles des exons et des introns sont indiquées en kb (adapté de Furukawa *et al.*, 2003).

### **III. B. Rôles physiologiques et pathologiques des gangliosides**

Depuis de nombreuses années, des travaux essentiellement basés sur la surexpression ou l'inhibition de la synthèse des gangliosides ont permis de mettre en évidence plusieurs fonctions essentielles de ces GSLs acides, à la fois dans des modèles de cellules en culture et *in vivo*. Il est ainsi possible de citer des rôles dans la reconnaissance cellulaire, la modulation des signaux transmembranaires, la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire et plus généralement dans le développement et l'organisation tissulaire (Yamashita *et al.*, 1999). De plus, les gangliosides sont manifestement impliqués dans la carcinogenèse (Dube et Bertozzi, 2005). Dans la suite de cette partie introductive, nous nous intéresserons plus particulièrement aux gangliosides et à leurs fonctions dans la physiologie cellulaire et dans l'acquisition du phénotype cancéreux.

#### **III. B. 1. Fonctions des gangliosides dans la physiologie cellulaire et tissulaire**

L'ensemble des observations faites jusqu'à présent semble dresser deux grandes fonctions des gangliosides : ils sont ainsi impliqués dans la reconnaissance cellulaire et la modulation des signaux transmembranaires.

##### ***III. B. 1. a) La reconnaissance cellulaire dépendante des gangliosides***

De par leur localisation au niveau de la membrane plasmique, les gangliosides sont directement impliqués dans la reconnaissance cellule-cellule et cellule-matrice, par l'intermédiaire notamment de molécules se liant spécifiquement aux glycanes (*Glycan-Binding Proteins* ou lectines). Les gangliosides représentent également des récepteurs pour les pathogènes et les toxines. Quatre exemples développés succinctement ci-dessous pointent l'importance des gangliosides dans la physiologie des vertébrés.

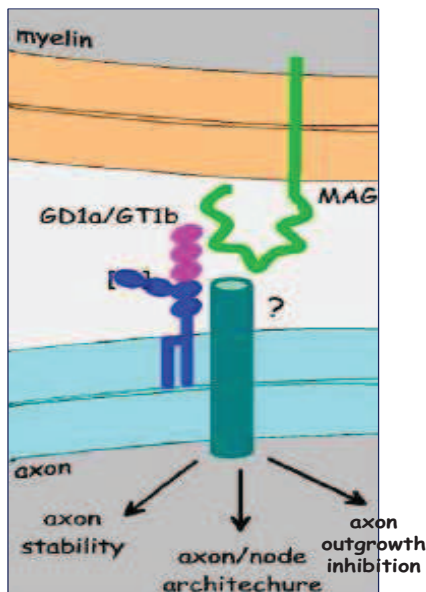
- Rôle dans l'immunité

Les Siglecs (*Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins*) constituent une famille particulière de lectines qui se lient aux acides sialiques des chaînes oligosaccharidiques (Crocker *et al.*, 2007). La séquence disialylée Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac, portée par les gangliosides complexes de la série b- tels que le G<sub>D3</sub>, le G<sub>D1b</sub> et le G<sub>T1b</sub>, se lie préférentiellement à la Siglec-7

exprimée par les cellules immunitaires NK (*Natural Killer*) (Yamaji *et al.*, 2002). Cette interaction diminue l'activité cytotoxique des cellules NK (Nicoll *et al.*, 2003).

- Rôle dans les interactions myéline-axone

Un autre membre de la famille des Siglecs, la Siglec 4 ou MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*), stabilise les interactions entre la myéline et les axones par un mécanisme dépendant des gangliosides. Cette lectine membranaire se fixe avec une forte affinité sur la séquence glycanique terminale Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc des deux gangliosides majoritairement exprimés dans le cerveau : le G<sub>D1a</sub> et le G<sub>T1b</sub> (Schnaar, 2010). Des souris KO homozygotes pour le gène codant la G<sub>M2</sub>/G<sub>D2</sub> synthétase (*b4galnact1*<sup>-/-</sup>) présentent une dégénérescence axonale et une démyélinisation des systèmes nerveux central et périphérique, une réduction du calibre axonal et des problèmes moteurs (Pan *et al.*, 2005). Des phénotypes similaires ont été observés chez des souris KO pour le gène *Mag* ou double KO *st3gal5*<sup>-/-</sup>/*b4galnact1*<sup>-/-</sup> (Yamashita *et al.*, 2005 ; Pan *et al.*, 2005). Ces résultats laissent donc présager un rôle essentiel des interactions MAG-G<sub>D1a</sub>/G<sub>T1b</sub> dans la stabilité myéline-axone (**Figure 18**).



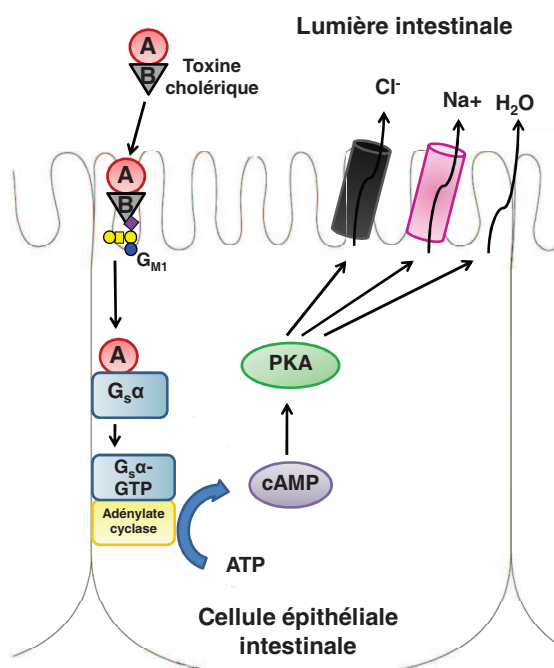
**Figure 18 : Représentation schématique de l'interaction entre la Siglec-4, ou MAG, et les gangliosides complexes G<sub>D1a</sub> et G<sub>T1b</sub>.** Les interactions spécifiques entre le récepteur MAG, exprimé par la myéline, et les gangliosides G<sub>D1a</sub> et G<sub>T1b</sub> des axones sont essentielles pour maintenir l'intégrité des systèmes nerveux central et périphérique. Les voies de signalisation intracellulaire engendrant la stabilité et l'architecture axonale, ainsi que l'inhibition de la croissance de ce dernier sont encore peu connues (image adaptée de Schnaar, 2010).

- Rôle dans les interactions avec les virus, bactéries et toxines

Depuis plusieurs décennies, les gangliosides sont décrits comme les points d'ancrage de divers pathogènes à la surface des cellules de mammifères. Les gangliosides ont ainsi été décrits comme des récepteurs du virus de la grippe, bien qu'ils ne semblent pas indispensables à l'infection virale par le virus H1N1 (Suzuki, 1994 ; Ablan *et al.*, 2001 ; Matrosovich *et al.*,

2006). Le  $G_{M3}$  monosialylé interagit quand à lui avec la glycoprotéine gp120 du virus HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus type 1* ou virus du SIDA) (Hammache *et al.*, 1998). Il a été récemment démontré qu'une forte expression du  $G_{M3}$  inhibe la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane des cellules hôtes, en empêchant l'interaction du virus avec les récepteurs aux chimiokines (Rawat *et al.*, 2004).

Les gangliosides sont également utilisés comme récepteurs par différentes toxines, dont la plus décrite est la toxine cholérique libérée par la bactérie *Vibrio cholerae*, suite à la fixation de celle-ci à la paroi intestinale. La première étape du mode d'action de l'exotoxine protéique est la fixation de sa sous-unité B au monosialoganglioside  $G_{M1}$  (**Figure 20**). Ceci induit un changement de conformation, une dissociation et une internalisation de la sous-unité A de la toxine dans la cellule intestinale. La toxine cholérique catalyse ensuite l'addition d'une adénosine diphosphate sur l'arginine R201, indispensable à l'activité GTPasique de la protéine  $G_{s\alpha}$ . Cette protéine  $G_{s\alpha}$ -GTP activée s'accumule, prolongeant ainsi l'activation de l'adénylate cyclase et l'augmentation de la concentration en AMPc, qui à son tour, stimule la sécrétion de sel et d'eau dans la lumière intestinale par une activation continue de la protéine kinase A et des canaux ioniques (**Figure 19**). D'autres toxines bactériennes peuvent également se fixer aux gangliosides comme la toxine tétanique ( $G_{D1b}$  et  $G_{T1b}$ ) et la toxine botulique ( $G_{T1b}$ ,  $G_{Q1b}$  et  $G_{D1b}$ ) (Eidels *et al.*, 1983).



**Figure 19 : Action de la toxine cholérique sur une cellule intestinale humaine.** La sous-unité B de la toxine cholérique, produite par la bactérie *Vibrio cholerae*, interagit spécifiquement avec le ganglioside  $G_{M1}$ , exprimé au niveau des villosités des cellules intestinales. Ceci induit un changement de conformation de la toxine, une dissociation et l'entrée de la sous-unité A au sein de la cellule.

**A**, sous-unité A de la toxine cholérique ;  
**B**, sous-unité B.



- Rôle dans les interactions avec les protéines de la matrice extracellulaire

Les gangliosides sont impliqués dans les interactions cellule-matrice soit par une liaison directe avec des protéines matricielles (exemple :  $G_{D3}$  et collagène ou laminine), soit par une interaction avec des récepteurs d'adhérence cellulaire : les intégrines. Ainsi, en utilisant une forme recombinante et purifiée de l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ , Wang et ses collaborateurs ont mis en évidence une fixation du ganglioside  $G_{T1b}$  au domaine extracellulaire de la sous unité  $\alpha 5$  du récepteur, par des interactions carbone-carbone. Ce phénomène inhibe l'interaction de l'intégrine avec la fibronectine, et contrôle par conséquent la survie et la migration de kératinocytes *via* une inhibition de la voie de signalisation PI3K/Akt (Wang *et al.*, 2001a ; 2001b). Inversement, le  $G_{M3}$  favorise l'adhérence à la fibronectine d'une lignée de carcinome mammaire murin par une interaction  $G_{M3}$ - $\alpha 5 \beta 1$  dépendante (Zheng *et al.*, 1993).

Les gangliosides favorisent également la formation de complexes supramoléculaires dans lesquels les signaux sont intégrés. Dans les cellules neuronales par exemple, la laminine-1 se lie au  $G_{M1}$ , induisant une relocalisation du récepteur aux neurotrophines TrkA et de la chaîne  $\beta 1$  des intégrines dans les radeaux lipidiques. Ceci provoque le recrutement de molécules de signalisation intracellulaire Lyn, Akt et MAPK et la croissance neuronale (Ichikawa *et al.*, 2009).

De ces diverses observations, Hakomori a défini un rôle essentiel des complexes ganglioside-intégrine-tétraspanine dans les interactions avec la matrice et la modulation des signaux transmembranaires (Todeschini et Hakomori, 2008a).

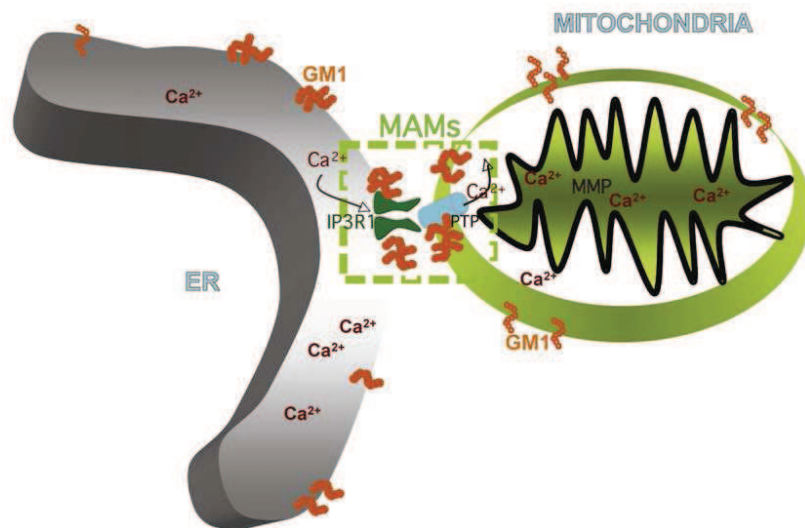
### ***III. B. 1. b) La modulation des signaux transmembranaires***

Au sein des glycosynapses, les gangliosides peuvent interagir avec d'autres GSLs ou avec des protéines transmembranaires, ajoutant ainsi un mode de régulation additionnel à l'activité des RTKs (Prinetti *et al.*, 2009). L'inhibition ou la surexpression de gangliosides dans des modèles *in vitro* et *in vivo* ont des effets sur la signalisation cellulaire, *via* une interaction directe ou indirecte avec les canaux ioniques et les récepteurs à activité tyrosine kinase.

- Signalisation des canaux ioniques

Les gangliosides peuvent moduler l'activité de certains canaux ioniques et ainsi influencer la concentration intracellulaire d'ions calcium et sodium.

Dans la maladie de Landing (ou gangliosidose à  $G_{M1}$ ), l'accumulation de  $G_{M1}$  au niveau des MAM altère le dynamisme du flux calcique par une activation des canaux inositol trisphosphate IP3 réticulaires. Cet événement induit la perméabilisation mitochondriale, le relargage de facteurs pro-apoptotiques et la mort de cellules neuronales (**Figure 20**) (Sano *et al.*, 2009). En parallèle, la formation du complexe  $G_{M1}$ /intégrine  $\alpha 5\beta 1$  active spécifiquement l'ouverture des canaux calciques TRPC5 (*Transient Receptor Potential cation Channel*) et favorise la croissance neuronale (Wu *et al.*, 2007). Récemment, il a été démontré que le  $G_{M3}$ , et non le  $G_{M1}$ , peut spécifiquement réguler l'activité du récepteur alpha-synucléine et soulève la possibilité que ce ganglioside, exprimé de façon minoritaire au niveau du cerveau, puisse jouer un rôle préventif dans la maladie de Parkinson (Di Pasquale *et al.*, 2010).



**Figure 20 : Représentation schématique de la signalisation calcique dépendante du  $G_{M1}$  dans la maladie de Landing.** L'ouverture des canaux calciques réticulaires au niveau des MAM induit un relargage d'ions  $Ca^{2+}$ , qui perturbent la perméabilité membranaire mitochondriale et provoquent l'apoptose des cellules neuronales (image issue de Sano *et al.*, 2009).

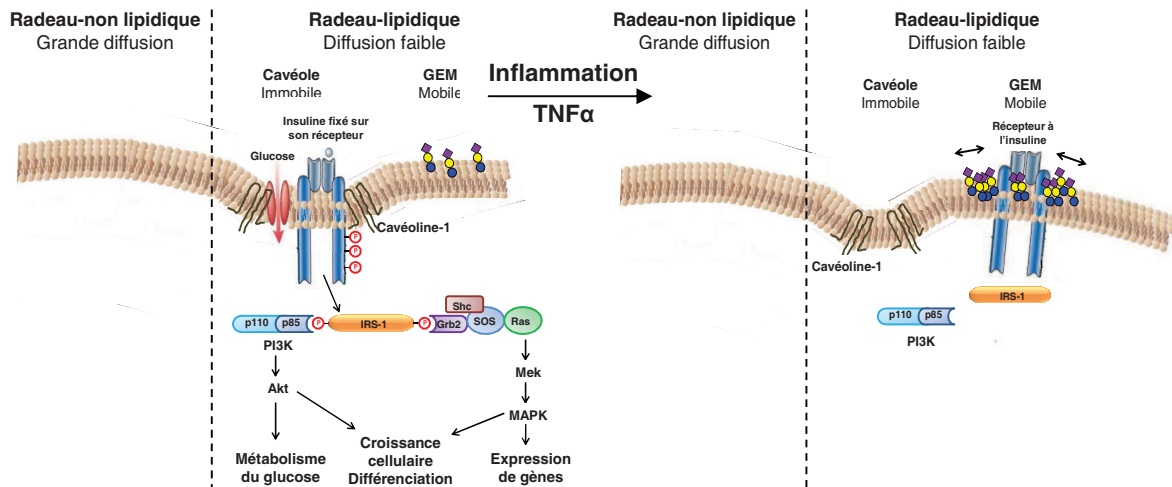
- Signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs)

✓ Modulation de la réponse à l'insuline

Les récepteurs à l'insuline sont des RTKs dont l'activité et la signalisation associée sont régulées par les gangliosides. Depuis quelques années, le  $G_{M3}$  est décrit comme le ganglioside responsable, en partie, de l'acquisition de l'insulino-résistance. Les premières évidences d'une telle régulation ont été apportées dans un modèle adipocytaire murin mimant le diabète de

type 2. Les auteurs ont alors montré que l'atténuation de la signalisation du récepteur à l'insuline, induite par le TNF- $\alpha$ , s'accompagne d'une augmentation de la biosynthèse du G<sub>M3</sub>, par un mécanisme de régulation transcriptionnelle (Tagami *et al.*, 2002). L'ajout exogène de G<sub>M3</sub> mime les effets du TNF- $\alpha$  sur la voie de signalisation de l'insuline, c'est-à-dire inhibe la phosphorylation du récepteur correspondant et de son substrat IRS-1 (Tagami *et al.*, 2002 ; Kabayama *et al.*, 2005) (**Figure 21**). Ces résultats ont été confortés *in vivo* dans un modèle de souris KO *st3gal5*<sup>-/-</sup>. Ces animaux, incapables de synthétiser le G<sub>M3</sub> et les gangliosides dérivés, présentent une sensibilité accrue à l'insuline, corrélée à une augmentation de la phosphorylation du récepteur dans le muscle squelettique (Yamashita *et al.*, 2003). Des travaux récents ont mis en lumière le mécanisme moléculaire impliqué dans ce phénomène physiopathologique (**Figure 21**). Des expériences d'immunoprécipitation, de co-localisation et de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) ont permis de dresser un modèle dans lequel les interactions entre le G<sub>M3</sub>, le récepteur à l'insuline et la cavéoline-1 sont compétitives. Dans les microdomaines riches en G<sub>M3</sub>, ce récepteur se lie spécifiquement aux monosialogangliosides, et les cellules deviennent résistantes à l'insuline. A l'inverse, en absence de G<sub>M3</sub>, le récepteur s'associe à la cavéoline-1 au sein des cavéoles. Ce complexe est relativement immobile au sein des radeaux lipidiques, ce qui facilite la liaison du ligand à son récepteur et rend les cellules insulino-sensibles (Kabayama *et al.*, 2007).

Parallèlement, la surexpression de la sialidase Neu3 au niveau du foie de souris C57BL/6 augmente la sensibilité hépatique à l'insuline, par une modification de la composition en gangliosides (accumulation de G<sub>M1</sub> au détriment du G<sub>M3</sub>) (Yoshizumi *et al.*, 2007).



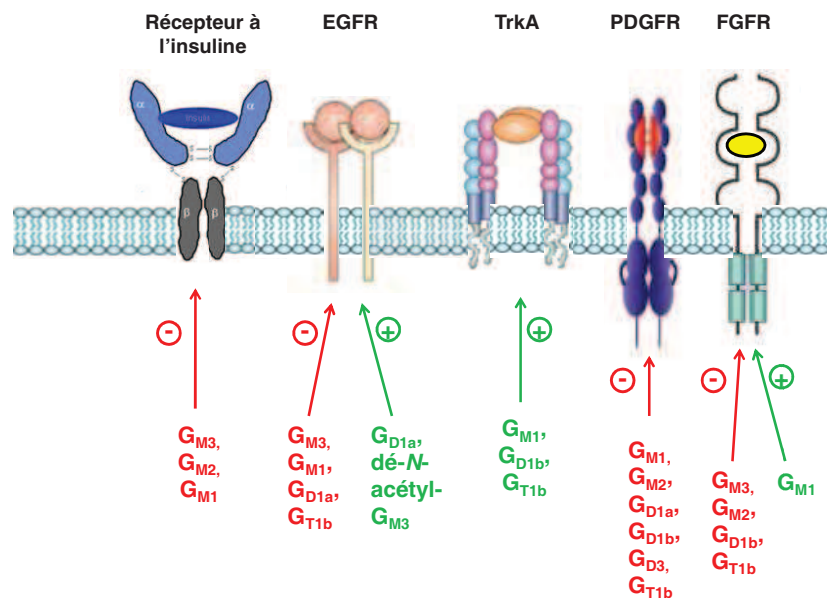
**Figure 21: Mécanisme de résistance à l'insuline dans les adipocytes.** La membrane plasmique est composée de domaines riches en sphingolipides et cholestérol, nommés radeaux-lipidiques, comprenant les cavéoles et les microdomaines riches en glycosphingolipides (GEM ou *Glycosphingolipids-enriched microdomains*). Le récepteur à l'insuline réside au niveau des cavéoles où il interagit avec la cavéoline-1. Cette interaction est nécessaire à la signalisation métabolique de l'insuline, faisant intervenir son substrat IRS-1. Dans les adipocytes, la localisation du récepteur dans les cavéoles peut être perturbée par une concentration élevée en gangliosides  $G_{M3}$ , en réponse à une réaction inflammatoire. Celui-ci est alors mobile au sein des GEM, ce qui rend les adipocytes insulino-résistants (images adaptées de Kabayama *et al.*, 2007).

- ✓ Modulation de la réponse des récepteurs aux facteurs de croissance : exemple du récepteur à l'EGF (EGFR)

Ubiquiste, le  $G_{M3}$  est un ganglioside multifonctionnel. Outre son rôle dans la signalisation de l'insuline, il inhibe également la phosphorylation du récepteur à l'EGF, sans interférer avec la fixation du ligand (Bremer *et al.*, 1986). A l'inverse, le dé-*N*-acétyl- $G_{M3}$ , produit de dégradation du  $G_{M3}$ , semble stimuler l'activité kinasique du récepteur et par conséquent, la croissance de cellules cancéreuses (Zhou *et al.*, 1994). L'inhibition de l'activation de l'EGFR est dépendante des interactions carbone-carbone entre le  $G_{M3}$  et les résidus GlcNAc terminaux des chaînes *N*-glycanniques portées par le récepteur (Yoon *et al.*, 2006 ; Kawashima *et al.*, 2009). En revanche, le  $G_{D1a}$  augmente à la fois l'autophosphorylation de l'EGFR et l'activation des molécules de signalisation intracellulaire Ras et MAPK (Liu *et al.*, 2004 ; Kaucic *et al.*, 2006). Le  $G_{D1a}$  favorise la dimérisation de l'EGFR, en présence ou en absence du ligand.

Une grande majorité des récepteurs aux facteurs de croissance sont régulés « positivement » ou « négativement » par les gangliosides ; la **figure 22** récapitule de manière non exhaustive

les effets des gangliosides sur les RTKs (Miljan et Bremer, 2002a ; Kaucic *et al.*, 2006). Ainsi, les gangliosides  $G_{M1}$ ,  $G_{M2}$ ,  $G_{D1a}$ ,  $G_{D1b}$ ,  $G_{D3}$  et  $G_{T1b}$  peuvent inhiber l'activation du PDGFR, alors que le  $G_{D1a}$  et le  $G_{M1}$  favorisent respectivement la phosphorylation de l'EGFR et du FGF2 (Rusnati *et al.*, 2002). Les mécanismes moléculaires par lesquels les gangliosides modulent l'activité de ces récepteurs restent encore à définir précisément. Il est cependant intéressant de noter que ces effets, généralement observés *in vitro*, sont dépendant du type cellulaire et des méthodes employées (ajout exogène de gangliosides solubles dans le milieu de culture, *versus* expression stable à la membranaire cellulaire). Les résultats décrits, parfois contradictoires, soulèvent la question majeure de la pertinence physiologique des stratégies expérimentales utilisées *in vitro*. Dans ce sens, la création de modèles cellulaires, exprimant stablement les gangliosides d'intérêt à la surface cellulaire, semble être une bonne alternative pour se rapprocher des conditions physiologiques et de l'environnement *in vivo*. Ces modèles permettront de déterminer finement les mécanismes par lesquels les gangliosides régulent l'activité des RTKs.



**Figure 22 : Régulation de l'activité de divers récepteurs à activité tyrosine kinase par les gangliosides.** De nombreuses études ont permis de montrer à la fois une inhibition ou une activation de la signalisation relayée par les récepteurs aux facteurs de croissance, dépendamment du (des) ganglioside(s) exprimé(s), du type cellulaire, et des conditions expérimentales utilisées. Plusieurs méthodes ont été employées pour démontrer les effets des gangliosides sur l'activité de ces récepteurs : ajout exogène de gangliosides dans le milieu, synthèse endogène de ces derniers par expression des enzymes de biosynthèse, inhibition *via* l'utilisation d'agents pharmacologiques. Les gangliosides semblent moduler l'activation des RTKs selon 3 mécanismes distincts : un mécanisme dépendant de l'interaction ganglioside/ligand (exemple : FGF et  $G_{M1}$ ), une régulation de la dimérisation des RTKs (EGFR et  $G_{M3}$ ) et une régulation de l'activité en fonction de la mobilité et la localisation au sein des radeaux lipidiques (récepteur à l'insuline ou EGFR et  $G_{M3}$ ). ⊖ : inhibition ; ⊕ : activation des RTKs (schéma adapté de Miljan et Bremer, 2002a ; Kaucic *et al.*, 2006).

### **III. B. 2. Rôle des gangliosides complexes dans le processus de cancérisation**

Alors que l'expression des gangliosides complexes est limitée dans les tissus sains adultes, une augmentation d'expression de ces GSL acides est observée dans des maladies diverses telles que l'athérosclérose, la maladie de Creutzfeld-Jacob, la sclérose en plaques et dans une variété de tumeurs d'origine neuro-ectodermique (Wen *et al.*, 1999 ; Ohtani *et al.*, 1996 ; Furukawa *et al.*, 2006). A ce titre, le G<sub>D3</sub>, le G<sub>D2</sub> et le G<sub>T3</sub> sont considérés comme des marqueurs oncofœtaux du mélanome et du neuroblastome. Les effets biologiques engendrés par leur surexpression n'ont pas encore tous été clairement démontrés, mais il a cependant été prouvé que ces AGAT jouent un rôle clef lors du développement tumoral.

#### ***III. B. 2. a) Les gangliosides complexes dans les tumeurs d'origine neuro-ectodermique***

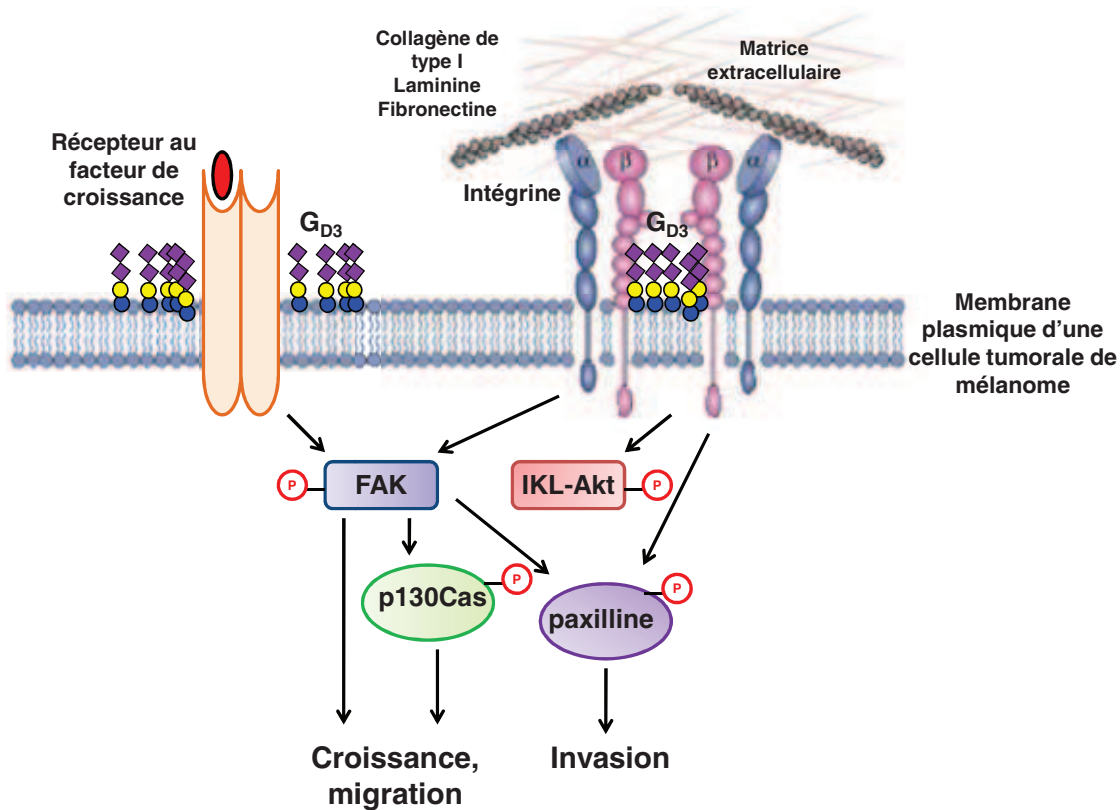
- Rôle prédominant du ganglioside G<sub>D3</sub> dans le mélanome

Le mélanome est une tumeur très agressive qui prend son origine au niveau de l'épiderme et des mélanocytes. Depuis plusieurs décennies, le G<sub>D3</sub> est décrit comme un antigène glucidique spécifiquement associé au mélanome. Ce disialoganglioside est fortement exprimé dans les tissus et les lignées cellulaires établies, alors que son expression est très faible dans les mélanocytes sains (Portoukalian *et al.*, 1979 ; Carubia *et al.*, 1984 ; Thampoe *et al.*, 1989). Il en est de même pour la G<sub>D3</sub> synthétase, dont l'expression est d'ailleurs très marquée dans le modèle de cellules de mélanome SK-Mel-28 (Ruan et Lloyd, 1992 ; Yamashiro *et al.*, 1995). Les lignées et tissus de mélanome sont également enrichis en G<sub>D2</sub>, dé-*N*-acétyl-G<sub>D3</sub>, 9-*O*-acétyl-G<sub>D3</sub> (CDw60) et 9-*O*-acétyl-G<sub>D2</sub> (Chammas *et al.*, 1999 ; Popa *et al.*, 2007 ; Cheresh *et al.*, 1984 ; Kohla *et al.*, 2002 ; Yvon *et al.*, 2009).

L'inhibition de l'expression de la G<sub>D3</sub> synthétase par l'utilisation de vecteurs anti-sens s'accompagne d'une forte diminution d'expression du G<sub>D3</sub> et de son dérivé 9-*O*-acétylé à la surface des cellules de mélanome de hamster AbC-1. Ce phénotype particulier est corrélé à une diminution de la croissance tumorale, sans affecter la mélanogenèse (Birklé *et al.*, 2000). Afin d'appréhender le rôle du G<sub>D3</sub> dans le développement de la tumeur primaire et l'apparition de métastases, l'équipe du Pr. Koichi Furukawa a utilisé les propriétés d'une lignée dérivée du modèle SK-Mel-28 : le mutant SK-Mel-28-N1, déficient en G<sub>D3</sub>, dont les capacités de prolifération sont nettement réduites *in vitro* et *in vivo* (Nakano *et al.*, 1996). Ce

modèle a été obtenu après traitement des cellules SK-Mel-28 avec un anticorps anti-G<sub>D3</sub> (R24) et dilution clonale des cellules résistantes (Nakano *et al.*, 1996). La surexpression stable de la G<sub>D3</sub> synthétase dans les cellules SK-Mel-28-N1 (GD3S<sup>+</sup>) conduit à la traduction d'une protéine active dont la conformation et la localisation cellulaire permettent la conversion du G<sub>M3</sub> en G<sub>D3</sub>. Les cellules GD3S<sup>+</sup> prolifèrent et migrent davantage que des cellules contrôle, et ceci dans différentes conditions de culture testées (Hamamura *et al.*, 2005 ; Furukawa *et al.*, 2006). Ces observations phénotypiques s'accompagnent de la phosphorylation de trois protéines adaptatrices majeures, impliquées dans les phénomènes de prolifération, d'invasion et de motilité : la paxilline, p130Cas et la kinase d'adhésion focale FAK (*Focal Adhesion Kinase*) (Hamamura *et al.*, 2005 ; 2008 ; Turner, 2000 ; Defilippi *et al.*, 2006). Ces chercheurs ont également montré que l'activation des protéines p130Cas et FAK est directement corrélée à la croissance et à la migration *in vitro* des cellules G<sub>D3</sub> positives, alors que la paxilline est liée aux propriétés invasives.

En parallèle, plusieurs études ont démontré que le G<sub>D3</sub> favorise l'adhérence de cellules de mélanome à la fibronectine, à la laminine et au collagène de type I ou IV. Le G<sub>D3</sub> pourrait ainsi jouer un rôle crucial dans l'invasion tumorale, en agissant comme un médiateur de la formation de métastases au travers d'interactions directes avec les éléments de la matrice extracellulaire ou indirectes par l'intermédiaire des intégrines (Nakano *et al.*, 1999 ; Birklé *et al.*, 2003 ; Kuphal *et al.*, 2005). Dans ce contexte, Ohkawa et ses collaborateurs ont récemment montré que l'adhérence des cellules SK-Mel-28-N1 GD3S<sup>+</sup> au collagène de type I implique une co-localisation du G<sub>D3</sub> et de la chaîne  $\beta 1$  des intégrines au sein des radeaux lipidiques et des microdomaines riches en glycosphingolipides (GEM) (**Figure 23**). Cet événement entraîne une augmentation de l'activation des protéines FAK et paxilline mais aussi de la voie de signalisation IKL-Akt (*Integrin-Linked Kinase-Akt*), et renforce par conséquent les capacités prolifératives et migratoires de ces cellules (Ohkawa *et al.*, 2010).



**Figure 23 : Effets de l'expression du ganglioside  $G_{D3}$  sur les propriétés biologiques de cellules tumorales de mélanome.** L'expression du  $G_{D3}$  augmente la croissance, la migration et l'invasion de cellules de mélanome, en modulant l'activation de récepteurs aux facteurs de croissance ou des intégrines. Ces effets sont transmis par l'intermédiaire des molécules adaptatrices FAK, AKL-Akt, p130Cas et paxilline. Les interactions entre le  $G_{D3}$  et les récepteurs au niveau de la membrane plasmique doivent encore être éclaircies. Résidu de tyrosine phosphorylé :  $\text{P}$  (image adaptée de Furukawa *et al.*, 2006).

Comme le  $G_{D3}$ , le dé-*N*-acétyl- $G_{D3}$  est surexprimé dans les mélanomes ; il représente plus particulièrement un marqueur du mélanome métastatique (Liu *et al.*, 2009). Ce ganglioside particulier favorise la migration et l'invasion cellulaire par un mécanisme dépendant de l'activation de la métalloprotéase MMP-2 et du système uPA (*urokinase-like Plasminogen Activator*).

A l'inverse, les gangliosides  $G_{D1b}$ ,  $G_{T1b}$  et  $G_{Q1b}$  répriment la croissance tumorale en inhibant la production d'IL-8 (Kanda *et al.*, 2001). La surexpression de la  $G_{M1}/G_{D1b}$  synthétase ou  $\beta$ 3Gal T4 dans un modèle de mélanome métastatique inhibe les propriétés tumorigènes de ces cellules, en affectant l'expression et la localisation membranaire des gangliosides  $G_{D3}$ ,  $G_{D1b}$  et  $G_{T1b}$  (Dong *et al.*, 2010).



Les tumeurs solides synthétisent et libèrent des gangliosides dans leur microenvironnement qui pourraient également favoriser leur développement en inhibant la réponse immunitaire de l'organisme (Li *et al.*, 1995). Ainsi, le G<sub>D3</sub>, mais également le G<sub>M3</sub>, purifiés à partir de mélanome humain, inhibent la différenciation et induisent l'apoptose de cellules dendritiques (Péguet-Navarro *et al.*, 2003). Cette mort cellulaire programmée est dépendante de l'activation des caspases, et implique une interaction directe du G<sub>D3</sub> avec les mitochondries ainsi que la production d'anions superoxide (Bennaceur *et al.*, 2009).

Finalement, le G<sub>D3</sub> pourrait avoir une importance dans la radiorésistance des tumeurs de mélanome : la sensibilité aux radiations de cellules de mélanome humain M4Be serait en effet inversement corrélée à la quantité totale de gangliosides et à la présence de G<sub>D3</sub> (Thomas *et al.*, 1996 ; 1997).

- Rôle dans les tumeurs cérébrales

Les gangliosides sont désormais décrits pour leur implication dans la cancérogenèse des tissus neuronaux.

Les tumeurs cérébrales ou tumeurs intracrâniennes regroupent toutes les tumeurs bénignes ou malignes qui se développent dans la boîte crânienne, aux dépens du cerveau ou des structures anatomiques voisines: méninges, nerfs crâniens, hypophyse... Les tumeurs cérébrales primaires les plus fréquentes sont les tumeurs gliales ou gliomes. Elles sont appelées astrocytomes, oligoastrocytomes ou oligodendrogliomes, en fonction du type cellulaire qui leur a donné naissance (astrocyte ou oligodendrocyte). On peut encore nommer les méningiomes, qui se développent très lentement à partir des méninges, les médulloblastomes ou encore les germinomes.

Le neuroblastome représente la tumeur solide extracrânienne la plus fréquente chez le jeune enfant. Ce cancer se développe à partir des cellules embryonnaires de la crête neurale qui constituent le système nerveux autonome sympathique.

Les disialogangliosides G<sub>D3</sub> et G<sub>D2</sub> sont décrits comme les AGAT principalement surexprimés dans les astrocytomes, les médulloblastomes, les méningiomes et les neuroblastomes (Berra *et al.*, 1985 ; Shinoura *et al.*, 1992 ; Ladisch *et al.*, 1997 ; Ruan *et al.*, 1999). A l'inverse, les gangliosides complexes de la série b-, G<sub>D1b</sub>, G<sub>T1b</sub> et G<sub>Q1b</sub>, sont moins exprimés dans les tumeurs et les cellules de neuroblastome que dans les tissus sains, et cette absence d'expression

serait associée à un mauvais pronostic de survie pour des enfants atteints de ce cancer (Hettmer *et al.*, 2003 ; 2005). Une analyse en PCR en temps réel de l'expression des ARNm des GTs impliquées dans la biosynthèse des gangliosides, dans 137 biopsies issues de patients atteints de gliome à différents stades, a permis de mettre en lumière les valeurs pronostiques des G<sub>D3</sub> et G<sub>D2</sub> synthétases. Les résultats de cette étude montrent qu'une forte expression de la G<sub>D3</sub> synthétase, concomitante à une faible expression de la G<sub>D2</sub> synthétase, est corrélée positivement à la survie globale des patients (Oblinger *et al.*, 2006). L'expression de la G<sub>D2</sub> synthétase peut également être utilisée comme valeur pronostique pour les neuroblastomes très agressifs de grade IV, qui engendrent des métastases au niveau de la moelle osseuse (Cheung *et al.*, 2003; 2004).

Les travaux de l'équipe de Yu ont permis de mettre en évidence le rôle joué par le G<sub>D3</sub> dans les phénomènes prolifératifs et invasifs des cellules cancéreuses du système nerveux. Ces chercheurs ont montré que l'inhibition de l'expression de la G<sub>D3</sub> synthétase dans des cellules de neuroblastome s'accompagne d'une diminution de la croissance et de la migration cellulaire *in vitro* ainsi que de la croissance tumorale et de la formation de métastases dans un modèle de xénogreffe en souris *Nude* (Zeng *et al.*, 1999 ; 2000). Au contraire, la surexpression de la G<sub>D3</sub> synthétase augmente la tumorigenèse et l'invasion de cellules tumorales gliales de rat, alors que l'utilisation d'anticorps anti-G<sub>D3</sub> inhibe spécifiquement la croissance tumorale (Sottocornola *et al.*, 1999 ; Hedberg *et al.*, 2000).

A noter, deux études ont rapporté l'effet apoptogène du G<sub>D3</sub> endogène dans une lignée de gliome et dans des oligodendrocytes en culture (Simon *et al.*, 2000 ; Saqr *et al.*, 2006). La concentration et la localisation fine des gangliosides, et notamment du G<sub>D3</sub>, semblent ainsi définir leur rôle dans les tumeurs d'origine neuro-ectodermique.

Le mécanisme moléculaire impliquant le G<sub>D2</sub> dans la cancérogenèse des tumeurs cérébrales n'a pas encore été mis en avant, même si cet AGAT est utilisé depuis quelques années comme cible thérapeutique d'intérêt dans les thérapies anticancéreuses (point développé dans le paragraphe III.B.2.d). Le G<sub>D2</sub> semblerait cependant jouer un rôle immunosuppresseur dans le neuroblastome (Li *et al.*, 1996).

Le ganglioside simple G<sub>M3</sub> quant à lui présente les effets inverses sur les tumeurs gliales: inhibition de la prolifération cellulaire concomitante à une induction de l'apoptose (Noll *et al.*, 2001 ; Fujimoto *et al.*, 2005). Le G<sub>M3</sub> pourrait diminuer la prolifération des cellules neuronales en bloquant le cycle cellulaire et en favorisant l'apoptose, par l'intermédiaire d'un inhi-

biteur de la kinase cycline-dépendante p27<sup>Kip1</sup> (Nakatsuji et Miller, 2001). Il a également été démontré que la prolifération de cellules de neuroblastome humain est réduite en présence des gangliosides G<sub>M3</sub>, G<sub>M1</sub>, G<sub>D1a</sub> et G<sub>T1b</sub>, *via* une inhibition de la phosphorylation de l'EGFR (Mirkin *et al.*, 2002). Récemment, le rôle de la sialyltransférase ST6GalNAc V, responsable de la biosynthèse des gangliosides de la série  $\alpha$ , a été mis en évidence dans le gliome. La surexpression de ST6GalNAc V et du ganglioside G<sub>M2 $\alpha$</sub>  inhibe l'invasion et la croissance tumorale de cellules gliales U373G (Kroes *et al.*, 2010).

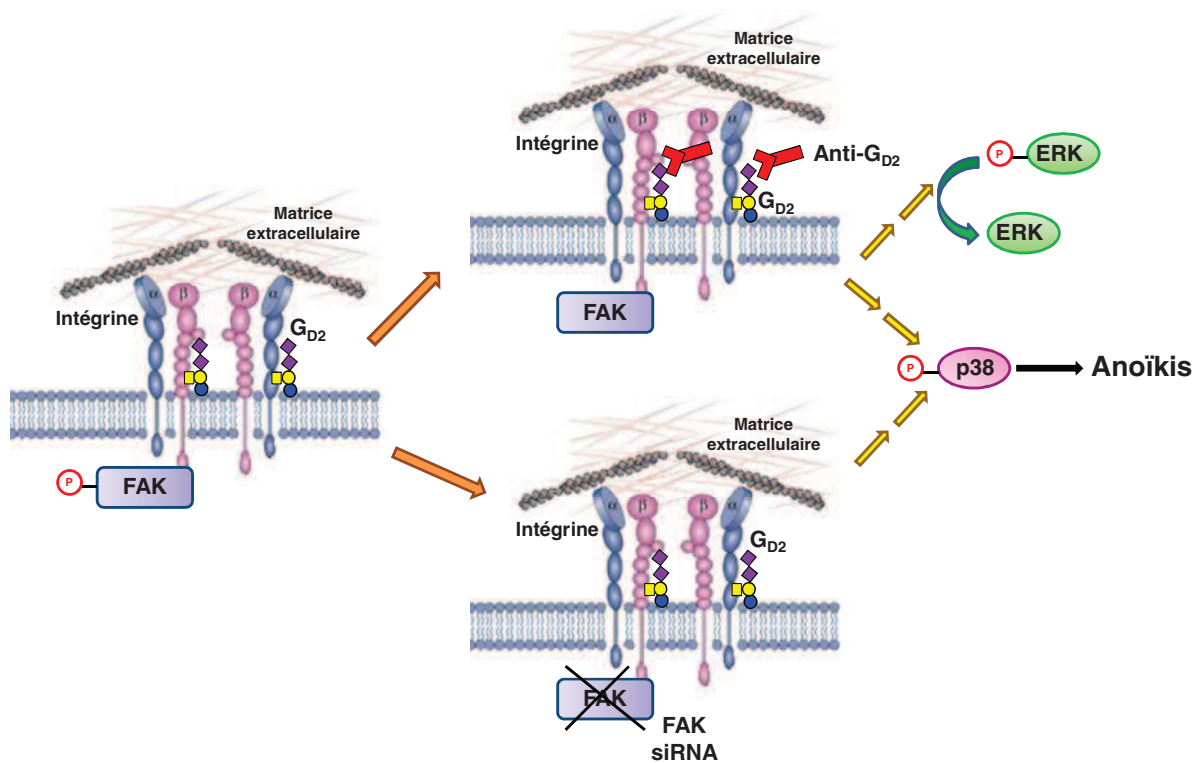
### **III. B. 2. b) Les gangliosides complexes dans les tumeurs pulmonaires**



Les tumeurs pulmonaires expriment différents gangliosides tels que le *N*-glycolyl-G<sub>M3</sub>, le G<sub>M2</sub>, le G<sub>M1</sub>, le fucosyl-G<sub>M1</sub>, le G<sub>D3</sub>, le 9-*O*-acétyl-G<sub>D3</sub> et le G<sub>D2</sub> (Yoshida *et al.*, 2001). Cependant, seuls les gangliosides complexes de la série b-, et notamment le G<sub>D2</sub>, sont néo-exprimés dans le cancer du poumon à petites cellules (SCLC ou *Small Cell Lung Cancer*) (Cheresh *et al.*, 1986 ; Grant *et al.*, 1996). Cette expression est liée à celle de la G<sub>D3</sub> synthétase, enzyme clef du métabolisme gangliosidique (Yoshida *et al.*, 2001).

Le G<sub>D2</sub> représente non seulement un marqueur de ce cancer particulier, mais il est également impliqué dans l'acquisition de la malignité. En effet, l'expression du G<sub>D2</sub> à la surface des cellules SK-LC-17, par transfection stable d'un vecteur codant la G<sub>D3</sub> synthétase, est nécessaire et suffisante pour accroître la croissance cellulaire et l'invasion de cellules SCLC (Yoshida *et al.*, 2001). A l'inverse, l'inhibition de l'expression du G<sub>D2</sub> par ARN interférence de la G<sub>D3</sub> synthétase réduit la prolifération cellulaire *in vitro* et la croissance tumorale dans un modèle de souris immunodéprimées (Ko *et al.*, 2006).

Des expériences de compétition à l'aide d'anticorps anti-G<sub>D2</sub> masquant la partie saccharidique permettent d'inhiber la prolifération tout en induisant l'apoptose des cellules SCLC, par un mécanisme dépendant des voies de signalisation ERK/MAPK et p38/MAPK (Yoshida *et al.*, 2001 ; Aixinjueluo *et al.*, 2005). L'incubation de cellules pulmonaires G<sub>D2</sub> positives avec un anti-G<sub>D2</sub> provoque très rapidement leur détachement des boîtes de culture et l'apoptose par anoïkis. Cette mort cellulaire joue un rôle critique dans l'homéostasie tissulaire des épithéliums par un contrôle physiologique de la dissémination des cellules dans l'organisme. Les anticorps anti-G<sub>D2</sub> assurent un changement de conformation des intégrines, une déphosphorylation des protéines FAK et ERK et une activation de la protéine p38 (**Figure 24**) (Aixinjueluo *et al.*, 2005). De plus, l'effet des anticorps anti-G<sub>D2</sub> est renforcé par l'utilisation de di-

verses molécules anticancéreuses *via* une activation de la voie SAPK/JNK ; ils pourraient donc être utilisés conjointement pour traiter les patients (Yoshida *et al.*, 2002).



**Figure 24: Apoptose par anoïkis de cellules du cancer du poumon à petites cellules.** La fixation d'un anticorps monoclonal anti-G<sub>D2</sub> pourrait moduler la conformation des intégrines voisines, entraînant la déphosphorylation des protéines FAK et ERK et l'activation de la voie de signalisation p38/MAPK. Résidu de tyrosine phosphorylé :  ; anticorps monoclonal anti-G<sub>D2</sub> :  (image adaptée de Aixinjueluo *et al.*, 2005).

Contrairement au neuroblastome, une étude récente a permis de démontrer que la G<sub>D2</sub> synthétase ne peut être utilisée comme biomarqueur pronostique du SCLC (Chen *et al.*, 2009).

Les gangliosides simples de la série a-, G<sub>M3</sub> et N-glycolyl-G<sub>M3</sub>, semblent jouer un rôle dans les propriétés tumorigènes du cancer du poumon à non-petites cellules (NSCLC ou *Non-Small Cell Lung Cancer*) (van Crujisen *et al.*, 2009).

***III. B. 2. c) Expression des gangliosides complexes dans d'autres types de cancer***

Le 9-*O*-acétyl-G<sub>D3</sub> est surexprimé dans une forme particulière de leucémie touchant les cellules immatures de la moelle osseuse : la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL). De manière intéressante, l'expression du motif acétylé semble protéger ces cellules de la mort cellulaire programmée (Mukherjee *et al.*, 2008). En parallèle, la sialidase Neu3 est sous-exprimée dans les LAL, en termes d'expression transcriptionnelle et d'activité enzymatique. L'expression de cette enzyme a d'ailleurs été associée à la progression de la maladie : la Neu3 est exprimée par les lymphoblastes après une chimiothérapie, alors qu'elle est de nouveau faiblement détectée en cas de rechute. De plus, cette faible expression de la sialidase a été corrélée à la détection du motif 9-*O*-acétyl-G<sub>D3</sub> (Mandal *et al.*, 2010).

Les gangliosides G<sub>M3</sub>, G<sub>M2</sub>, G<sub>D2</sub>, 9-*O*-acétyl-G<sub>D2</sub>, G<sub>D1a</sub> et G<sub>M1b</sub> sont détectés dans les cancers ovariens. Le G<sub>D1a</sub> est retrouvé également dans le plasma et le liquide d'ascite des patientes, ce qui traduit un relargage de ce ganglioside dans le microenvironnement tumoral (Ravindranath *et al.*, 2007).

***III. B. 2. d) Les thérapies anticancéreuses visant les gangliosides***

De par leur implication dans la tumorigenèse, les gangliosides semblent constituer une cible de premier intérêt dans la thérapie anticancéreuse. Bien que les AGAT exprimés à la surface des cellules tumorales puissent être antigéniques, ils sont rarement immunogènes. De multiples signaux semblent nécessaires pour activer une forte réponse immunitaire cellulaire contre les AGAT, *via* les lymphocytes T. Dans ce contexte, des outils thérapeutiques innovants, basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-gangliosides, sont en cours de développement et certains ont atteint les phases d'essais cliniques chez des patients atteints de mélanome, de neuroblastome ou encore de cancer du poumon à petites cellules. Les études les plus approfondies ont été menées sur le mélanome.

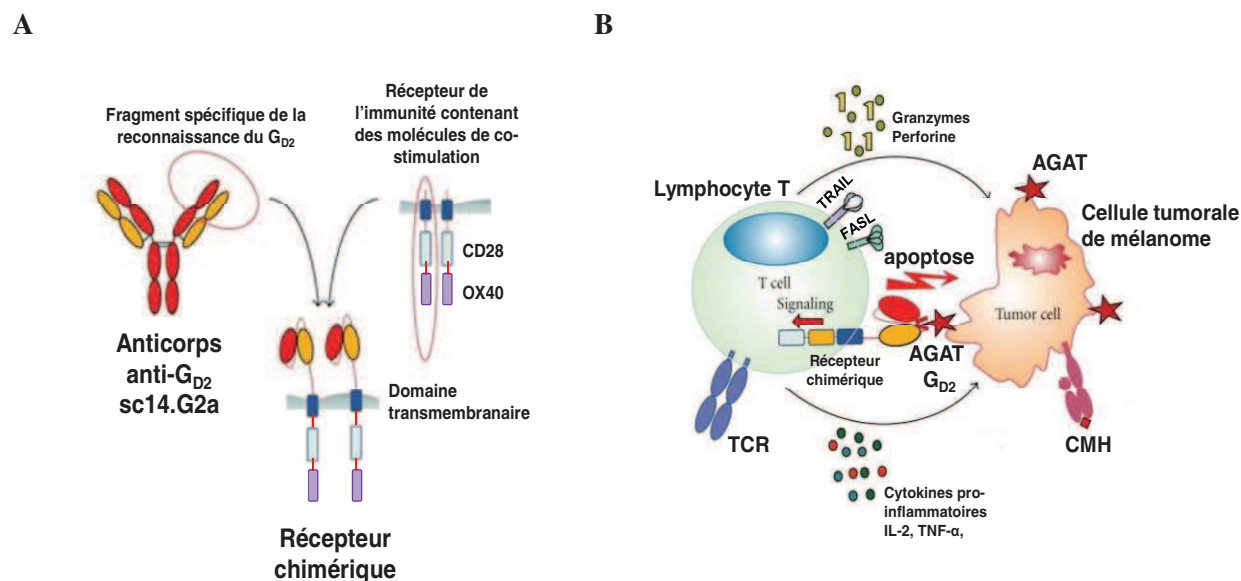
Le mélanome représente une pathologie de plus en plus fréquente, sévère, pour laquelle les traitements standards sont peu efficaces. Etant données la chimio- et la radorésistance intrinsèque de la tumeur primaire ainsi que le développement rapide de métastases incurables, de grands espoirs se portent désormais sur l'immunothérapie. Le développement de techniques de surveillance immunologique, la découverte de cytokines nécessaires à la culture *ex vivo* de cellules dendritiques et la caractérisation de nombreux antigènes tumoraux ont ouvert de nou-

velles voies thérapeutiques possibles (Ghiringhelli et Zitvogel, 2006). Nous nous focaliserons dans ce paragraphe sur le développement de stratégies vaccinales ciblant les gangliosides dans le mélanome (III.B.2.a).

Les premiers essais thérapeutiques dits passifs ont été entrepris à l'aube des années 1980, avec l'anticorps murin R24 (Dippold *et al.*, 1980 ; Houghton *et al.*, 1985). Les effets anti-tumoraux de cet anticorps monoclonal, qui reconnaît spécifiquement le disialoganglioside  $G_{D3}$ , ont été rapportés chez la souris et lors de nombreux essais cliniques. L'anticorps R24 favorise *in vitro* une toxicité dépendante du complément et une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ; il bloque et réprime également la croissance tumorale dans des modèles animaux (Nasi *et al.*, 1997). Cependant le R24, utilisé seul ou en combinaison avec des cytokines ou avec des agents chimio-thérapeutiques, présente des résultats limités chez les patients. Ceci est lié au fort potentiel immunogène de l'anticorps (Houghton *et al.*, 1985 ; Vadhan-Raj *et al.*, 1988 ; Bajorin *et al.*, 1990 ; Kirkwood *et al.*, 2000). Dans ce contexte, un anticorps chimérique KM871 a été développé (Shitara *et al.*, 1993). L'injection intraveineuse de KM871 radiomarqué réduit significativement la croissance tumorale par un ciblage spécifique de la tumeur primaire chez des souris *Nude* (Scott *et al.*, 2001). De plus, des résultats cliniques préliminaires semblent indiquer que le KM871, stable *in vivo*, présente un potentiel thérapeutique intéressant pour le traitement de malades atteints de mélanome au stade métastatique (Scott *et al.*, 2005).

Une autre stratégie vaccinale passive consiste à injecter des lymphocytes T humains, manipulés génétiquement *ex vivo* et qui reconnaissent un ganglioside d'intérêt néo-exprimé dans le mélanome. Ainsi, l'équipe de Brenner a mis au point un modèle de lymphocytes T capable de se fixer spécifiquement au  $G_{D2}$ . Ces cellules effectrices expriment un récepteur chimérique composé d'un domaine extracellulaire reconnaissant le  $G_{D2}$  (dérivé de l'anticorps anti- $G_{D2}$  sc14.G2a) et du domaine intracellulaire des molécules de co-stimulation CD28 et OX40 (**Figure 25** ; Yvon *et al.*, 2009). L'expression du  $G_{D2}$  à la surface de cellules primaires de mélanome permet une reconnaissance à la fois *in vitro* et *in vivo* par le récepteur chimérique, une activation et une prolifération des lymphocytes T *via* les molécules CD28 et OX40, et une cytotoxicité contre les cellules tumorales (**Figure 25** ; Yvon *et al.*, 2009). A noter : bien que le  $G_{D2}$  ne soit pas le ganglioside majoritairement exprimé par les cellules de mélanome, son expression est suffisante pour être ciblé et provoquer une réponse cytotoxique efficace chez la souris, *via* les lymphocytes T chimères. Des expériences similaires ont été décrites récemment : l'injection de lymphocytes T porteurs de récepteurs chimériques spécifiques du  $G_{D3}$ ,

combinée à la cytokine IL 2, induit une rémission de la tumeur chez des souris *Nude* (Lo *et al.*, 2010).



**Figure 25 : Stratégie vaccinale utilisant des lymphocytes T manipulés génétiquement.** A. La mise au point d'un modèle de lymphocytes T, exprimant un récepteur chimérique composé d'un domaine extracellulaire reconnaissant le G<sub>D2</sub> et du domaine intracellulaire des molécules de co-stimulation CD28 et OX40, est réalisée *ex vivo*. B. Les cellules de mélanome qui expriment du G<sub>D2</sub> à la surface cellulaire sont reconnues à la fois *in vitro* et *in vivo* par le récepteur chimérique. Cette reconnaissance spécifique entraîne une activation et une prolifération des lymphocytes T *via* les molécules CD28 et OX40 et une cytotoxicité contre les cellules tumorales par libération de granzymes, de perforines ou encore de cytokines pro-inflammatoires (schémas adaptés de Yvon *et al.*, 2009 ; Cartellieri *et al.*, 2010).

Actuellement, les immunologistes développent des stratégies d'immunothérapie active qui consistent à induire une réponse immunitaire T primaire *in vivo*. Des vaccins dont l'immunogène est une molécule comprenant une protéine porteuse lactone-KLH sur laquelle sont greffées des structures gangliosidiques G<sub>D2</sub> ou G<sub>D3</sub>, combiné à une solution adjuvante, présentent un potentiel thérapeutique intéressant pour le traitement des malades (Figure 26 ; Ragupathi *et al.*, 2000 ; 2003). Ils induisent la production d'anticorps anti-G<sub>D2</sub> ou anti-G<sub>D3</sub>, et stimulent une cytotoxicité dépendante du complément chez la majorité des patients (Ragupathi *et al.*, 2000 ; 2003 ; Chapman *et al.*, 2004).

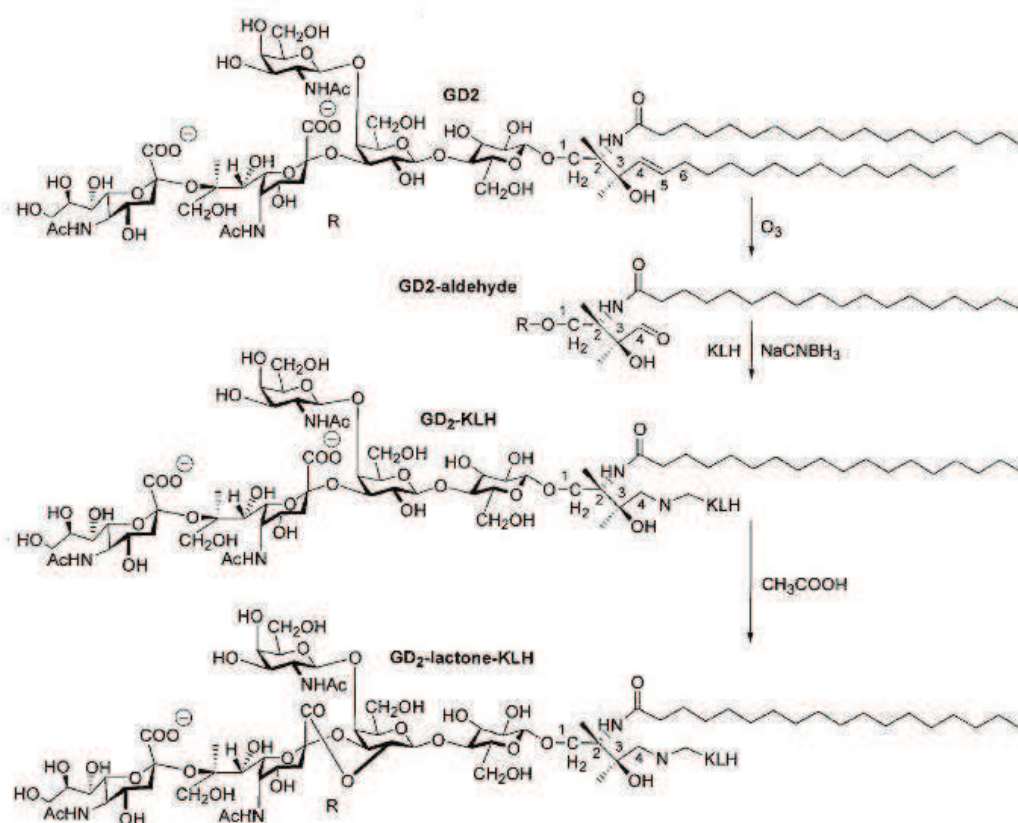


Figure 26 : Structure du  $GD_2$  et de la molécule  $GD_2$ -lactone-KLH.

Malgré la multitude d'essais thérapeutiques de vaccination anti-mélanome, aucun protocole n'a obtenu aujourd'hui de résultats assez convaincants pour modifier la thérapeutique actuelle de la maladie. Seul le GMK, développé par la société Progenics Pharmaceuticals aux Etats-Unis, a atteint la phase III d'essais cliniques, et permet d'augmenter la survie globale des patients (Knutson, 2002). Les stratégies actuelles visent à créer des vaccins multi-antigéniques, capables de cibler plusieurs AGAT lors du même essai clinique (Dube et Bertozzi, 2005).



## **IV. OBJECTIFS DE LA THESE**

### **IV. A. Contexte de la thèse**

Bien qu'il existe un grand nombre d'études portant sur les anomalies d'expression des gangliosides complexes et leurs conséquences sur la biologie de cellules issues de diverses tumeurs d'origine neuro-ectodermique, peu de données sont disponibles sur l'expression de ces AGAT dans les cellules et les tumeurs mammaires.

Une étude clinique publiée en 1996 a permis de comparer l'expression tissulaire des gangliosides dans des carcinomes canaux infiltrants et dans des tissus mammaires sains par des techniques d'immuno-détection et de spectrométrie de masse. Cette étude révèle une augmentation globale du taux de GSLs acides dans les tumeurs mammaires. Le  $G_{D3}$  semble être faiblement exprimé par les cellules épithéliales mammaires saines, tandis que son expression est nettement augmentée dans les carcinomes canaux infiltrants (CCI). Le *N*-glycolyl- $G_{M3}$ , des formes *O*-acétylées du  $G_{D3}$  (9-*O*-acétyl- $G_{D3}$  ou antigène CDw60) mais également du  $G_{T3}$ , absents de la glande mammaire normale, sont ré-exprimés dans les CCI et semblent par conséquent constituer des marqueurs oncofœtaux d'intérêt dans le cancer du sein (Marquina *et al.*, 1996 ; Oliva *et al.*, 2006). Les données concernant la composition en gangliosides des cellules cancéreuses mammaires, utilisées en routine au laboratoire, restent relativement parcellaires (Nohara *et al.*, 1998).

L'expression des GTs impliquées dans la biosynthèse des gangliosides peut également être altérée dans les tumeurs de sein. Deux études cliniques ont ainsi montré que l'expression du gène *ST8SIA1*, codant l'enzyme clef de la biosynthèse des gangliosides complexes, est augmentée dans les tumeurs mammaires ER négatives et corrélée à un grade histopronostique élevé (Ruckhäberle *et al.*, 2008 ; 2009). A l'inverse, une expression élevée de *ST8SIA1* dans les tumeurs ER positives serait associée à une augmentation de la survie globale des patientes. Ces études ont été réalisées sur des banques de données publiques (Uppsala, Stockholm, London, Oxford-Untreated, Oxford-Tamoxifen, Rotterdam, Villejuif, New-York, expO) ainsi que sur des données issues de l'hôpital de Frankfurt.

En parallèle, l'expression des GTs est altérée dans les cellules cancéreuses mammaires métastatiques. Ainsi, des clones MDA-MB-231-MET, sélectionnés à partir de métastases osseuses, surexpriment le gène *ST8SIA1* (Carcel-Trullols *et al.*, 2006). Récemment, l'équipe de Massa-

gué, leader mondial dans l'étude des dérégulations génétiques contrôlant la dissémination des cellules cancéreuses du sein, a mis en lumière le rôle spécifique du gène de sialyltransférase *ST6GALNAC5* dans la formation des foyers métastatiques cérébraux (Bos *et al.*, 2009 ; paragraphe I.B.3.c). L'analyse de l'expression génique des cellules à haut potentiel métastatique a révélé l'existence d'une « signature des métastases cérébrales », qui regroupe un ensemble de 17 gènes associés à une rechute des métastases cérébrales chez des patientes atteintes de cancer du sein (traitées ou non par des adjuvants). Parmi ces gènes, on retrouve entre autres les gènes favorisant l'extravasation pulmonaire décrit dans le paragraphe I.B.3.c : *COX2*, *MMP1*, *ANGPTL4*, *HBEGF* et *EREG* (Padua *et al.*, 2008 ; Bos *et al.*, 2009 ; Nguyen *et al.*, 2009). Cependant, *ST6GALNAC5* représente le seul gène caractéristique des métastases du cerveau ; son expression n'est retrouvée ni dans les ganglions lymphatiques, ni dans les métastases pulmonaires, osseuses ou hépatiques (Kang *et al.*, 2003 ; Minn *et al.*, 2005). L'expression de cette sialyltransférase, responsable en partie de la biosynthèse des gangliosides de la série  $\alpha$ , est suffisante pour induire l'extravasation de cellules mammaires au travers la barrière hémato-encéphalique et infiltrer le parenchyme cérébral (Bos *et al.*, 2009).

Ce dernier papier a permis de démontrer le rôle clef de la sialylation de surface, et plus particulièrement des gangliosides, dans la progression de la pathologie. Cependant, le mécanisme moléculaire par lequel les gangliosides renforcent l'agressivité du cancer du sein est inconnu et laisse place à de nombreuses investigations.

Lorsque ce projet a été initié au sein du laboratoire du Professeur Delannoy, aucune corrélation entre la surexpression de *ST8SIAI* dans les tumeurs ER négatives, les disialogangliosides et des paramètres d'agressivité tumorale n'avait été démontrée. Aucune étude sur ce sujet n'avait été publiée.

## **IV. B. Les objectifs de la thèse**

Etant donné l'incidence manifeste de l'expression des disialogangliosides sur l'évolution de nombreuses tumeurs, et compte tenu du peu de données disponibles sur l'expression de ces gangliosides dans le cancer du sein, il nous est apparu essentiel d'étudier les effets de l'expression de *ST8SIAI* sur le comportement de cellules cancéreuses de sein.

## *Introduction bibliographique*

Pour ce faire, différentes approches ont été employées :

### ❖ Une approche descriptive

Dans un premier temps, mon travail a consisté à caractériser la biosynthèse des gangliosides dans des cellules cancéreuses de sein (MDA-MB-231, MCF-7, T47-D et BT-20) et dans un modèle de cellules mammaires immortalisées non tumorales (MCF10A), par des techniques d'immunocytochimie, de microscopie confocale, de cytométrie de flux, de spectrométrie de masse et de PCR quantitative.

### ❖ Une approche fonctionnelle

Dans un second temps, nous avons induit l'expression de la  $G_{D3}$  synthétase (GD3S) dans des cellules cancéreuses mammaires, par transfection stable du vecteur pcDNA3-ST8Sia I. Nous avons obtenu un modèle MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup>, accumulant des gangliosides complexes des séries b- et c- à la surface cellulaire. Nous avons analysé l'incidence de ce nouveau profil gangliosidique sur la biologie des cellules de cancer de sein, en termes de prolifération, de migration et d'adhérence. L'effet de l'expression de la  $G_{D3}$  synthétase sur le développement tumoral a également été évalué en modèle animal.

### ❖ Une approche mécanistique

Finalement, nous avons déterminé le mécanisme moléculaire par lequel les cellules MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> prolifèrent en absence de sérum et de facteurs de croissance. Nous avons plus particulièrement analysé l'effet de l'expression des gangliosides complexes sur l'activation constitutive du récepteur c-Met, et des voies de signalisation associées MEK/ERK et PI3K/Akt.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse sont présentés sous forme d'articles, publiés dans les journaux *Biological Chemistry*, *Molecular Cancer Research* et prochainement soumis dans *Glycobiology*.



## **RESULTATS**



## **Article 1: G<sub>D3</sub> synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells**

Dans ce premier article, nous avons analysé la biosynthèse des gangliosides dans un ensemble de lignées cellulaires de sein (MDA-MB-231, MCF-7, T47-D, BT-20, MCF-10A). Nous avons tout d'abord montré que l'ensemble de ces cellules se caractérisent par un profil d'expression gangliosidique restreint, qui se limite essentiellement au G<sub>M1</sub>. Les gangliosides complexes des séries b- et c- n'ont pu être détectés. Ce profil d'expression est en accord avec l'expression transcriptionnelle des enzymes impliquées dans la biosynthèse du G<sub>D3</sub>, analysée en PCR en temps réel. Afin d'évaluer les effets de l'expression de la G<sub>D3</sub> synthétase sur le comportement de cellules cancéreuses mammaires, un modèle de cellules MDA-MB-231, qui exprime stablement des gangliosides complexes des séries b- (G<sub>D3</sub>, G<sub>D2</sub>) et c- (G<sub>T3</sub>), a été mis au point et caractérisé. Nous avons pu démontrer que ce changement d'expression des gangliosides contribue à accroître la prolifération et la migration des cellules MDA-MB-231, en particulier en absence de sérum et de facteurs de croissance exogènes.

Ces premiers résultats ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Biological Chemistry* en 2009.





# $G_{D3}$ synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells

Aurélie Cazet<sup>1</sup>, Sophie Groux-Degroote<sup>1</sup>,  
Béatrice Teylaert<sup>1</sup>, Kyung-Min Kwon<sup>2</sup>, Sylvain  
Lehoux<sup>1</sup>, Christian Slomianny<sup>3</sup>, Cheori-Ho Kim<sup>2</sup>,  
Xuefen Le Bourhis<sup>4</sup> and Philippe Delannoy<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR  
CNRS 8576, University of Sciences and Technologies  
of Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>2</sup>Molecular and Cellular Glycobiology Unit, Department  
of Biological Science, SungKyunKwan University,  
Suwon, Kyunggi-Do, Korea

<sup>3</sup>INSERM U800, IFR 147, University of Sciences and  
Technologies of Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq,  
France

<sup>4</sup>INSERM U908, Growth Factor Signaling in Breast  
Cancer, Functional Proteomics, University of Sciences  
and Technologies of Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq,  
France

\*Corresponding author

e-mail: philippe.delannoy@univ-lille1.fr

## Abstract

The disialoganglioside  $G_{D3}$  is an oncofetal marker of a variety of human tumors including melanoma and neuroblastoma, playing a key role in tumor progression.  $G_{D3}$  and 9-O-acetyl- $G_{D3}$  are overexpressed in approximately 50% of invasive ductal breast carcinoma, but no relationship has been established between disialoganglioside expression and breast cancer progression. In order to determine the effect of  $G_{D3}$  expression on breast cancer development, we analyzed the biosynthesis of gangliosides in several breast epithelial cell lines including MDA-MB-231, MCF-7, BT-20, T47-D, and MCF10A, by immunocytochemistry, flow cytometry, and real-time PCR. Our results show that, in comparison to tumors, cultured breast cancer cells express a limited pattern of gangliosides. Disialogangliosides were not detected in any cell line and  $G_{M3}$  was only observed at the cell surface of MDA-MB-231 cells. To evaluate the influence of  $G_{D3}$  in breast cancer cell behavior, we established and characterized MDA-MB-231 cells overexpressing  $G_{D3}$  synthase. We show that  $G_{D3}$  synthase expressing cells accumulate  $G_{D3}$ ,  $G_{D2}$ , and  $G_{T3}$  at the cell surface. Moreover,  $G_{D3}$  synthase overexpression bypasses the need of serum for cell growth and increases cell migration. This suggests that  $G_{D3}$  synthase overexpression may contribute to increasing the malignant properties of breast cancer cells.

**Keywords:** breast cancer; cell proliferation; gangliosides;  $G_{D3}$  synthase; MDA-MB-231.

## Introduction

Changes of cell surface glycosylation are one of the most important modifications that occur in oncogenesis. Both glycoproteins and glycolipids carbohydrate moieties are affected by cellular transformation, leading to the appearance or the overexpression of tumor-associated carbohydrate antigens (TACAs). These changes in glycosylation have been described for a large number of cancer types and are usually associated with a poor prognosis for the patients (Fukuda, 1996; Hakomori, 1996). Most of TACAs are sialylated antigens and the increase of sialylation is a well-known general feature of transformed cells. As an example, the mucin-type sialyl-Tn antigen is increased in pancreas, stomach, colon, uterus, and breast cancers and is associated with a poor prognosis (Ura et al., 1992; Narita et al., 1993; Soares et al., 1996). A family of enzymes named sialyltransferases catalyzes the biosynthesis of sialylated glycans. Twenty different sialyltransferases acting on glycoproteins and/or glycolipids have been characterized and cDNAs have been cloned from human tissues or cells (Harduin-Lepers et al., 2001). All these enzymes use CMP-sialic acid as the activated sugar donor but present distinct acceptor substrate specificity. We have previously shown that the increased expression of sialyltransferases can be correlated with the overexpression of TACAs and could be used as tumor markers for the follow-up of breast cancer patients, especially for node-negative patients (Recchi et al., 1998a,b; Hebbar et al., 2003).

Gangliosides, the glycosphingolipids carrying one or more sialic acid residues, are often found in growing and developing tissues.  $G_{D2}$ ,  $G_{D3}$ , and  $G_{T3}$  are considered as oncofetal markers in animal and human tumors, such as melanoma and neuroblastoma, and are potential epitopes for anti-tumor vaccine development (Hakomori, 2001; Sabel and Sondak, 2002; Modak and Cheung, 2007). Gangliosides are structurally and biosynthetically derived from lactosylceramide (LacCer). Further sugar residues, including *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), galactose (Gal), and sialic acid (*N*-acetyl neuraminic acid, NeuAc), are transferred in a stepwise manner by a series of specific glycosyltransferases (Tettamanti, 2004). The glycosyltransferases that catalyze the first steps in ganglioside biosynthesis, i.e., the formation of LacCer,  $G_{M3}$ , and  $G_{D3}$ , show high specificity toward their glycolipid substrates (Zeng and Yu, 2008). The relative amounts of these glycolipids at steady-state determine the amount of glycolipids of each series, b-series gangliosides only deriving from ganglioside  $G_{D3}$ . The steady-state level of membrane associated  $G_{D3}$  is therefore dependent on the level of expression and activity of several enzymes including  $G_{M3}$  synthase,  $G_{D3}$  synthase,  $G_{T3}$  synthase, and  $G_{D2}$  synthase.

A number of studies have shown that  $G_{D3}$  promotes tumor progression by mediating cell proliferation, migration, adhesion, differentiation, and angiogenesis, although the exact mechanisms of  $G_{D3}$  action remain to be precisely determined (Zeng et al., 2000; Birklé et al., 2003; Malisan and Testi, 2005).  $G_{D3}$  and its derivative 9-O-acetyl- $G_{D3}$  have been reported to be overexpressed in approximately 50% of invasive ductal breast carcinoma (Marquina et al., 1996) and the  $G_{D3}$  synthase gene (*ST8SIA1*) displayed higher expression among estrogen receptor negative breast cancer tumors (Ruckhäberle et al., 2008), associated with a decreased free survival of breast cancer patients (Ruckhäberle et al., 2009). However, no relationship between ganglioside expression and breast cancer development and aggressiveness has been reported. In this study, we have determined the level of expression of gangliosides and related enzymes in different breast cell lines. We have also determined the effects of  $G_{D3}$  synthase overexpression on proliferation and migration of the MDA-MB-231 breast cancer cells.

## Results

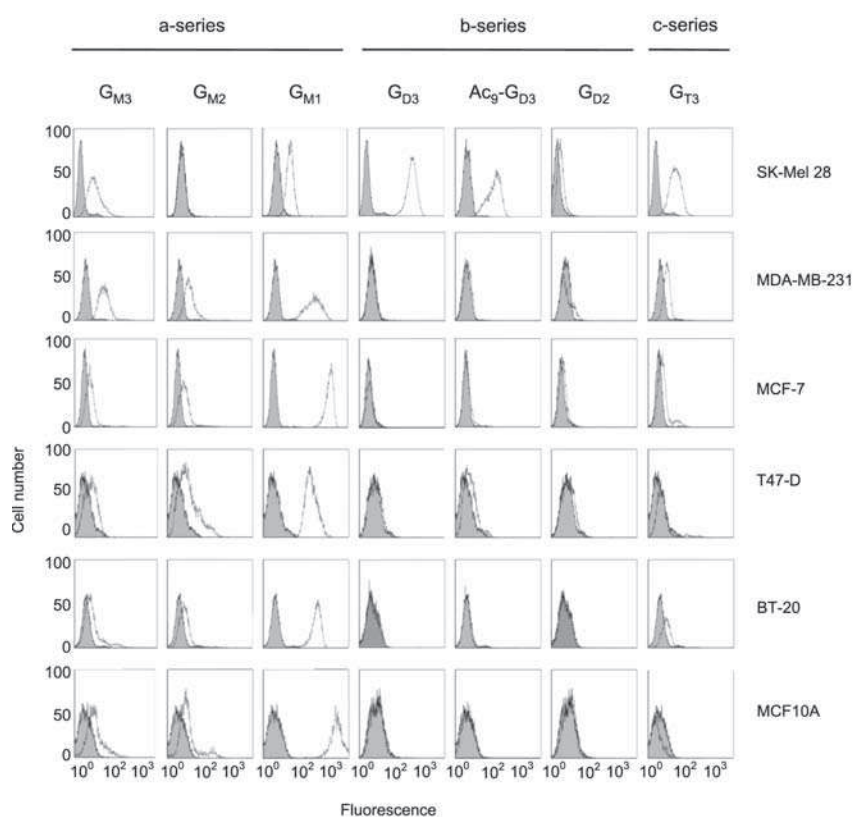
### Biosynthesis of gangliosides in human breast cell lines

Biosynthesis of gangliosides was analyzed by flow cytometry, confocal microscopy and real-time polymer-

ase chain reaction (PCR) in five breast epithelial cell lines routinely used in our laboratory (i.e., MDA-MB-231, MCF-7, T47-D, BT-20, and non-tumorigenic MCF10A cells). The murine melanoma cell line GM-95 (Ichikawa et al., 1994), which is deficient in glucosylceramide synthase and consequently does not express any gangliosides, was used as negative control for ganglioside immunodetection (data not shown), whereas the human melanoma cell line SK-Mel 28 was used as positive control for the expression of  $G_{M3}$ ,  $G_{D3}$ , 9-O-acetyl- $G_{D3}$ , and  $G_{T3}$  (Figure 1).

The results obtained by flow cytometry analysis showed that breast cancer cell lines expressed a limited number of gangliosides, mainly  $G_{M1}$  (Figure 1).  $G_{M1}$ , belonging to the a-series gangliosides, was expressed at high level in all breast cancer cell lines, especially in MCF-7 and MCF10A cells. Low amounts of  $G_{M2}$  were detected in all the cell lines, whereas  $G_{M3}$  was only observed at the cell surface of MDA-MB-231 cells. In parallel, b-series gangliosides, such as  $G_{D3}$ , 9-O-acetyl- $G_{D3}$  or  $G_{D2}$ , were not detected in any cell line. It is also interesting to note that MDA-MB-231 express a small amount of  $G_{T3}$ . Similar results have been obtained by immunocytochemistry and confocal microscopy (data not shown).

We have then performed real-time PCR experiments in order to determine the expression of glycosyltransferase genes involved in  $G_{D3}$  metabolism, i.e., *ST3GAL5* (encod-



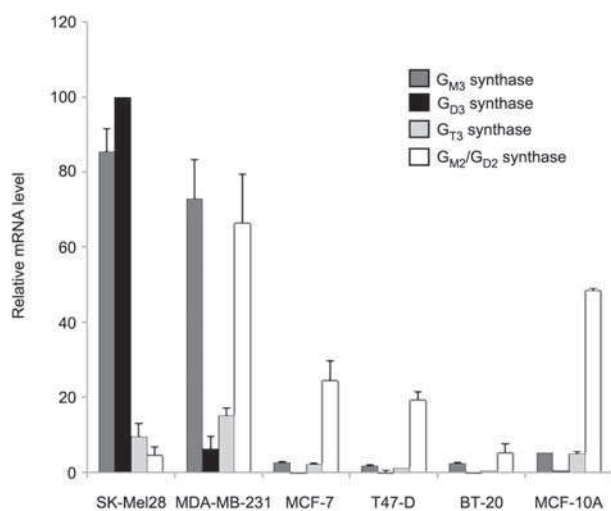
**Figure 1** Flow cytometry analysis of ganglioside expression in breast cell lines.

The immunodetection of  $G_{M3}$ ,  $G_{M2}$ ,  $G_{D3}$ , 9-O-acetyl- $G_{D3}$ ,  $G_{D2}$ ,  $G_{T3}$ , and  $G_{M1}$  was performed using GMR6, MK2-34, R24, GMR2, S220-51, A2B5 antibodies and the cholera toxin B subunit from *Vibrio cholerae*, respectively. Cells were fixed but not permeabilized in order to prevent any staining of the intracellular subcompartments. The filled peaks correspond to negative controls with a non-relevant mouse IgM or IgGκ. Black lines correspond to the signal observed after incubation with the different anti-ganglioside antibodies.

ing G<sub>M3</sub> synthase), *ST8SIA1* (encoding G<sub>D3</sub> synthase), *ST8SIA5* (encoding G<sub>T3</sub> synthase), and *B4GALNT1* (encoding G<sub>M2</sub>/G<sub>D2</sub> synthase). The mRNA levels for each glycosyltransferase were compared to the amount of G<sub>D3</sub> synthase mRNA in SK-Mel 28 melanoma cells and normalized to the expression of hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) mRNA (Figure 2). Our results confirmed high expression levels of G<sub>M3</sub> and G<sub>D3</sub> synthases in SK-Mel 28 cells (Ruan et al., 1999). The G<sub>M3</sub> and G<sub>T3</sub> synthases were highly expressed in the MDA-MB-231 cell line, compared to the other breast cancer cell lines analyzed. A low level of G<sub>D3</sub> synthase gene expression was observed in MDA-MB-231 cells but not in other cell lines. In contrast, G<sub>M2</sub>/G<sub>D2</sub> synthase was expressed in all the cell lines. Thus, the transcriptional expression levels of glycosyltransferases are in good correlation with the patterns of gangliosides detected by flow cytometry analysis (Figures 1 and 2).

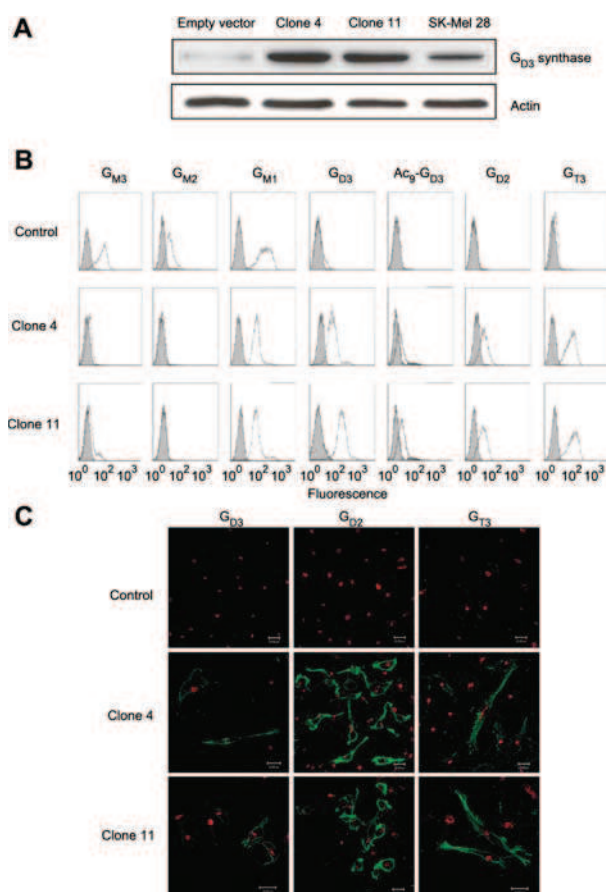
### Establishment of G<sub>D3</sub> synthase-overexpressing MDA-MB-231 breast cancer cells

As cultured breast cancer cell lines do not express G<sub>D3</sub> and as G<sub>M3</sub>, the substrate of the G<sub>D3</sub> synthase, was only detected at the cell surface of MDA-MB-231 cells, we therefore decided to overexpress G<sub>D3</sub> synthase in this cell line. For this purpose, MDA-MB-231 cells were transfected with the pcDNA3-G<sub>D3</sub> synthase expression vector containing the full-length cDNA sequence of human G<sub>D3</sub> synthase or with the empty pcDNA3 vector as a control. Transfected cells were cultured in the presence of 1 mg/ml G418 and after 21 days in the selection medium, individual G418-resistant colonies were isolated by limiting dilution cloning. Twenty different clones were obtained and analyzed for the expression of G<sub>D3</sub> synthase and gangliosides. Two G<sub>D3</sub> positive clones, clone 4 and



**Figure 2** Real-time PCR quantification of glycosyltransferase mRNA involved in G<sub>D3</sub> biosynthesis in breast cell lines. Levels of G<sub>M3</sub> synthase (dark gray bars), G<sub>D3</sub> synthase (black bars), G<sub>T3</sub> synthase (light gray bars) and G<sub>D2</sub> synthase (white bars) mRNA were expressed relative to the amount of G<sub>D3</sub> synthase mRNA in SK-Mel 28 melanoma cells, which was regarded as 100%. Results were normalized to the expression of HPRT mRNA. The quantification was performed by the method described by Livak and Schmittgen (2001).

clone 11, overexpressing G<sub>D3</sub> and b-series gangliosides at the cell surface were selected. As shown in Figure 3A, immunoblotting analysis revealed an equivalent increase of G<sub>D3</sub> synthase protein in the selected clones compared to control (empty vector-transfected cells). Moreover, the levels of G<sub>D3</sub> synthase were higher in both clones than in the positive control SK-Mel 28 cells. The expression pattern of gangliosides was then monitored by flow cytometry using different anti-ganglioside monoclonal antibodies (mAbs). As expected, the two selected clones



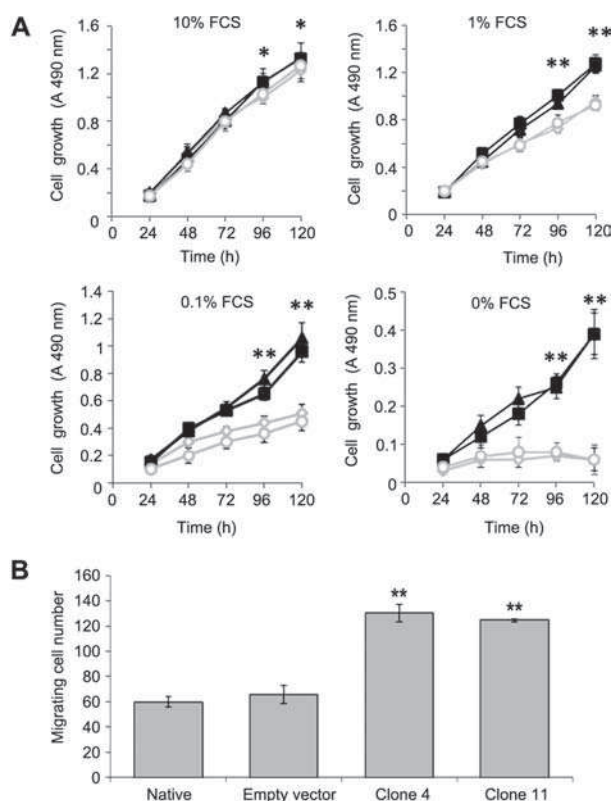
**Figure 3** Expression of human G<sub>D3</sub> synthase and G<sub>D3</sub> ganglioside in MDA-MB-231 cells stably transfected with pcDNA3-G<sub>D3</sub> synthase vector.

(A) Detection of G<sub>D3</sub> protein by Western blotting analysis. A total of 30 µg of total protein was subjected to SDS-PAGE. Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane, which was subsequently incubated with the anti-G<sub>D3</sub> synthase antibody. SK-Mel 28 cells were used as a positive control for the expression of the human G<sub>D3</sub> synthase and anti-actin was used as a control for total protein amount. Results are from one experiment representative of three independent experiments. (B) Flow cytometry analysis of ganglioside expression. The immunodetection of G<sub>M3</sub>, G<sub>M2</sub>, G<sub>M1</sub>, G<sub>D3</sub>, 9-O-acetyl-G<sub>D3</sub>, G<sub>D2</sub>, and G<sub>T3</sub> was performed as described in the materials and methods section. The gray peaks correspond to negative controls with a non-relevant mouse IgM or IgG<sub>K</sub>, whereas white peaks correspond to the signal observed after incubation with the different anti-ganglioside antibodies. Results are from one experiment representative of four independent experiments. (C) Analysis of ganglioside expression at the cell surface by immunocytochemistry and confocal microscopy. Gangliosides were identified with specific mAbs and anti-mouse IgM or anti-mouse IgG labeled with Alexa 488. Golgi was stained with anti-Giantin and anti-rabbit IgG labeled with Alexa 546. Bars: 20 µm.

expressed high levels of b-series gangliosides ( $G_{D3}$ ,  $G_{D2}$ ) and c-gangliosides ( $G_{T3}$ ), and also a low amount of 9-O-acetyl- $G_{D3}$ . In contrast,  $G_{M3}$ ,  $G_{M2}$ , and  $G_{M1}$  expression levels were reduced (Figure 3B).  $G_{D3}$  expression appeared to be slightly higher in clone 11 than in clone 4. Importantly, empty vector-transfected control cells showed no change in the ganglioside profile compared to the native cells (Figures 1 and 3B). Finally, immunofluorescence and confocal microscopy confirmed that  $G_{D3}$  and the other gangliosides were expressed at the cell surface of both clones (Figure 3C).

### Growth and migration of $G_{D3}$ synthase-overexpressing MDA-MB-231 cells

Cell growth was determined by MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] assay in culture media containing different concentrations of serum. As shown in Figure 4A,



**Figure 4** Effects of  $G_{D3}$  synthase overexpression on growth and migration of MDA-MB-231 cells.

(A) Growth assay on standard monolayer plates. Two  $G_{D3}$  synthase gene transfectants, clone 4 (■) and clone 11 (▲), and control cells including native (○) and empty vector-transfected cells (◇) were cultured in DMEM medium with different concentrations of FCS for 5 days. Cell growth was determined by MTS assay. Each measurement was performed in 16 wells and data are mean of four independent manipulations. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ,  $G_{D3}$  synthase-overexpressing cells versus empty vector transfected cells. (B) Cell migration analysis. Cells were seeded in the upper surface of Transwells and cultured for 6 h in DMEM medium supplemented with 0.1% FCS. The number of cells passing through the filter was determined by counting the number of cells on the down side of the filter in ten microscopic fields (20 $\times$ ) per sample. The results are mean of triplicates and representative of three independent experiments. \*\* $p < 0.01$ ,  $G_{D3}$  synthase-overexpressing cell lines (clones 4 and 11) versus control cells.

growth of control (native and empty vector-transfected) cells was decreased with serum concentration and even arrested when cells were cultured in serum-free medium. In contrast,  $G_{D3}$  overexpressing cells proliferated with similar growth rate independent of the serum concentration. Similar results were obtained by direct cell counting experiments (data not shown). When cell migration was evaluated using Transwell Boyden chambers,  $G_{D3}$  synthase overexpression induced twice as much cell migration to the bottom chamber than did control cells (Figure 4B). Such an increase in migration was not due to differences in cell proliferation as no difference in cell number was observed after 6 h of culture in medium containing 0.1% fetal calf serum (FCS, data not shown).

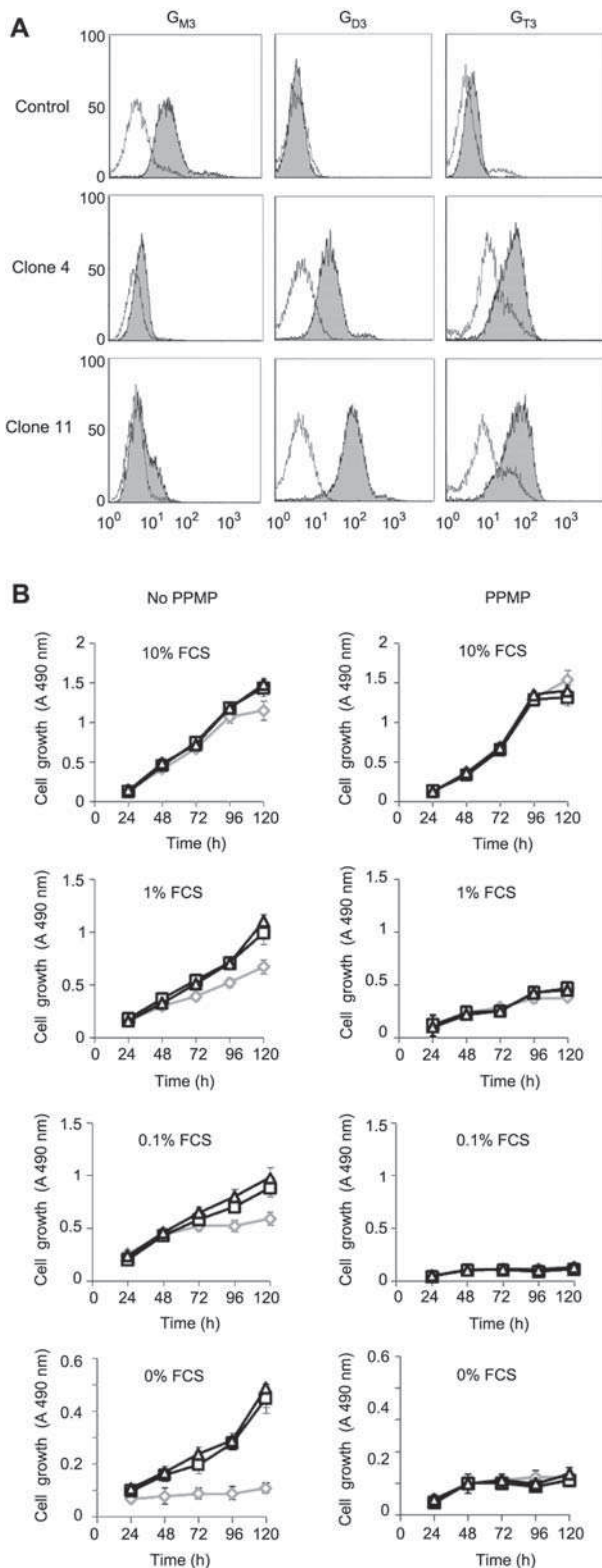
### Effect of ganglioside biosynthesis inhibition on cell growth

In order to clearly correlate the phenotypical changes with the modification of ganglioside pattern in  $G_{D3}$  synthase overexpressing cells, we inhibited ganglioside biosynthesis using D,L-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol (PPMP), a chemical glucosylceramide synthase inhibitor. As shown in Figure 5A, after 5 days of treatment with 10  $\mu$ M PPMP,  $G_{M3}$  was no longer detected at the surface of control cells. In  $G_{D3}$  synthase overexpressing MDA-MB-231 cells,  $G_{D3}$  was no longer detected and  $G_{T3}$  expression was also highly reduced. When cell growth was analyzed by MTS assay, no difference was observed between  $G_{D3}$  synthase overexpressing cells and control cells (Figure 5B), indicating that the inhibition of ganglioside synthesis by PPMP efficiently abolished the high proliferative capacity of  $G_{D3}$  synthase overexpressing cells.

### Discussion

Gangliosides have crucial roles in normal process, such as embryogenesis (Yamashita et al., 1999), as well as in pathological conditions, including atherosclerosis, neurodegenerative disorders, and tumor progression (Prokazova and Bergelson, 1994; Birklé et al., 2003; Ariga et al., 2008). Especially,  $G_{D3}$  expression has been correlated to neuro-ectoderm derived melanoma and neuroblastoma cancer development. However, the expression of gangliosides in breast cancer is poorly documented. A clinical study has shown that  $G_{D3}$  and 9-O-acetyl- $G_{D3}$  are overexpressed in invasive ductal breast carcinoma, the major type of malignant breast tumor (Marquina et al., 1996), but nothing is known about involvement of disialogangliosides in breast cancer progression or aggressiveness.

As a first step towards the understanding of potential implication of  $G_{D3}$  in the biology of breast cancer cells, we analyzed the expression of gangliosides and related glycosyltransferase genes in five routinely used breast cancer cell lines. Our results have shown that established breast cancer cell lines (i.e., MDA-MB-231, MCF-7, T47-D, and BT-20) express gangliosides from a-series, mainly  $G_{M1}$ , and that  $G_{M3}$  was only observed at the cell surface of metastatic MDA-MB-231 cells. Moreover,  $G_{D3}$ , 9-O-acetyl- $G_{D3}$  and  $G_{D2}$  were not detected in any cell line.



These results are in agreement with the data from Nohara et al. (1997), who have shown by high performance thin layer chromatography analysis and resorcinol revelation that gangliosides in MDA-MB-231 and MCF-7 cells belong to a-series gangliosides (i.e., G<sub>M3</sub>, G<sub>M2</sub>, and G<sub>M1</sub>), G<sub>M3</sub> being approximately 18-fold more expressed in MDA-MB-231 compared to MCF-7. The expression of G<sub>M3</sub> at the cell surface of MDA-MB-231 is also correlated with the relative high transcriptional expression of the

**Figure 5** Effects of ganglioside biosynthesis inhibition by PPMP.

(A) Influence of PPMP on ganglioside expression level. Control cells and clones were cultured during 5 days in complete DMEM medium supplemented or not with 10  $\mu$ M PPMP. Cells were then harvested and incubated with anti-G<sub>M3</sub>, anti-G<sub>D3</sub>, and anti-G<sub>T3</sub> antibodies. The gray peaks correspond to MDA-MB-231 cells cultured in the absence of PPMP, whereas white peaks correspond to cells cultured in the presence of PPMP. (B) Influence of PPMP on cell proliferation. Cells were seeded in 96-well plates as described in the materials and methods section. MDA mock ( $\diamond$ ), clone 4 ( $\square$ ), and clone 11 ( $\triangle$ ) were cultured in DMEM medium in the absence (left panel) or in the presence (right panel) of 10  $\mu$ M PPMP for 5 days. Cell growth was then analyzed by MTS assay. Each measurement was performed in 16 wells and data are the mean of two independent manipulations.

ST3GAL5 gene in these cells as revealed by real-time PCR analysis, compared to other cell lines, in which G<sub>M3</sub> is mainly converted into G<sub>M1</sub>. It is interesting to note that MDA-MB-231 cells, which are strongly invasive and induce tumor formation in severe combined immunodeficiency (SCID) mice, express G<sub>M3</sub>, while the weakly invasive cancer cells MCF-7, T47-D, and BT-20 do not.

From our results, it appears that ganglioside expression in human breast cancer cell lines is quite different from breast cancer tumors. The amount of gangliosides in breast tumors or in sera from breast cancer patients is usually significantly higher compared to healthy individuals (Wiesner and Sweeley, 1995; Marquina et al., 1996) and G<sub>M3</sub> and G<sub>D3</sub> are the major gangliosides detected in breast cancer tissues (Marquina et al., 1996). Moreover, 9-O-acetyl-G<sub>D3</sub>, a fetal brain ganglioside, was shown to be re-expressed in breast tumors but was not detected in any breast cancer cell lines (Marquina et al., 1996). Such difference in glycoconjugates expression between cultured cancer cell lines and tumors have already been described, especially for sialyl-Tn antigen in breast or colon cancer (Brockhausen et al., 1998; Julien et al., 2001) and could reflect a progressive loss of breast cancer cell capacity to produce such glycosphingolipids in *in vitro* culture conditions.

In order to study the effect of the G<sub>D3</sub> on the biological features of breast cancer cells, we have generated G<sub>D3</sub>-positive clones from MDA-MB-231 cells by stable transfection of the full-length cDNA of human G<sub>D3</sub> synthase. Two clones were selected according to the expression of G<sub>D3</sub> synthase and G<sub>D3</sub>. The selected clones exhibited similar ganglioside profiles, with an overexpression of b- (G<sub>D3</sub>, G<sub>D2</sub>) and c-series (G<sub>T3</sub>) gangliosides, and a down-regulation of a-series (G<sub>M3</sub>, G<sub>M2</sub>, and G<sub>M1</sub>). G<sub>D3</sub> is located at a metabolic crossroad in the biosynthesis of gangliosides. Consequently, the steady-state of G<sub>D3</sub> is dependent on the competition between the G<sub>D3</sub> synthase (ST8Sia I), G<sub>T3</sub> synthase (ST8Sia V), and the G<sub>M2</sub> synthase ( $\beta$ 4-GalNAc T1). In our model, a part of G<sub>D3</sub> is converted to G<sub>T3</sub> by the endogenous G<sub>T3</sub> synthase (ST8Sia V) and to G<sub>D2</sub> by the action of  $\beta$ 4-GalNAc T1, but the expression level of G<sub>D3</sub> synthase is sufficient to allow the expression of G<sub>D3</sub> at the cell surface of both clones. Interestingly, we only detected a low amount of 9-O-acetyl-G<sub>D3</sub> derivative in these clones, whereas that compound is known to be well expressed in breast tumors. It has been previously

shown that  $G_{D3}$  synthase overexpression leads to a marked change in the ganglioside pattern of a variety of cell types including pheochromocytoma cells (Fukumoto et al., 2000), neural progenitor cell line (Yanagisawa et al., 2004), murine fibroblastic cells (Kamimura et al., 2005), vascular smooth muscle cells (Moon et al., 2006), or small lung cancer cells (Yoshida et al., 2001). In these different cell types, the overexpression of  $G_{D3}$  synthase leads to the expression of b- and c-series gangliosides including oncofetal markers  $G_{D3}$ ,  $G_{D2}$ , and  $G_{T3}$ .

We are the first to show that the  $G_{D3}$  synthase overexpression stimulates both migration and cell proliferation in breast cancer cells. Moreover, the inhibition of ganglioside biosynthesis using PPMP completely abolishes the  $G_{D3}$  synthase-induced cell proliferation, indicating that the expression of b- and c-series gangliosides is responsible for the increased cell proliferation. Our results suggest that  $G_{D3}$  synthase overexpression may contribute to increase the malignant properties of breast cancer cells. This is in agreement with data obtained in other models including melanoma and lung cancer cells (Yoshida et al., 2001; Hamamura et al., 2005; Ko et al., 2006; Furukawa et al., 2008). Although the mechanisms by which  $G_{D3}$  enhances the malignant phenotype of cancer cells remain to be elucidated, it has been shown that in melanoma cells, the majority of  $G_{D3}$  was present in lipid raft (Nakashima et al., 2007) and dispersion of  $G_{D3}$  from lipid rafts reduces the malignant properties of melanoma cells. Moreover, membrane gangliosides, such as  $G_{D3}$ , can interact with integrin or focal adhesion kinase (FAK) to activate the downstream signaling molecules p130Cas and paxillin, the famous adaptors playing a key role in cell proliferation and migration (Furukawa et al., 2008). Similarly, overexpression of  $G_{D3}$  synthase in PC12 cells leads to a continuous phosphorylation of neurotrophins receptor TrkA and the activation of ERK pathway, without nerve growth factor (NGF) treatment (Fukumoto et al., 2000). MDA-MB-231 cells are known to express several growth factor receptors, including TrkA and p75<sup>NTR</sup> (Dollé et al., 2004) and the mitogenic effect of NGF on breast cancer cells required the tyrosine kinase activity of TrkA as well as the MAP kinase cascade (Descamps et al., 2001). Moreover, it has been recently demonstrated that the overexpression of TrkA increases tumorigenicity of MDA-MB-231 cells (Lagadec et al., 2009). It is therefore reasonable to assume that membrane  $G_{D3}$  might interact with different growth factor receptors, including TrkA, to amplify their signalization. This might explain why  $G_{D3}$  synthase overexpression renders MDA-MB-231 cells independent of serum for growth in culture. Further studies are needed to determine the precise underlying mechanisms as well as the incidence of  $G_{D3}$  overexpression in breast cancer development.

## Materials and methods

### Antibodies

Anti-ST8Sia I antibody ab37806 (chicken IgY) and anti-Giantin (rabbit IgG) were purchased from Abcam (Cambridge, UK). The rabbit polyclonal IgG anti-actin was from Santa Cruz Biotechnology (Berghheim, Germany). Anti-chicken IgY and anti-rabbit

IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP) were purchased from GE Healthcare (Templemars, France). Anti- $G_{M3}$  mAb GMR6 (mouse IgM), anti- $G_{M2}$  mAb MK2-34 (mouse IgM), anti-Ac9- $G_{D3}$  mAb GMR2 (mouse IgM), and anti- $G_{D2}$  mAb S220-51 (mouse IgG3) were from Seikagaku Biobusiness Corporation (Tokyo, Japan). Anti- $G_{D3}$  mAb R24 (ab 11779) was purchased from Abcam. Anti- $G_{T3}$  was kindly provided by Pr. J. Portoukalian (Department of Transplantation and Clinical Immunology, Claude Bernard University and Edouard Herriot Hospital, Lyon, France). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated cholera toxin B subunit from *Vibrio cholerae* was from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and FITC-conjugated sheep anti-mouse IgG was from GE Healthcare. FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgM, Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 donkey anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 anti-mouse IgM ( $\mu$  chain) and Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 donkey anti-rabbit IgG (H+L) were purchased from Molecular Probes Invitrogen (Cergy Pontoise, France).

### Cell culture

Cell culture reagents were purchased from Lonza (Levallois-Perret, France). The melanoma cell lines GM95 and MEB4 were a generous gift from Dr. H. Sprong (Membrane Enzymology, Bijvoet Center and Institute of Biomembranes, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands). The human melanoma cells SK-Mel 28 and the breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MCF-7, T-47D, and BT-20) were obtained from the American Type Cell Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). All these cells were routinely grown in monolayer cultures and maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin-streptomycin. The non-tumorigenic epithelial cell line MCF10A was obtained from ATCC and was cultured in DMEM/F12 (1/1) medium containing 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin-streptomycin, 45  $\mu$ g/ml gentamycin, 5  $\mu$ g/ml cortisol, 2 ng/ml epidermal growth factor, 100 ng/ml cholera toxin.

### Reverse transcription and real-time polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from the different cell lines using the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel, Hoerd, France). The amount of extracted RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and the purity of the RNA was checked by the ratio of the absorbance at 260 and at 280 nm. Then, 2  $\mu$ g of purified total RNA was subjected to reverse transcription with the First Strand cDNA Synthesis kit (GE Healthcare), following the manufacturer's instructions. For PCR reactions, cDNAs obtained after reverse transcription were diluted 1:5. PCR reactions were performed for five glycosyltransferases genes and for the housekeeping gene HPRT (Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase), which was used as an endogenous control to normalize variations in RNA extractions, the degree of RNA degradation, and in RT efficiency (Table 1). PCR primers for  $G_{D3}$  synthase and  $G_{T3}$  synthase cDNA amplification were designed using Primer Premier 3.1 software (Biosoft International, Palo Alto, CA, USA). The primer sequences for  $G_{M3}$  synthase,  $G_{M2}/G_{D2}$  synthase, and HPRT were previously described (Garcia-Vallero et al., 2006; Oblinger et al., 2006; Zhang et al., 2005). All the primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). PCR reactions (25  $\mu$ l) were performed using 2 $\times$  SYBR<sup>®</sup> Green Universal QPCR Master Mix (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands), with 2  $\mu$ l of a 1:5 cDNA dilution and 300 nM final concentration of each primer. PCR conditions were as follows: 95°C for 30 s, 51°C for 45 s, 72°C for 30 s (40 cycles). Data were analyzed using the MX4000 PCR system software (Stratagene). To quantify the

**Table 1** Primer pairs used for real-time PCR experiments.

Gene	GenBank accession no.	Sense primer Antisense primer	T <sub>m</sub> (°C)	PCR product size (bp)
<i>HPRT</i>	NM_000194	5'-GACCAGTCAACAGGGGACAT-3' 5'-AACACTTCGTGGGGTCCTTTTC-3'	51	195
<i>ST3GAL5</i>	NM_003896	5'-ATCGGTGTCATTGCCGTTGT-3' 5'-TTCATAGCAGCCATGCATTGA-3'	51	131
<i>ST8SIA1</i>	NM_003034	5'-GAACAGAGCCATCTTTGAGG-3' 5'-AGAAGTTTCCAATGCTACGC-3'	51	105
<i>ST8SIA5</i>	NM_013305	5'-GCCTGGGTTATGTCTTAGTC-3' 5'-GCTGGTTTGGTTTATTCCT-3'	51	147
<i>B4GALNT1</i>	NM_001478	5'-CAGCGCTCTAGTCACGATTGC-3' 5'-CCACGGTAACCGTTGGGTAG-3'	51	120

results, we used the comparative threshold cycle method described by Livak and Schmittgen (2001). Serial dilutions of the appropriate positive control cDNA sample were used to create standard curves for relative quantification, and glycosyltransferase transcripts were then normalized to HPRT expression. In all experiments, negative control reactions were performed by replacing cDNA templates by sterile water or corresponding total RNA samples.

### Stable transfection

The cDNA encoding the full length human G<sub>D3</sub> synthase was inserted into the HindIII and XhoI restriction sites of pcDNA3 expression vector (Invitrogen) (Kang et al., 2007). Plasmid purification was carried out using a HiSpeed Plasmid Purification Midi kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's instructions. Transfection of MDA-MB-231 cells was performed by electroporation using the Nucleofection technology according to Amaxa Biosystems protocol (Lonza). Briefly, 1×10<sup>6</sup> cells were resuspended in 100 μl of Cell Line Nucleofector™ Solution V and cell suspension was mixed with 2 μg of pcDNA3 or pcDNA3-G<sub>D3</sub> synthase vector. The sample was transferred into an electroporation cuvette and transfection was performed using the program X-013 according to the manufacturer's instructions. Immediately after nucleofection, cells were transferred into pre-warmed complete DMEM medium and maintained for 48 h at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. After incubation, the transfected cells were cultured in the presence of 1 mg/ml G418 (Invitrogen). After 21 days in the selective medium, individual G418-resistant colonies were isolated by limit dilution. Two positive clones, which expressed high levels of G<sub>D3</sub> synthase and G<sub>D3</sub> ganglioside as determined by real-time PCR and flow cytometry analysis, respectively, were used for further study.

### Immunoblotting

Subconfluent cell cultures were harvested by scraping in phosphate-buffered saline (PBS) and were subjected to centrifugation (10 000 g, 5 min). The pellets were treated with lysis buffer [150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100 and protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Meylan, France)], and boiled for 10 min at 100°C. After centrifugation (10 000 g, 5 min), the supernatants were assessed for protein concentration using the bicinchoninic acid method (Thermo Scientific Pierce Protein Research, Brebières, France). Then, 30 μg of total proteins from each cell lysate was subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred on a nitrocellulose membrane (200 mA, 2 h). Efficiency of transfer and relative equal loading were checked with Ponceau staining. Non-specific protein binding sites were saturated for 1 h at room temperature in Tris-buffered saline (TBS) containing 0.05%

Tween 20 (TBST) containing 5% (w/v) non-fat dry milk. Membranes were then incubated overnight at 4°C with the anti-ST8Sial antibody (diluted 1:2000) or with the anti-actin (1:10 000) antibody, which is used as a control for total protein amount. The membranes were rinsed three times with TBST and they were then incubated at room temperature for 1 h with a horseradish peroxidase-conjugated anti-chicken or anti-rabbit secondary antibody. The membranes were rinsed three times in TBST and the revelation was achieved by chemiluminescence using the ECL-Plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) with Kodak film (GE Healthcare).

### Flow cytometry analysis

Cells detached by 4 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) in PBS were incubated for 1 h at 4°C with various anti-gangliosides mAbs: anti-G<sub>M3</sub> (1:75), anti-G<sub>M2</sub> (1:100), anti-G<sub>D3</sub> (1:100), anti-Ac9-G<sub>D3</sub> (1:75), anti-G<sub>D2</sub> (1:100), and anti-G<sub>T3</sub>, all diluted in PBS containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich). After washing with PBS containing 0.5% BSA, cells were incubated for 1 h on ice with FITC-conjugated anti-mouse IgM or IgG. To analyze G<sub>M1</sub> expression, cells were incubated with a FITC-conjugated cholera toxin B subunit from *Vibrio cholerae* (1:1000). Control experiments were performed using appropriate isotype controls, as well as secondary antibodies alone. Cells were then subjected to flow cytometry analysis using a FACScalibur instrument from Becton Dickinson (Le Pont de Claix, France).

### Immunocytochemistry and confocal microscopy

Cells were cultured on glass coverslips precoated with 1% type I collagen (Sigma-Aldrich). Cells were washed twice with PBS and then fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min at room temperature. After quenching with 50 mM ammonium chloride in PBS (10 min at room temperature), cells were blocked in a permeabilizing buffer [PBS pH 7.5 containing 0.1% saponin (Sigma-Aldrich) and 0.2% BSA: blocking buffer] for 30 min. Cells on coverslips were subsequently incubated for 1 h at room temperature with anti-G<sub>D3</sub> (1:100), anti-Ac9-G<sub>D3</sub> (1:100), anti-G<sub>T3</sub> (1:10), or anti-G<sub>D2</sub> (1:100) antibodies diluted in blocking buffer. After three washes of 5 min with the blocking buffer, cells were incubated with Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) and Alexa Fluor® 488 anti-mouse IgM μ chain (1 h at room temperature; dilution 1:2000 in blocking buffer). Cells were washed three times in permeabilizing buffer, one time with PBS, then with deionized water, and finally mounted in Mowiol® (Sigma-Aldrich). Golgi was stained for all coverslips with anti-Giantin (1:1000) and anti-rabbit IgG labeled with Alexa 546 (1:4000) antibodies. Stained slides were examined under a Zeiss LSM 510 confocal microscope (488 nm excitation for Alexa Fluor® 488 and 563 nm for Alexa Fluor® 546).

The image acquisition characteristics (laser intensity, scan speed, etc.) were the same throughout the experiments to ensure the comparability of the results and to allow the comparison of the fluorescence levels. The intensity of the signals was directly quantified on the confocal microscope with LSM examiner software (AIM 3.2; Zeiss, Le Pecq, France).

### Proliferation assays

Cell growth was analyzed using MTS reagent (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's directions. Control and clone cells ( $2 \times 10^3$ ) were seeded in 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Germany) and grown in culture media containing 10%, 1%, 0.1% FCS, or in FCS-free medium. Cell numbers were estimated after 0, 24, 48, 72, and 96 h by adding MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] to the wells 2 h before taking the spectrophotometric reading (absorbance at 490 nm).

### Cell migration analysis

Cells ( $5 \times 10^4$ ) were seeded in the upper surface of Transwell 12-well plates (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and cultured for 6 h in 0.1% FCS-containing medium. After incubation, cells were fixed with cold methanol (10 min at room temperature) and stained with Hoechst 33528 (Sigma-Aldrich) (20 min in the dark). Then, the upper chamber of the well's porous membrane was removed by scraping with a cotton swab and was washed several times with PBS. The membrane was mounted on a slide with Glycergel mounting medium (Dako, Trappes, France). The number of migrating cells was counted in 10 fields under  $200\times$  magnification and the mean of the number of cells in each field was evaluated. Cell migration analysis was carried out in triplicate.

### Chemical inhibition of glucosylceramide synthase and proliferation assays

PPMP was obtained from Sigma-Aldrich. The ability of PPMP to specifically silence ganglioside biosynthesis was evaluated during 7 days to define the optimal conditions for ganglioside expression inhibition. Cells were treated with  $10 \mu\text{M}$  PPMP for 5 days in DMEM supplemented with 10% FCS. No cell toxicity (by trypan blue assay) was observed upon 5 days of culture. These conditions were used for the quantification of ganglioside biosynthesis and cell proliferation as described above.

### Statistical analyses

Student's *t*-test was used for statistical analysis. A *p*-value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

### Acknowledgments

We thank Pr. Jacques Portoukalian (Department of Transplantation and Clinical Immunology, Claude Bernard University and Edouard Herriot Hospital, Lyon, France) for the kind gift of Anti-G<sub>T3</sub> mAb. This work was supported by the University of Sciences and Technologies of Lille, the Association pour la Recherche sur le Cancer (Grant no. 7936), La Ligue régionale contre le Cancer, and the PAI Hubert Curien France-Korea STAR.

### References

Ariga, T., McDonald, M.P., and Yu, R.K. (2008). Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* 49, 1157–1175.

- Birklé, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R.K., and Aubry, J. (2003). Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* 85, 455–463.
- Brockhausen, I., Yang, J., Dickinson, N., Ogata, S., and Itzkowitz, S.H. (1998). Enzymatic basis for sialyl-Tn expression in human colon cancer cells. *Glycoconj. J.* 15, 595–603.
- Descamps, S., Toillon, R.A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S.M., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J.P., and Hondermarck, H. (2001). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 17864–17870.
- Dollé, L., Adriaenssens, E., El Yazidi-Belkoura, I., Le Bourhis, X., Nurcombe, V., and Hondermarck, H. (2004). Nerve growth factor receptors and signaling in breast cancer. *Curr. Cancer Drug Targets* 4, 463–470.
- Fukuda, M. (1996). Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res.* 56, 2237–2244.
- Fukumoto, S., Mutoh, T., Hasegawa, T., Miyazaki, H., Okada, M., Goto, G., Furukawa, K., Urano, T., and Furukawa, K. (2000). GD3 synthase gene expression in PC12 cells results in the continuous activation of TrkA and ERK1/2 and enhanced proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 5832–5838.
- Furukawa, K., Hamamura, K., Nakashima, H., and Furukawa, K. (2008). Molecules in the signaling pathway activated by gangliosides can be targets of therapeutics for malignant melanomas. *Proteomics* 8, 3312–3316.
- Garcia-Vallero, J.J., Gringhuis, S.I., Van Dijk, W., and Van Die, I. (2006). Gene expression analysis of glycosylation-related genes by real-time polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* 347, 187–209.
- Hakomori, S. (1996). Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res.* 56, 5309–5318.
- Hakomori, S. (2001). Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 491, 369–402.
- Hamamura, K., Furukawa, K., Hayashi, T., Hattori, T., Nakano, J., Nakashima, H., Okuda, T., Mizutani, H., Hattori, H., Ueda, M., et al. (2005). Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11041–11046.
- Harduin-Lepers, A., Krzewinski-Recchi, M.A., Samyn-Petit, B., Vallejo-Ruiz, V., Julien, S., and Delannoy, S. (2001). The human sialyltransferases family. *Biochimie* 83, 727–737.
- Hebbar, M., Krzewinski-Recchi, M.A., Hornez, L., Verdière, A., Harduin-Lepers, A., Bonnetterre, J., Delannoy, P., and Peyrat, J.P. (2003). Prognostic value of tumoral sialyltransferases expression and circulating E-selectin concentrations in node-negative breast cancer patients. *Int. J. Biol. Markers* 18, 116–122.
- Ichikawa, S., Nakajo, N., Sakiyama, H., and Hirabayashi, Y. (1994). A mouse B16 melanoma mutant deficient in glycolipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2703–2707.
- Julien, S., Krzewinski-Recchi, M.A., Harduin-Lepers, A., Gouyer, V., Huet, G., Le Bourhis, X., and Delannoy, P. (2001). Expression of sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac:GalNAc  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I) cDNA. *Glycoconj. J.* 18, 883–893.
- Kamimura, Y., Furukawa, K., Kittaka, D., Nishio, M., Hamamura, K., Fukumoto, S., and Furukawa, K. (2005). Differential enhancing effects of alpha 2,8-sialyltransferase on the cell proliferation and mobility. *Int. J. Oncol.* 26, 337–344.
- Kang, N.Y., Kim, C.H., Kim, K.S., Ko, J.H., Lee, J.H., Jeong, Y.K., and Lee, Y.C. (2007). Expression of the human CMP-NeuAc:GM3 alpha2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) gene through the NF- $\kappa$ B activation in human melanoma SK-MEL-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 622–630.
- Ko, K., Furukawa, K., Takahashi, T., Urano, T., Sanai, Y., Nagino, M., Nimura, Y., and Furukawa, K. (2006). Fundamental study of small interfering RNAs for ganglioside GD3 synthase gene



- as a therapeutic target of lung cancers. *Oncogene* 25, 6924–6935.
- Lagadec, C., Meignan, S., Adriaenssens, E., Foveau, B., Vanhecke, E., Romon, R., Toillon, R.A., Oxombre, B., Hondermarck, H., and Le Bourhis, X. (2009). TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene*, in press.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402–408.
- Malisan, F. and Testi, R. (2005). The ganglioside GD3 as the Greek goddess Hecate: several faces turned towards as many directions. *IUBMB Life* 57, 477–482.
- Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L.E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., Perez, R., and Ando, S. (1996). Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res.* 56, 5165–5171.
- Modak, S. and Cheung, N.K. (2007). Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma. *Cancer Invest.* 25, 67–77.
- Moon, S.K., Kang, S.K., and Kim, C.H. (2006). Reactive oxygen species mediates disialoganglioside GD3-induced inhibition of ERK1/2 and matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *FASEB J.* 20, 1387–1395.
- Nakashima, H., Hamamura, K., Houjou, T., Taguchi, R., Yamamoto, N., Mitsudo, K., Tohnai, I., Ueda, M., Urano, T., Furukawa, K., et al. (2007). Overexpression of caveolin-1 in a human melanoma cell line results in dispersion of ganglioside GD3 from lipid rafts and alteration of leading edges, leading to attenuation of malignant properties. *Cancer Sci.* 98, 512–520.
- Narita, T., Funahashi, H., Satoh, Y., Watanabe, T., Sakamoto, J., and Takagi, H. (1993). Association of expression of blood group-related carbohydrate antigens with prognosis in breast cancer. *Cancer* 71, 3044–3053.
- Nohara, K., Wang, F., and Spiegel, S. (1997). Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* 48, 49–57.
- Oblinger, J.L., Pearl, D.K., Boardman, C.L., Saqr, H., Prior, T.W., Scheithauer, B.W., Jenkins, R.B., Burger, P.C., and Yates, A.J. (2006). Diagnostic and prognostic value of glycosyltransferase mRNA in glioblastoma multiforme patients. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 32, 410–418.
- Prokazova, N.V. and Bergelson, L.D. (1994). Gangliosides and atherosclerosis. *Lipids* 29, 1–5.
- Recchi, M.A., Harduin-Lepers, A., Boilly-Marer, Y., Verbert, A., and Delannoy, P. (1998a). Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases: application to breast cancer cells. *Glycoconj. J.* 15, 19–27.
- Recchi, M.A., Hebbar, M., Hornez, L., Harduin-Lepers, A., Peyrat, J.P., and Delannoy, P. (1998b). Multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction assessment of sialyltransferases expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 58, 4066–4070.
- Ruan, S., Raj, B.K., and Lloyd, K.O. (1999). Relationship of glycosyltransferases and mRNA levels to ganglioside expression in neuroblastoma and melanoma cells. *J. Neurochem.* 72, 514–521.
- Ruckhäberle, E., Rody, A., Engels, K., Gaetje, R., von Minckwitz, G., Schifmann, S., Grösch, S., Geisslinger, G., Holtrich, U., Karn, T., et al. (2008). Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 112, 41–52.
- Ruckhäberle, E., Karn, T., Rody, A., Hanker, L., Gätje, R., Metzler, D., Holtrich, U., and Kaufmann, M. (2009). Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, Epub ahead of print, DOI: 10.1007/s00432-008-0536-6.
- Sabel, M.S. and Sondak, V.K. (2002). Tumor vaccines: a role in preventing recurrence in melanoma? *Am. J. Clin. Dermatol.* 3, 609–616.
- Soares, R., Marinho, A., and Schmitt, F. (1996). Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters. *Pathol. Res. Pract.* 192, 1181–1186.
- Tettamanti, G. (2004). Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj. J.* 20, 301–317.
- Ura, Y., Dion, A.S., Williams, C.J., Olsen, B.D., Redfield, E.S., Ishida, M., Herlyn, M., and Major, P.P. (1992). Quantitative dot blot analyses of blood-group-related antigens in paired normal and malignant human breast tissues. *Int. J. Cancer* 50, 57–63.
- Wiesner, D.A. and Sweeley, C.C. (1995). Circulating gangliosides of breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 60, 294–299.
- Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., and Proia, R.L. (1999). A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 9142–9147.
- Yanagisawa, M., Liour, S.S., and Yu, R.K. (2004). Involvement of gangliosides in proliferation of immortalized neural progenitor cells. *J. Neurochem.* 91, 804–812.
- Yoshida, S., Fukumoto, S., Kawaguchi, H., Sato, S., Ueda, R., and Furukawa, K. (2001). Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res.* 61, 4244–4252.
- Zeng, G., Gao, L., Birkle, S., and Yu, R.K. (2000). Suppression of ganglioside G<sub>D3</sub> expression in a rat F-11 tumor cell line reduces tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor production. *Cancer Res.* 60, 6670–6676.
- Zeng, G. and Yu, R.K. (2008). Cloning and transcriptional regulation of genes responsible for synthesis of gangliosides. *Curr. Drug Targets* 9, 317–324.
- Zhang, X., Ding, L., and Sandford, A.J. (2005). Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 6, 4.

Received January 21, 2009; accepted March 10, 2009

## **Article 2: G<sub>D3</sub> synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation**

Cet article, proposé en tant que deuxième chapitre, présente une étude approfondie des clones MDA-MB-231 exprimant la G<sub>D3</sub> synthétase. Nous avons pu mettre en lumière les mécanismes moléculaires par lesquels la G<sub>D3</sub> synthétase renforce la tumorigénicité des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. L'activation constitutive des voies de signalisation MEK/Erk et PI3K/Akt est dépendante de la phosphorylation spécifique du récepteur c-Met dans les clones d'intérêt, cultivés en condition de sevrage. L'inhibition de l'activation de c-Met par l'utilisation d'agents pharmacologiques ou par la technique de siRNA permet d'inhiber la prolifération des cellules mammaires G<sub>D3</sub> synthétase positives, démontrant le rôle essentiel de ce récepteur dans les capacités prolifératives des clones. L'agressivité accrue de ce modèle cellulaire a également été démontrée *in vivo* lors d'expériences de xénogreffes chez des souris immunodéprimées. Finalement, une surexpression des gènes *ST8SIA1* et *MET* a été observée dans un sous groupe particulier de tumeurs mammaires : les tumeurs triple négatives. Ces résultats ont été récemment publiés dans le journal *Molecular Cancer Research*.



## **G<sub>D3</sub> synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation**

Aurélie Cazet<sup>1,2,3</sup>, Jonathan Lefebvre<sup>1,4</sup>, Eric Adriaenssens<sup>1,4</sup>, Sylvain Julien<sup>5</sup>, Marie Bobowski<sup>1,2,3</sup>, Anita Grigoriadis<sup>6</sup>, Andrew Tutt<sup>6</sup>, David Tulasne<sup>1,4</sup>, Xuefen Le Bourhis<sup>1,7</sup> and Philippe Delannoy<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> USTL, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>3</sup> CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>4</sup> CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

<sup>5</sup> Breast cancer Biology Group, Guy's Hospital, King's Health Partners AHSC, London, UK

<sup>6</sup> Breakthrough Breast Cancer Research Unit, Guy's Hospital, King's Health Partners AHSC, London, UK

<sup>7</sup> INSERM U908, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

\* Correspondence should be addressed to Philippe Delannoy, at Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576, University of Sciences and Technologies of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel: +33 320 43 69 23, Fax: +33 320 43 65 55, e-mail: [philippe.delannoy@univ-lille1.fr](mailto:philippe.delannoy@univ-lille1.fr)

Running title: G<sub>D3</sub> synthase induces the constitutive activation of c-Met

**Abstract:**

The disialoganglioside  $G_{D3}$  is over-expressed in about 50 % of invasive ductal breast carcinoma and the  $G_{D3}$  synthase gene (*ST8SIA1*) displayed higher expression among estrogen receptor negative breast cancer tumors, associated with a decreased overall survival of breast cancer patients. However, no relationship between ganglioside expression and breast cancer development and aggressiveness has been reported. We have previously shown that the expression of  $G_{D3}$  synthase induces the accumulation of b- and c-series gangliosides ( $G_{D3}$ ,  $G_{D2}$  and  $G_{T3}$ ) at the cell surface of MDA-MB-231 breast cancer cells together with the acquisition of a proliferative phenotype in absence of serum. Here we show that PI3K/Akt and MEK/ERK pathways are constitutively activated in  $G_{D3}$  synthase expressing cells. Analysis of tyrosine kinase receptors phosphorylation shows a specific c-Met constitutive activation in  $G_{D3}$  synthase expressing cells, in absence of its ligand, the HGF/SF. In addition, inhibition of c-Met or downstream signaling pathways reverses the proliferative phenotype. We also show that  $G_{D3}$  synthase expression enhances tumor growth in severe combined immunodeficiency (SCID) mice. Finally, a higher expression of *ST8SIA1* and *MET* in the basal subtype of human breast tumors are observed. Altogether, our results demonstrate that  $G_{D3}$  synthase expression is sufficient to enhance the tumorigenicity of MDA-MB-231 breast cancer cells through a ganglioside-dependent activation of c-Met receptor.

## Introduction:

Gangliosides, the glycosphingolipids carrying one or more sialic acid residues, are essentially located on the outer leaflet of the plasma membrane in microdomains named “glycosynapse”, where Tyrosine-Kinase Receptors (RTKs) are also located [1]. They are often found in growing and developing tissues and complex gangliosides from b- and c-series, initiated by  $G_{D3}$  or  $G_{T3}$  respectively, are mainly expressed during embryogenesis and restricted to the central nervous system in adult [2]. In mammalian cells, the expression of di- and trisialogangliosides increases in pathological conditions such as cancer and  $G_{D3}$ ,  $G_{D2}$  and  $G_{T3}$  are considered as oncofetal markers in animal and human tumors such as melanoma and neuroblastoma. They play a key role in invasion and metastasis, by mediating cell proliferation, migration, adhesion and angiogenesis [3-5]. The restrictive expression in pathological conditions and the accessibility of gangliosides on the cell surface make them good targets for cancer immunotherapy, as it was well studied in melanoma [6].

Little is known about ganglioside expression in breast cancer. Total ganglioside levels appear to be significantly higher in breast tumors than in normal breast tissues [7]. The gangliosides  $G_{D3}$ , 9-*O*-acetyl- $G_{D3}$  and 9-*O*-acetyl- $G_{T3}$  are absent or expressed at a very low level in normal breast tissues, but are over-expressed in about 50 % of invasive ductal breast carcinoma [7]. Recently, two clinical studies have shown that the  $G_{D3}$  synthase (GD3S) gene (*ST8SIA1*), encoding the key enzyme for the biosynthesis of b- and c-series gangliosides, displayed higher expression among estrogen receptor (ER) negative breast cancer tumors [8] and had a prognostic impact in breast cancer dependently on ER status: *ST8SIA1* gene expression was associated with poor patho-histological grading in ER negative tumors and a reduced overall survival of the patients [9]. In contrast, a better prognosis for ER positive samples with high expression of *ST8SIA1* was noticed [9]. However, no functional relationship between ganglioside expression and breast cancer development and aggressiveness has been reported. We

have recently developed a cellular model deriving from MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the human GD3S. GD3S expressing cells accumulate gangliosides of b- and c-series (i.e.  $G_{D3}$ ,  $G_{D2}$  and  $G_{T3}$ ) at the cell surface. The change in cell membrane ganglioside composition is associated with morphological changes, and increased migration and proliferation in absence of serum or exogenous growth factors. Here we show that proliferative capacity of MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> clones in serum-free medium is directly correlated to the constitutive activation of c-Met receptor and downstream signaling pathways PI3K/Akt and MEK/ERK. Inhibition of either c-Met activity or downstream signaling abrogates proliferation of the GD3S expressing cells. We also show that GD3S expression induces an increased tumor growth in severe combined immunodeficiency (SCID) mice.

## **Material and Methods**

**Antibodies and reagents-** Anti-phosphorylated extracellular signal-regulated kinase ERK (E-4), anti-ERK (K-23), anti-Akt (H-136) and the rabbit polyclonal IgG anti-actin antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-phosphorylated Akt S473 (#9271), the mouse mAb directed against C-terminal region of human c-Met (#3148) and the rabbit polyclonal antibody against phosphorylated tyrosine 1234 and 1235 of c-Met kinase domain were purchased from Cell Signaling Technology. Anti-rabbit and anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase were purchased from GE Healthcare. Alexa Fluor® 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) was purchased from Molecular Probes Invitrogen. U0126, Akt inhibitor VIII, SU11274 and PHA665752 were purchased from Calbiochem® Merck Chemicals Ltd and dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). Human recombinant HGF/SF was purchased from Peprotech.

**Cell Culture-** Cell culture reagents were purchased from Lonza. The breast cancer cell line MDA-MB-231 was obtained from the American Type Cell Culture Collection. These cells

were routinely grown in monolayer cultures and maintained at 37°C in an atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>, in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin-streptomycin. MDA-MB-231 control (empty vector transfected) and MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> clones 4 and 11 were obtained as previously described [10]. The transfected cells were cultured in the presence of 1 mg/mL G418 (Invitrogen).

**RNA interference assays-** Cells were transfected with 20 pmol small interfering RNA (siRNA; Invitrogen) targeting c-Met (*Met7* (stealth) 5' CCAUUUCAACUGAGUUUGCUGUUA 3'; *Met8* (stealth) 5' UCCAGAAGAUCAGUUUCCUAAUUCA 3') or a scrambled sequence using 5 µL Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Cells were transfected with corresponding siRNAs and were collected for cell growth assay or Western Blot analysis 24 h later.

**Proliferation assays-** Cell growth was analyzed using MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] reagent (Promega) according to the manufacturer's directions. For pharmacological inhibition, cells ( $2 \times 10^3$ ) were seeded in 96-wells plates (Thermo Fisher Scientific) and grown in DMEM culture medium containing 0.1 % FBS. After 12 h, the medium was replaced with DMEM serum-free medium containing specific inhibitors: 1 µM U0126, 1 µM Akt inhibitor VIII, 500 nM SU11274 or 100 nM PHA665752. Control cells were treated with DMSO at a 1:1000 dilution. The medium was changed every 2 days. For inhibition with neutralizing antibody against c-Met, cells were cultured during 5 days in DMEM serum-free medium containing 10 µg/mL of 5D5 Fab or control IgG.

For RNA interference assay,  $2 \times 10^3$  cells were seeded in 96-wells plates in DMEM serum-free medium one day after the transfection with siRNA sequences, then cultured during 2 days before assessment of cell growth.



**Migration assay-**  $5 \times 10^4$  cells were seeded and cultured in the upper surface of Transwell-12 well plates (BD Bioscience) for 6 h, as described previously [10]. Specific inhibition was performed with 1  $\mu$ M SU11274 or 200 nM PHA665752. Cells treated with DMSO (1:1000 dilution) were used as control.

**Phospho-RTK array analysis-** Cells were cultured for 48 h in 6-well plates in serum-free DMEM or in DMEM containing 10 % FBS. Cells were then lysed in NP-40 lysis buffer (1 % NP-40, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10 % glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate and protease inhibitor *cocktail* tablet (Roche)). The human Phospho-RTK array kit (R&D Systems) was used according to the manufacturer's protocol.

**Immunoblotting-** Cell pellets were treated with lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 % Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate and protease inhibitor *cocktail* tablet). The supernatants were assessed for protein concentration using the Bio-Rad *RC* protein assay kit II.

For the studies of the MEK/ERK and PI3K/Akt pathways, 20  $\mu$ g of proteins from cell lysate were subjected to SDS-PAGE and transferred on a nitrocellulose membrane. Membranes were saturated in TBS, 0.05 % Tween 20 (TBST) containing either 5 % (w/v) non fat dry milk or 5 % bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Membranes were then incubated overnight at 4°C with the primary antibody, incubated at room temperature for 1 h with a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody. The revelation was achieved by chemiluminescence using the ECL-Plus Western blotting detection reagent (GE Healthcare) with Kodak film.

For the phospho-c-Met and c-Met detection, 100  $\mu$ g of total proteins were subjected to SDS-PAGE. The membranes were then incubated with blocking buffer (0.2 % (v/v) casein, 0.1 % (v/v) Tween-20 dissolved in PBS) for 1 h and probed 1 h at room temperature with appropriate antibodies diluted in blocking buffer according to manufacturer's recommendations. After

washing in PBS-Tween 0.2 %, immune complexes were detected with specific secondary antiserum conjugated with alkaline-phosphatase followed by an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham™ ECL Western Blotting Detection Reagents).

***Tumor growth in SCID mice-*** Female SCID mice were purchased from Pasteur Institute (Lille, France) and acclimatized for at least 2 weeks. Mice were maintained under a 12 h light/dark cycle at a temperature of 20°C to 22°C. Food and water were available *ad libitum*. Mice were maintained in accordance with the Institutional Animal Care and Use Committee procedures and guidelines. The local ethics committee approved the protocol used. MDA-MB-231 control and GD3S<sup>+</sup> cells were harvested and resuspended in phosphate-buffered solution before subcutaneous injection into the flanks of mice (10 mice per group) as previously described [11].

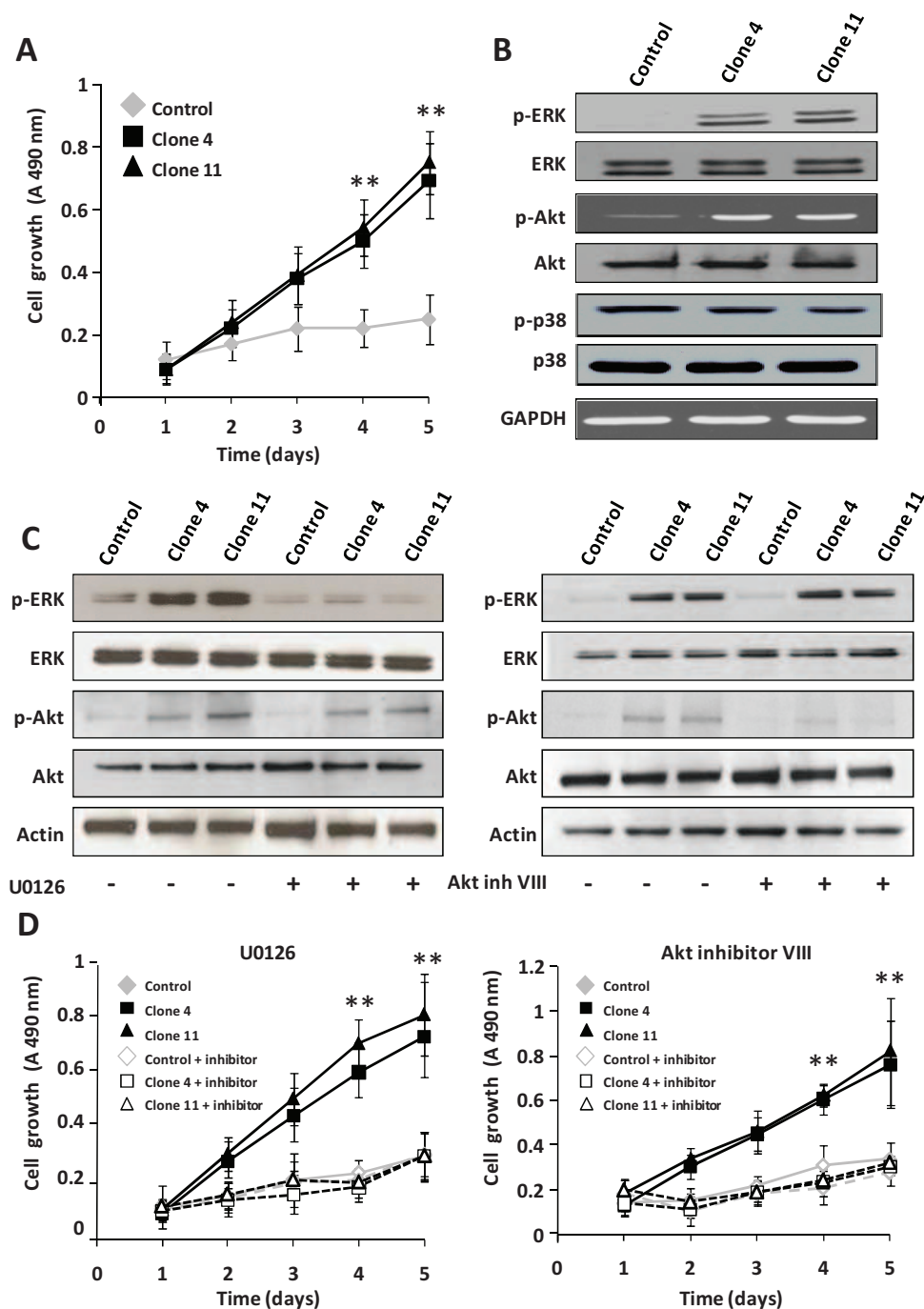
***Statistical analysis*** - Microarray data from two datasets previously published by van de Vijver *et al.* [12] (Agilent platform) and Chin *et al.* [13] (Affymetrix platform) were analyzed using Prism 5 (GraphPad Software). The probes considered for the analysis were UGID Hs.408614 (Agilent) and A.210073\_at (Affymetrix) for *ST8SIA1* and A.203510\_at (Affymetrix) for *MET*. Levels of expression of these genes were compared from one group to another using one-way Anova test. Correlation of gene expression was tested using the Pearson test. Statistical analysis of other results was performed using Student's t test.  $p < 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

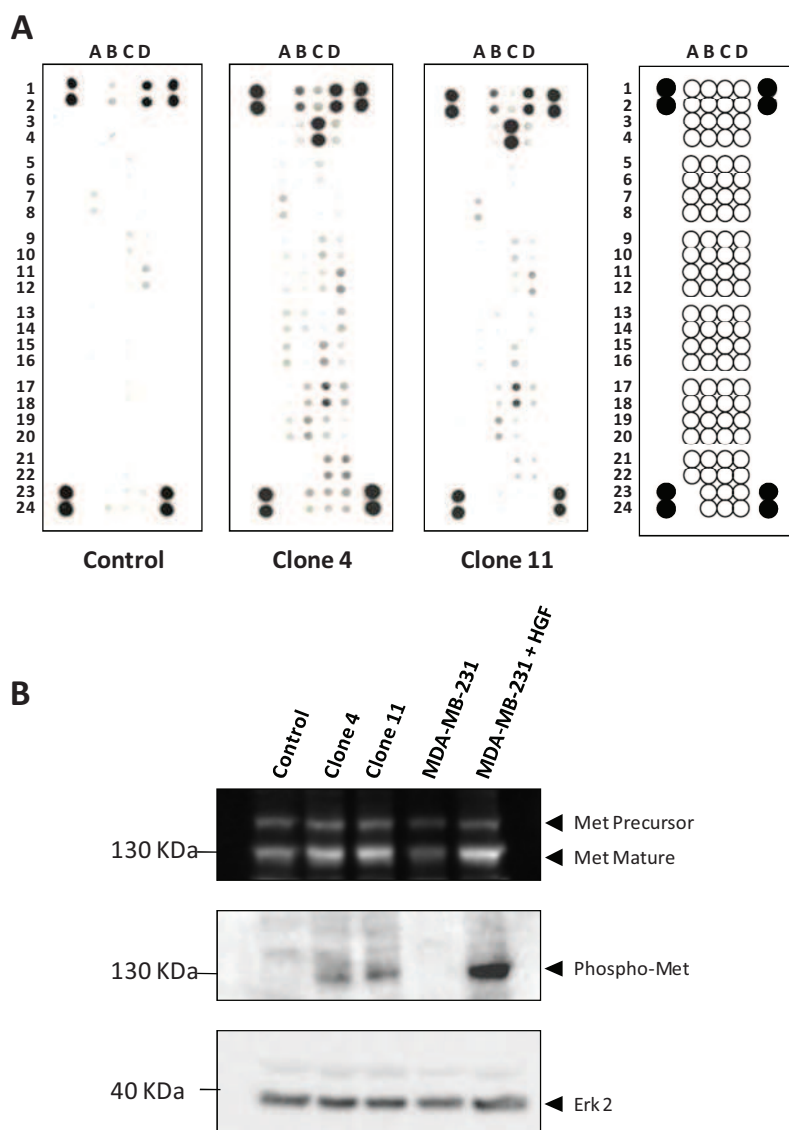
### **GD<sub>3</sub> synthase expression promotes MDA-MB-231 proliferation through the activation of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways.**

To determine the functional importance of the GD3S expression in breast cancer development and aggressiveness, we previously established a cellular model deriving from MDA-MB-231 breast cancer cells expressing GD3S. The selected clones (named clone 4 and 11) express b- and c- series gangliosides such as GD<sub>3</sub>, GD<sub>2</sub> and GT<sub>3</sub> at the cell surface [10]. As shown in Fig. 1A, the modification of the ganglioside pattern of MDA-MB-231 cells was correlated with an increase of cell proliferation capacity in serum-free conditions. After 5 days of culture, the relative number of GD3S<sup>+</sup> cells is about four-fold of control cells. The activation of the main signaling pathways involved in MDA-MB-231 proliferation (i.e. MEK/ERK, PI3K/Akt and p38/MAP kinases pathways) [14] was then determined by Western blot analysis. As shown in Fig. 1B, after 48 h of culture in absence of serum, higher levels of phospho-Akt (pAkt) and phospho-ERK (pERK) were observed in GD3S<sup>+</sup> cells compared to control.

In contrast, no difference of phospho-p38 was observed between clones and control cells. The involvement of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in cell proliferation was then determined using selective inhibitors against MEK (1 μM U0126) and Akt (1 μM Akt inhibitor VIII). The concentration used was based upon the absence of toxicity in MDA-MB-231 cells, as determined by cell proliferation assay in serum-free medium for 48 h (data not shown). Efficient inhibition of MEK or Akt (Fig. 1C) did not modify proliferation of control cells but strongly reduced that of GD3S<sup>+</sup> cells, with the relative number of GD3S<sup>+</sup> cells being similar to that of control ones (Fig. 1D). Taken together, these results indicate an essential function of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in the proliferative phenotype of GD3S<sup>+</sup> MDA-MB-231 cells.



**Figure 1- Involvement of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in the proliferation of the GD3S<sup>+</sup> clones.** **A.** Cell proliferation assay on standard monolayer plates. GD3S<sup>+</sup> clones 4 and 11, and control cells were cultured in serum-free conditions for 5 days. Cell growth was determined by MTS assay. Each measure was performed in 16 wells and data are mean of 4 independent manipulations. \*\*: p<0.01, GD3S<sup>+</sup> cells vs control cells. **B.** Western-Blot analysis of ERK, Akt, and p38, and their phosphorylated forms in control and GD3S<sup>+</sup> MDA-MB-231 clones after 48 h of culture in serum-free conditions. Expression of GAPDH was used as control for protein loading. **C.** Cells were treated in serum-free medium for 48 h with 1 μM U0126 or 1 μM Akt inhibitor VIII. Lysates were subjected to immunoblot to determine the decrease of pERK and pAkt proteins. **D.** Proliferation assay using MTS. GD3S<sup>+</sup>clone 4 (■) and 11 (▲), and control cells (◇) were cultured in serum-free medium with the appropriated concentration of DMSO as control. In parallel, clones 4 (□) and 11 (△) and control cells (◇) were cultured in the presence of U0126 or Akt inhibitor VIII for 5 days. \*\*: p<0.01, inhibitors treated vs untreated GD3S<sup>+</sup> cells.



**Figure 2- Activation of c-Met in GD3S<sup>+</sup> clones in serum-free conditions.** **A.** Total cell lysates from control, clone 4 and clone 11, cultured for 48 h under serum-free conditions, were subjected to phospho-RTK array. Phospho-RTK Array coordinates are given on the right side of the figure. Black dots represent Phospho-Tyrosine Positive Control; A1, A2: EphA6; A3, A4: EphA7; A5, A6: EphB1; A7, A8: EphB2; A9, A10: EphB4; A11, A12: EphB6; A13, A14: Mouse IgG1 Negative Control; A15, A16: Mouse IgG2A Negative Control; A17, A18: Mouse IgG2B Negative Control; A19, A20: Goat IgG Negative Control; A21, A22: PBS Negative Control; B1, B2: Tie-2; B3, B4: TrkA; B5, B6: TrkB; B7, B8: TrkC; B9, B10: VEGFR1; B11, B12: VEGFR2; B13, B14: VEGFR3; B15, B16: MuSK; B17, B18: EphA1; B19, B20: EphA2; B21, B22: EphA3; B23, B24: EphA4 ; C1, C2: Mer; C3, C4: c-Met; C5, C6: MSPR; C7, C8: PDGFR $\alpha$ ; C9, C10: PDGFR $\beta$ ; C11, C12: SCFR; C13, C14: Flt-3; C15, C16: M-CSFR; C17, C18: c-Ret; C19, C20: ROR1; C21, C22: ROR2; C23, C24: Tie-1; D1, D2: EGFR; D3, D4: ErbB2; D5, D6: ErbB3; D7, D8: ErbB4; D9, D10: FGFR1; D11, D12: FGFR2 $\alpha$ ; D13, D14: FGFR3; D15, D16: FGFR4; D17, D18: Insulin R; D19, D20: IGF-I R; D21, D22: Axl; D23, D24: Dtk. **B.** Western blot analysis using specific c-Met and phospho-c-Met antibodies. Control, GD3S<sup>+</sup> MDA-MB-231 and Wild type MDA-MB-231 cultured in serum-free conditions were treated or not 15 min with 30 ng/mL HGF/SF. Cell lysates were analyzed by Western blotting with antibody directed against human c-Met and the phosphorylated tyrosine residues of the kinase domain. Reprobing with anti-ERK2 antibody was performed to assess the loading.

**c-Met receptor is constitutively activated in GD<sub>3</sub> synthase expressing cells.**

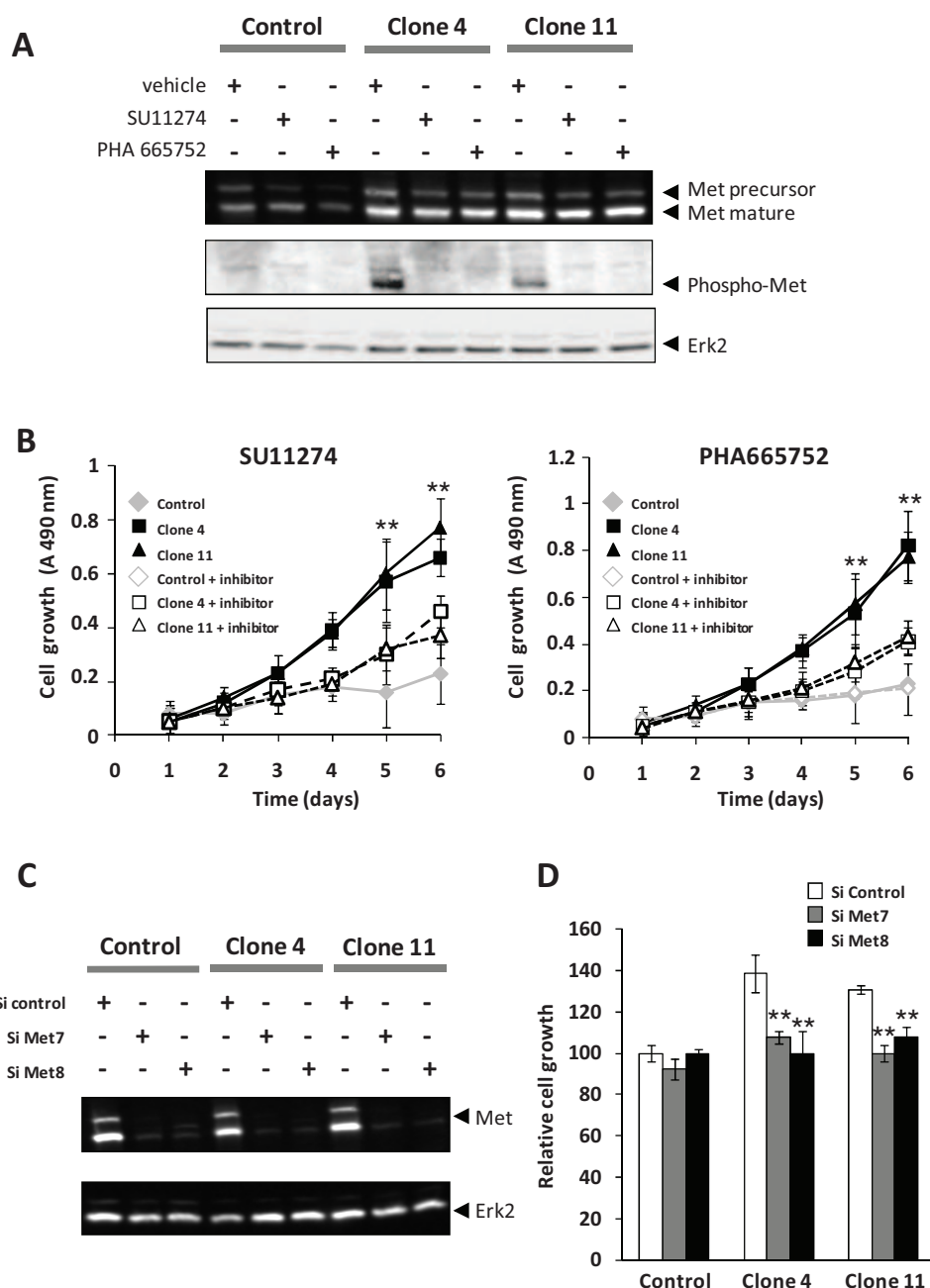
Several studies have demonstrated that cellular ganglioside composition can modulate the activity of growth factor receptors, and consequently induce the activation of intracellular molecular pathways [15-17]. In this context, the phosphorylation status of 42 RTKs was simultaneously examined using a phospho-RTK array in MDA-MB-231 cells. As shown in Fig. 2A, GD<sub>3</sub><sup>+</sup> MDA-MB-231 cells displayed a strong phosphorylation of c-Met receptor compared to control cells cultured in serum-free or in complete medium (supplementary Fig. 1). A weak increase of EGFR, Tie-2 and Ret phosphorylation was also observed. To confirm c-Met activation, we performed Western blot analysis using anti-phospho-c-Met antibodies directed against phosphorylated tyrosine residues 1234 and 1235 of c-Met. As shown in Fig. 2B, phospho-c-Met was detected only in GD<sub>3</sub><sup>+</sup> cells but not in control cells. As expected, HGF/SF stimulation induced efficient phosphorylation of c-Met in control MDA-MB-231 cells. In addition, confocal microscopy analysis of c-Met showed no significant difference in c-Met distribution between control and MDA-MB-231 GD<sub>3</sub><sup>+</sup> cells. Treatment of GD<sub>3</sub><sup>+</sup> MDA-MB-231 cells with 5D5 Fab, which inhibits ligand-dependent activation of c-Met through inhibition of HGF/SF-Met association [18-19] (supplementary Fig. 3A), does not affect cell proliferation, excluding autocrine activation of c-Met by HGF/SF (supplementary Fig. 3B). Slight increase of c-Met expression was also observed in both clones, in comparison with control cells. However, QPCR analysis did not reveal modification of *MET* transcriptional expression in GD<sub>3</sub><sup>+</sup> MDA-MB-231 clones (supplementary Fig. 4).

**c-Met activation is involved in the increased proliferation of GD<sub>3</sub><sup>+</sup> MDA-MB-231 cells.**

To determine the potential involvement of c-Met in the increased proliferation of GD<sub>3</sub><sup>+</sup> MDA-MB-231 cells, we first inhibited c-Met activation using two selective ATP-competitive inhibitors of the c-Met kinase, SU11274 and PHA665752 [20-21]. Both inhibitors abrogated constitutive c-Met phosphorylation (Fig. 3A) and significantly decreased the proliferation of

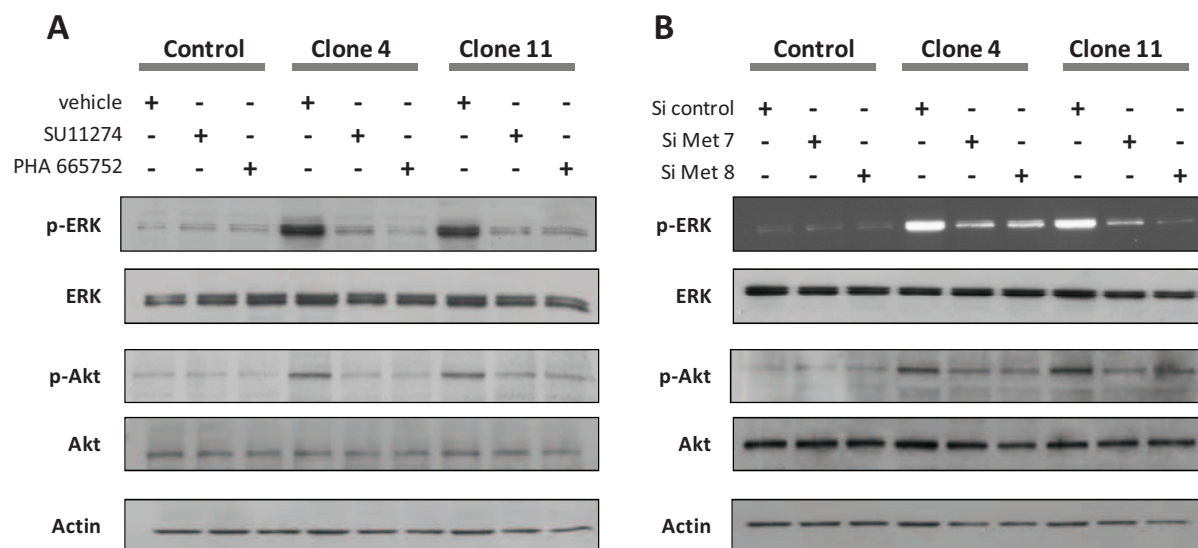
both GD3S<sup>+</sup> clones (Fig. 3B). In addition, both inhibitors of the c-Met kinase activity reduced the migration capacity of both clones to the level of control cells (supplementary Fig. 5).

We then targeted c-Met with specific siRNA, which efficiently silenced c-Met expression in control and GD3S<sup>+</sup> MDA-MB-231 cells (Fig. 3C). Inhibition of c-Met expression prevented increased proliferation of clones 4 and 11, thus demonstrating the involvement of c-Met receptor in the high proliferative property of GD3S<sup>+</sup> cells in deprivation conditions. Moreover, both pharmacological agents and c-Met siRNA also strongly decreased the phosphorylation of ERK and Akt in GD3S<sup>+</sup> clones (Fig. 4A and Fig. 4B). Altogether, these results demonstrate that the enhanced proliferation of GD3S<sup>+</sup> MDA-MB-231 cells is essentially due to c-Met activation, which in turn activates the downstream MEK/ERK and PI3K/Akt signaling pathways.



**Figure 3- Reduction of the proliferation of the GD3S<sup>+</sup> clones upon c-Met inhibition.** **A.** Inhibition of c-Met phosphorylation by pharmacological inhibitors of c-Met. Control cells and clones 4 and 11 were cultured in presence of 500 nM SU11274 or 100 nM of PHA 665752 for 48 h before lysis and Western blot analysis. Expression of Erk2 was used as control for protein loading. **B.** Cell proliferation assays. Clones 4 (■) and 11 (▲), and control cells (◆) were cultured during 5 days in serum-free medium containing 500 nM SU11274, 100 nM of PHA 665752, or the appropriated dilution of DMSO as negative control (□ clone 4; △ clone 11; ◇ MDA-MB-231 control). \*\*: p<0.01, inhibitors treated vs untreated GD3S<sup>+</sup>cells. **C.** Immunoblotting analysis of c-Met after siRNA transfection. Total cell lysates were extracted after one round of transfection with siRNA control or with siRNA targeting c-Met (named *Met7* and *Met8*). **D.** Proliferation assay after c-Met siRNA transfection. One day after the transfection, cells were seeded in 96-wells plates and cell growth was then analyzed after 48 h as described in *Material and Methods* section. Absorbance values were normalized to the control cell transfected with a scrambled sequence, which was arbitrarily set as 100 %. \*\*: p<0.01, GD3S<sup>+</sup>cells vs control cells.



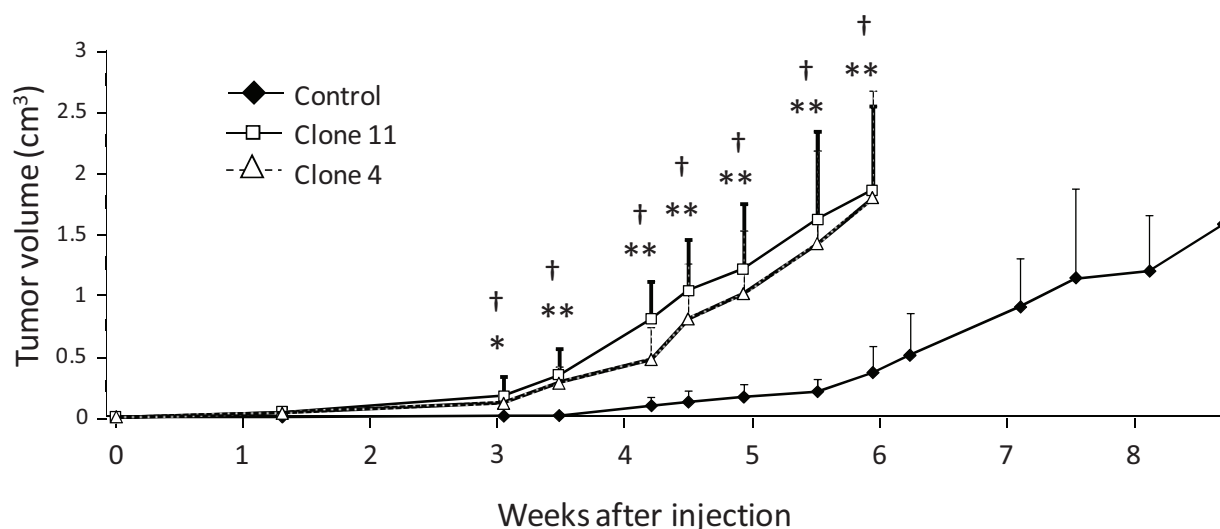


**Figure 4- Western blot analysis of p-ERK and p-Akt upon c-Met inhibition.**

**A.** Western blot analysis of pERK, pAkt in control cells and GD3S<sup>+</sup> clones after treatment with c-Met inhibitors: 500 nM SU11274 or 100 nM of PHA 665752. **B.** Western blot analysis of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in control cells and GD3S<sup>+</sup> clones after treatment with 20 pmol of specific siRNA.

#### **G<sub>D3</sub> synthase over-expression increases tumor growth in SCID mice.**

MDA-MB-231 cells were subcutaneously injected into severe combined immunodeficiency (SCID) mice. All animals formed a tumor at the injection site. However, tumor growth of GD3S<sup>+</sup> cells were significantly increased, since tumors were palpable one week after injection and attained a size of 1.75 cm<sup>3</sup> in about 6 weeks. In contrast, empty-vector-transfected cells formed palpable tumors with a latency of 3 weeks and formed tumors of similar size in about 8 weeks (Fig. 5).

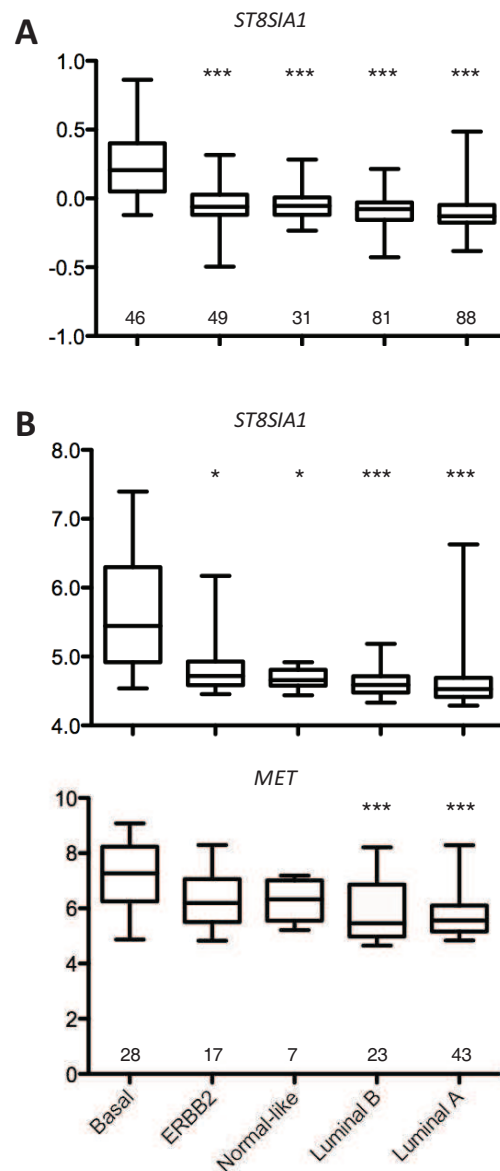


**Figure 5- Xenograft tumor growth in SCID mice.** Growth curve of tumors. Control and GD3S<sup>+</sup> MDA-MB-231 cells were subcutaneously injected into SCID mice. Ten animals were used in each group. Tumor volume was monitored every 2 or 3 days until tumor volume approached 2 cm<sup>3</sup>. Student's t test was performed between control and clone 11 (\*: p<0.05; \*\*: p<0.01), and between control and clone 4 (†: p<0.05).

#### Statistical analyses of microarray data.

*ST8SIA1* expression in breast cancer primary tumors was investigated by exploring two microarray datasets previously published by van de Vijver *et al.* [12] and Chin *et al.* [13]. The first dataset consisted of 295 stage I or II breast cancers [12] and the second consisted of 118 stage I-III (mostly I-II) tumors [13]. As previously reported [9], we found a significant association of *ST8SIA1* mRNA expression with ER negativity in both datasets (data not shown). To refine this result, we used the established subtype classification based on the 534 genes signature defined by Sorlie *et al.* [22]. For both datasets, each tumor has been categorized as one of the 5 defined subtypes: basal, erbB2, normal-like, luminal A and luminal B. This classification has been shown to reflect the clinical outcome of the patients with both basal and erbB2 subtypes being associated with poorer prognosis [22]. We have analyzed the level of expression of *ST8SIA1* in the different subtypes and found it significantly higher in the basal subtype than in any other group in both datasets (Fig. 6A and 6B). Interestingly, higher expression of

*MET* was also observed in the basal subgroup (Fig. 6B). We also found that the expression levels of *ST8SIA1* and *MET* were significantly correlated ( $p < 0.001$  Pearson's correlation test) in the Chin *et al.* dataset. Taken together, these results suggest that *ST8SIA1* is over-expressed in poor prognosis breast cancers (basal type), possibly in conjunction with *MET*.



**Figure 6- *ST8SIA1* and *MET* expression in breast cancer subtypes.** **A.** *ST8SIA1* RNA expression is expressed as difference to the median signal detected on Agilent microarray [12]. **B.** *ST8SIA1* and *MET* expression are expressed as normalized signal detected on Affymetrix microarray [13]. For both dataset the number of tumors in each subtype group is reported next to X axis. Significant differences between basal and other subtypes are indicated, \*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

## Discussion

In the present study, we showed that the expression of GD3S and complex gangliosides in MDA-MB-231 cells leads to a proliferative phenotype in absence of serum or growth factors. This phenotype is induced by the constitutive activation of c-Met and subsequent signal transduction MEK/ERK and PI3K/Akt pathways. GD3S expression not only promotes cell growth *in vitro* but also stimulates primary tumor growth in SCID mice and is associated with *MET* gene expression in basal subtype of human breast tumors set.

We previously demonstrated that GD3S expression renders MDA-MB-231 cells independent of serum [10]. The ability to survive and proliferate under serum-free conditions is one of the well-known features of aggressive cancer cells *in vitro* that can be mediated by a constitutive phosphorylation of RTKs, the key regulators of critical cellular processes such as cell growth and survival. Dysregulated activation of RTKs is implicated in the genesis and progression of a variety of cancers, including breast cancer [23]. By using phospho-RTK array, we analyzed the activation pattern of various RTKs in GD3S<sup>+</sup> clones. We observed a strong and specific constitutive activation of c-Met receptor, in spite of the absence of ligand-dependent stimulation. Moreover, the down-regulation of c-Met induced a significant reversion of the phenotype, demonstrating the crucial function of c-Met in the proliferative capacity of the GD3S<sup>+</sup> clones. It has been well shown that during oncogenesis, abnormal c-Met activation results in a complex program referred to “invasive growth”, consisting in the activation of a series of cellular processes such as proliferation, scattering, invasion and survival [24]. Thus, c-Met activation *via* HGF/SF stimulation induced MDA-MB-231 growth, motility and invasiveness [25]. c-Met is also known to induce survival of bladder carcinoma cells submitted to serum starvation [26] but to our knowledge, nothing is described concerning the implication of c-Met in breast cancer cells proliferation in serum-free conditions.

Perturbation of the HGF/Met signaling axis leads to enhanced signaling that occurs in a wide range of aggressive human cancers, correlated with poor prognosis. As previously described [27], the two intracellular pathways MEK/ERK and PI3K/Akt promoted by c-Met *trans*-phosphorylation serve as key downstream integrators of growth and survival signals in MDA-MB-231 cells [14]. Signaling for mitogenesis and growth essentially occurs through the MEK/ERK pathway, whereas PI3K/Akt signaling has been shown to play a central role in the anti-apoptotic responses induced by activated c-Met. Interestingly in this context, we demonstrated using specific pharmacological inhibitors that the simultaneous activation of both pathways is necessary to maintain the proliferative phenotype of GD3S<sup>+</sup> cells in serum-free conditions.

The GD3S expression leads to the accumulation of complex gangliosides from b- and c-series at the plasma membrane of MDA-MB-231 cells. It is commonly known that gangliosides are associated or complexed with signal transducers such as small G-proteins, Src family kinases, tetraspanins and integrins [28]. The modulation of ganglioside expression can have therefore deep effects on receptor-mediated signaling, notably RTKs, and regulate cell growth through inhibition/activation of signal transduction pathways [15-17]. For example, tyrosine kinase activity of EGFR is inhibited by the monosialoganglioside G<sub>M3</sub> through carbohydrate-carbohydrate interactions of G<sub>M3</sub> with GlcNAc terminated *N*-glycan on EGFR, without interfering with EGF binding [29-30]. Moreover, G<sub>M3</sub> has been described as an angiogenesis suppressor by regulating VEGFR-2 phosphorylation [31-32]. Previously, it has been demonstrated that a-series gangliosides act as negative regulators of c-Met. G<sub>D1a</sub> inhibits HGF-induced motility and scattering of cancer cells through suppression of tyrosine phosphorylation of c-Met [33]. G<sub>M3</sub> and G<sub>M2</sub> form heterodimers that specifically interact with tetraspanin (CD82) in glycosynapses and such complexes inhibit c-Met activation and integrins cross-talk [34-35].

However, to our knowledge, it is the first demonstration of the ganglioside-induced c-Met constitutive activation in cancer cells.

Dysregulation of c-Met signaling through mutation, over-expression or autocrine/paracrine loops has been well documented and is known to be an important feature in various human cancers, especially in terms of metastasis development [36]. To date, no mutation has been found either in human breast cancer biopsies or in breast cancer cell lines including MDA-MB-231 [<http://www.vai.org/met/>]. A slight increase of c-Met expression was observed in both GD3S<sup>+</sup> clones, but was not correlated to an increase of *MET* transcription, as revealed by quantitative PCR analysis. A majority of breast tumors aberrantly expresses HGF and its receptor [37-38] that may activate c-Met in an autocrine manner. However, it has been demonstrated that the autocrine activation of c-Met does not occur in MDA-MB-231 [39]. Proliferation assay of GD3S<sup>+</sup> clones with 5D5 Fab, which specifically blocks HGF binding and subsequent pathway activation, has confirmed ligand-independent activation of c-Met upon GD3S expression. Thus, we described original mechanism of c-Met activation independently of gene amplification or autocrine activation induced by complex gangliosides in MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> cells.

As shown in Fig. 3, the down-regulation of c-Met activation did not abolish completely the proliferative capacities of these cells after 5 days of culture in deprivation conditions. It is possible that other RTKs could contribute to the enhanced proliferation, as EGFR, Ret and Tie-2, which are also found to be slightly activated in GD3S<sup>+</sup> cells. Consistent with this hypothesis, recent evidence demonstrates that c-Met crosstalk with other cell surface proteins, including RTKs, contributes to tumorigenesis [40-41]. For example, the synergistic action of c-Met and EGFR has been demonstrated to enhance the malignant properties of cancer cells by promoting the resistance of tumors to therapy [42-43].

*In vivo* experiments reveal that GD3S expression enhances the tumorigenicity of MDA-MB-231 cells in SCID mice. This suggests that modification of complex gangliosides pattern may provide some advantage for cancer cells to grow in the cellular environment of host tissues. Previous studies have shown that stable inhibition of  $G_{D3}$  and  $G_{D2}$  expression in human lung cancer cells by GD3S siRNA significantly suppressed cell growth in SCID mice [44]. In parallel, *ST8SIA1* over-expression was associated with poor pathohistological grading in ER-negative tumors and reduced overall survival of patients [8-9]. We report here a higher expression of *ST8SIA1* in the basal subtype of breast tumors compared to others. Interestingly, a similar pattern was found for *MET*, in accordance with previous reports [38, 45-46]. c-Met is also associated with poor clinical outcome and considered as a possible marker for earlier recurrence and shorter survival in breast cancer patients [47-49]. Our results support the idea that the products of these two genes may cooperate within the same subtype of breast cancers: the basal-type, which consists mainly in the triple-negative breast cancers (estrogen receptor, progesterone receptor and erbB2 negative). These cancers are of poor prognosis and cannot benefit from available targeted therapies (i.e. hormono-therapy and Herceptin treatment) [22]. It has been recently shown that the GD3S expression renders human hepatocarcinoma cells susceptible to hypoxia, mediated ROS generation and subsequent cell death [50]. Hepatocarcinoma GD3S<sup>+</sup> cells display enhanced  $G_{D3}$  levels both at the cell surface and in internal organelles, most likely including mitochondria. This specific subcellular localization is consistent with the proapoptotic role of  $G_{D3}$ , described in a variety of cell types. Therefore, the biological outcome of GD3S expression in cancer cell biology also depends on the subsequent cellular localization and the relative amounts of complex gangliosides that localize to the mitochondria. To conclude, our results show that GD3S and complex gangliosides expression may contribute to increase the malignant properties of breast cancer cells, by activating RTKs, especially c-Met. This mechanism underlies a new way for c-Met constitutive activation. Molecu-

lar targeted therapies have been developed for over a decade to specifically inhibit consistently activated oncogene products, including c-Met [25]. However, their efficiency is limited to some patients because of the development of intrinsic or acquired resistance. The present results suggest that complex gangliosides are not only antigenic markers but could be also valid therapeutic targets in basal-type/triple negative breast cancers. Although further studies are needed to precisely determine which type of gangliosides is responsible of the specific activation of c-Met, our results suggest that targeting both gangliosides and c-Met would lead to a more favorable clinical outcome than targeting RTKs alone.

### **Acknowledgments**

This work was supported the Association pour la Recherche sur le Cancer (grants n°7936 and 5023 (PD), and grant n°1137 (DT)), la Ligue régionale contre le Cancer (PD & DT), l'ANR - Young investigator program (DT) and the PAI Hubert Curien France-Korea STAR (PD). We thank the Microscopy-Imaging-Cytometry Facility of the Lille Pasteur Campus (MICPaL Facility) for access to instruments and technical advices.

### **Abbreviations**

DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMSO, dimethylsulfoxide; EDTA, Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid; EGF, Epidermal Growth Factor; ER, estrogen receptor; ERK, extracellular signal-regulated kinase; EGFR, epidermal growth factor receptor; FBS, Fetal Bovine Serum; GFP, Green Fluorescent Protein; HGF/SF, hepatocyte growth factor / scatter factor; mAb, monoclonal antibody; MEK, mitogen-activated protein (MAP) kinase/ERK kinase; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; pAkt, phospho- Akt; pERK, phospho-ERK; PBS, Phosphate Buffered Saline; PI3K, phosphoinositide-3 kinase; RTK, Receptor Tyrosine-kinase; SCID, Severe Combined



*Résultats : Article 2*

Immunodeficiency; SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; siRNA, small interfering RNA; GD3S, GD<sub>3</sub> synthase; TBST, Tris Buffered Saline Tween-20; VEGFR-2, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2.

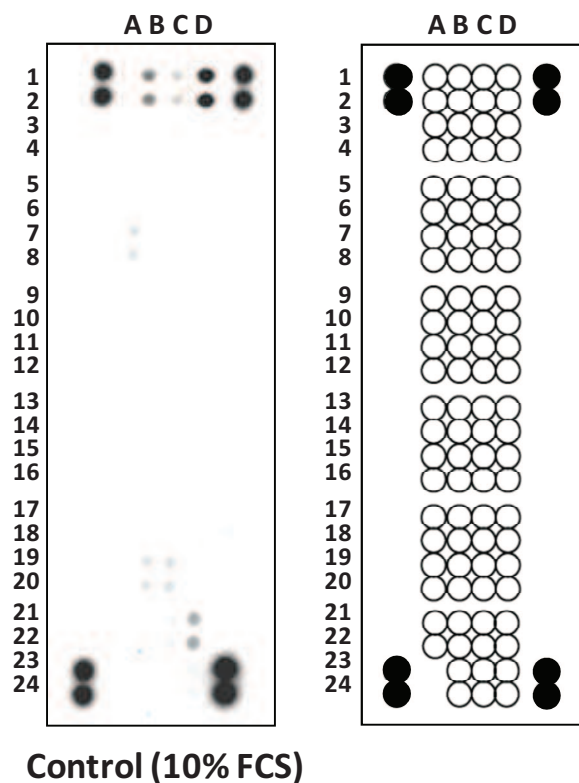
## References

1. Hakomori SI. Inaugural Article: The glycosynapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:225-232.
2. Tettamanti G. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj J* 2004; 20: 301-7.
3. Hakomori SI. Tumor-associated carbohydrate antigens defining tumor malignancy: basis for development of anti-cancer vaccines. *Adv Exp Med Biol* 2001; 491: 369-402.
4. Birklé S, Zeng G, Gao L, Yu RK, Aubry J. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* 2003; 85: 455-63.
5. Dyatlovitskaya EV, Kandyba AG. Role of biologically active sphingolipids in tumor growth. *Biochemistry* 2006; 71: 10-7.
6. Furukawa K, Hamamura K, Nakashima H, Furukawa K. Molecules in the signaling pathway activated by gangliosides can be targets of therapeutics for malignant melanomas. *Proteomics* 2008; 8: 3312-16.
7. Marquina G, Waki H, Fernandez LE, et al. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 5165-71.
8. Ruckhäberle E, Karn T, Rody A, et al. Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside G<sub>D3</sub> synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009; 135: 1005-13.
9. Ruckhäberle E, Rody A, Engels K, et al. Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 112: 41-52.
10. Cazet A, Groux-Degroote S, Teylaert B, et al. GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol Chem* 2009; 390: 601-9.
11. Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, et al. TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. *Oncogene* 2009; 28:1960-1970
12. Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347: 1999-2009.
13. Chin K, DeVries S, Fridlyand J, et al. Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiology. *Cancer Cell* 2006; 10: 529-41.
14. Ripple MO, Kalmadi S, Eastman A. Inhibition of either phosphatidylinositol 3-kinase/Akt or the mitogen/extracellular-regulated kinase, MEK/ERK, signaling pathways suppress growth of breast cancer cell lines, but MEK/ERK signaling is critical for cell survival. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 93:177-188.
15. Miljan EA, Bremer EG. Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci STKE* 2002; 2002:re15.
16. Lopez PH, Schnaar RL. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19:549-557.
17. Kaucic K, Liu Y, Ladisch S. Modulation of growth factor signaling by gangliosides: positive or negative? *Methods Enzymol* 2006; 417:168-185.

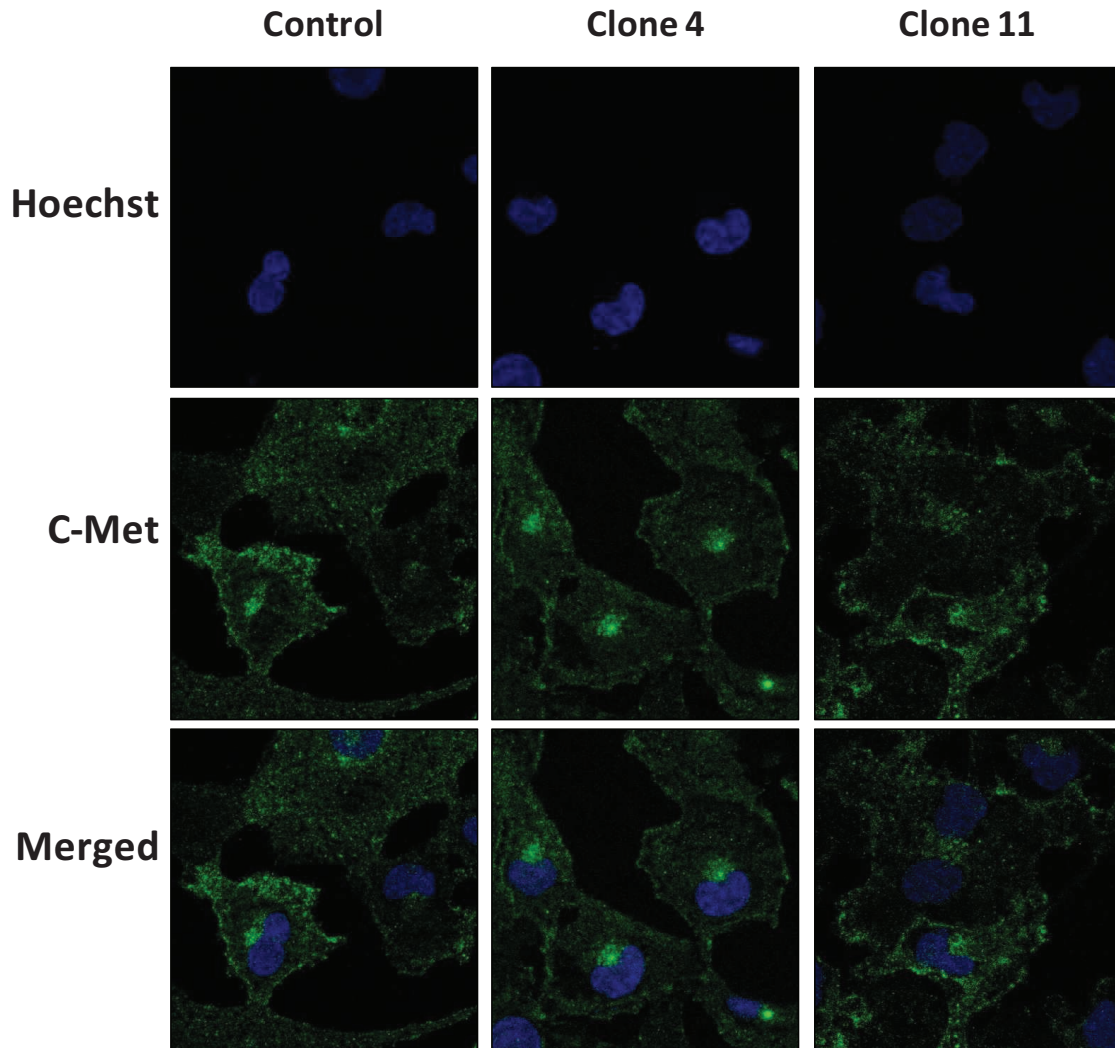
18. Martens T, Schmidt NO, Eckerich C et al. A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth *in vivo*. Clin Cancer Res. 2006 ; 12:6144-52.
19. Jin H, Yang R, Zheng Z et al. MetMAb, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival. Cancer Res. 2008 ; 68 : 4360-8.
20. Berthou S, Aebbersold DM, Schmidt LS, et al. The Met kinase inhibitor SU11274 exhibits a selective inhibition pattern toward different receptor mutated variants. Oncogene 2004; 23:5387-93.
21. Christensen JG, Schreck R, Burrows J, et al. A selective Small molecule inhibitor of c-Met kinase inhibits c-Met-dependent phenotypes *in vitro* and exhibits cytoreductive anti-tumor activity *in vivo*. Cancer Res 2003; 63:7345-55.
22. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 8418-23.
23. Gschwind A, Fischer OM, Ullrich A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. Nature Rev Cancer 2004; 4:361-370.
24. Trusolino L, Comoglio PM. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. Nat Rev Cancer 2002; 2:289-300.
25. Beviglia L, Matsumoto K, Lin CS, Ziober BL, Kramer RH. Expression of the c-Met/HGF receptor in human breast carcinoma: correlation with tumor progression Int J Cancer 1997; 74:301-309.
26. Yamamoto N, Mammadova G, Song RX, Fukami Y, Sato K. Tyrosine phosphorylation of p145met mediated by EGFR and Src is required for serum-independent survival of human bladder carcinoma cells J Cell Sci 2006; 119:4623-4633.
27. Eder JP, Vande Woude GF, Boerner SA, LoRusso PM. Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. Clin Cancer Res 2009; 15:2207-2214.
28. Kasahara K, Watanabe Y, Yamamoto T, Sanai Y. Association of Src family tyrosine kinase Lyn with ganglioside GD3 in rat brain. Possible regulation of Lyn by glycosphingolipid in caveolae-like domains. J Biol Chem 1997; 272:29947-29953.
29. Miljan EA, Meuillet EJ, Mania-Farnell B, et al. Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. J Biol Chem 2002; 277:10108-10113.
30. Kawashima N, Yoon SJ, Itoh K, Nakayama K. Tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor is regulated by GM3 binding through carbohydrate to carbohydrate interactions. J Biol Chem 2009; 284:6147-6155.
31. Mukherjee P, Faber AC, Shelton LM, et al. Ganglioside GM3 suppresses the pro-angiogenic effects of vascular endothelial growth factor and ganglioside GD1A. J Lipid Res 2008 Feb 20 [Epub ahead of print].
32. Chung TW, Kim SJ, Choi HJ, et al. Ganglioside GM3 inhibits VEGF/VEGFR-2-mediated angiogenesis: direct interaction of GM3 with VEGFR-2. Glycobiology 2009; 19:229-239.
33. Hyuga S, Kawasaki N, Hyuga M, et al. Ganglioside GD1a inhibits HGF-induced motility and scattering of cancer cells through suppression of tyrosine phosphorylation of c-Met. Int J Cancer 2001; 94:328-334.

34. Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, Hakomori SI. Ganglioside GM2-tetraspanin CD82 complex inhibits met and its cross-talk with integrins, providing a basis for control of cell motility through glycosynapse. *J Biol Chem* 2007; 282:8123-8133.
35. Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, Hakomori SI. Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:1925-1930.
36. Corso S, Comoglio PM, Giordano S. Cancer therapy: can the challenge be MET? *Trends Mol Med* 2005; 11:284-292.
37. Edakuni G, Sasatomi E, Satoh T, Tokunaga O, Miyazaki K. Expression of the hepatocyte growth factor/c-Met pathway is increased at the cancer front in breast carcinoma. *Pathol Int* 2001; 51:172-178.
38. Kang JY, Dolled-Filhart M, et al. Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer. *Cancer Res* 2003; 63:1101-1105.
39. Parr C, Jiang WG. Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its activator, inhibitors and the c-Met receptor in human cancer cells *Int J Oncol* 2001; 19:857-863.
40. Lai AZ, Abella JV, Park M. Crosstalk in Met receptor oncogenesis *Trends Cell Biol* 2009; 19:542-551.
41. Xu AM, Huang PH. Receptor tyrosine kinase coactivation networks in cancer. *Cancer Res* 2010; 70:3857-3860.
42. Shattuck DL, Miller JK, Carraway KL 3rd, Sweeney C. Met receptor contributes to trastuzumab resistance of Her2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68:1471-1477.
43. Karamouzis MV, Argiris A. Update on the role of EGFR inhibitors in cancer therapeutics. *Cancer Treat Res* 2007; 135:257-275.
44. Ko K, Furukawa K, Takahashi T, et al. Fundamental study of small interfering RNAs for ganglioside GD3 synthase gene as a therapeutic target of lung cancers. *Oncogene* 2006; 25:6924-6935.
45. Ponzo MG, Lesurf R, Petkiewicz S, et al. Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:12903-12908.
46. Graveel CR, DeGroot JD, Su Y, et al. Met induces diverse mammary carcinomas in mice and is associated with human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:12909-12914.
47. Tolgay Ocal I, Dolled-Filhart M, D'Aquila TG, Camp RL, Rimm DL. Tissue microarray-based studies of patients with lymph node negative breast carcinoma show that met expression is associated with worse outcome but is not correlated with epidermal growth factor family receptors. *Cancer* 2003; 97:1841-1848.
48. Lengyel E, Prechtel D, Resau JH, et al. C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu. *Int J Cancer* 2005; 113:678-682.

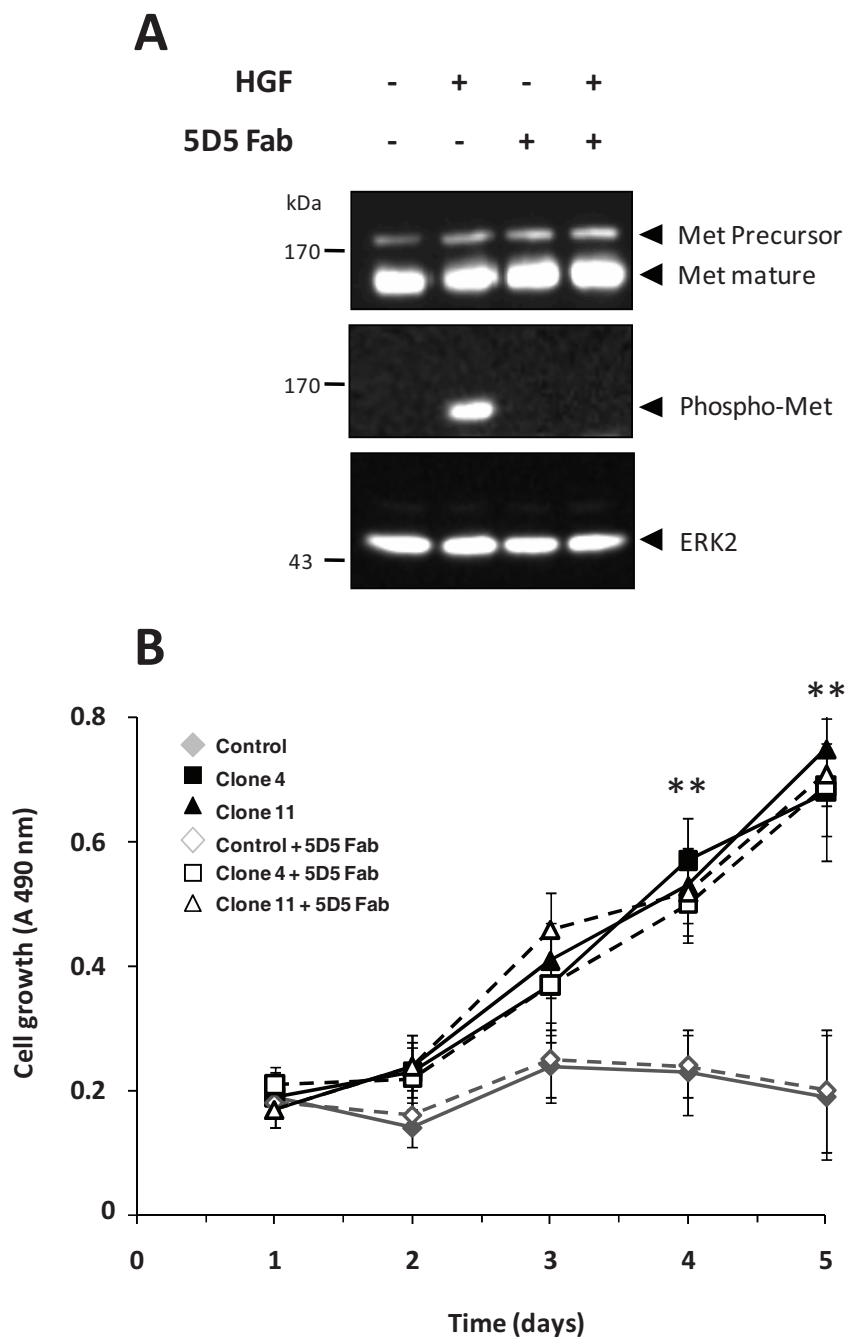
49. Garcia S, Dalès JP, Charafe-Jauffret E, et al. Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increased expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basal-like phenotype. *Hum Pathol.* 2007; 38:830-841.
50. Lluís JM, Llacuna L, von Montfort C, et al. GD3 synthase overexpression sensitizes hepatocarcinoma cells to hypoxia and reduces tumor growth by suppressing the cSrc/NF-kappaB survival pathway. *PLoS One.* 2009; 4:e8059.



**Supplementary Figure 1: RTK co-activation status in MDA-MB-231 control cultured for 48 h in DMEM containing 10 % FBS.** Phospho-RTK Array coordinates are given on the right side of the figure. Black dots represent Phospho-Tyrosine Positive Control; A1, A2: EphA6; A3, A4: EphA7; A5, A6: EphB1; A7, A8: EphB2; A9, A10: EphB4; A11, A12: EphB6; A13, A14: Mouse IgG1 Negative Control; A15, A16: Mouse IgG2A Negative Control; A17, A18: Mouse IgG2B Negative Control; A19, A20: Goat IgG Negative Control; A21, A22: PBS Negative Control; B1, B2: Tie-2; B3, B4: TrkA; B5, B6: TrkB; B7, B8: TrkC; B9, B10: VEGFR1; B11, B12: VEGFR2; B13, B14: VEGFR3; B15, B16: MuSK; B17, B18: EphA1; B19, B20: EphA2; B21, B22: EphA3; B23, B24: EphA4; C1, C2: Mer; C3, C4: c-Met; C5, C6: MSPR; C7, C8: PDGFR $\alpha$ ; C9, C10: PDGFR $\beta$ ; C11, C12: SCFR; C13, C14: Flt-3; C15, C16: M-CSFR; C17, C18: c-Ret; C19, C20: ROR1; C21, C22: ROR2; C23, C24: Tie-1; D1, D2: EGFR; D3, D4: ErbB2; D5, D6: ErbB3; D7, D8: ErbB4; D9, D10: FGFR1; D11, D12: FGFR2 $\alpha$ ; D13, D14: FGFR3; D15, D16: FGFR4; D17, D18: Insulin R; D19, D20: IGF-I R; D21, D22: Axl; D23, D24: Dtk.

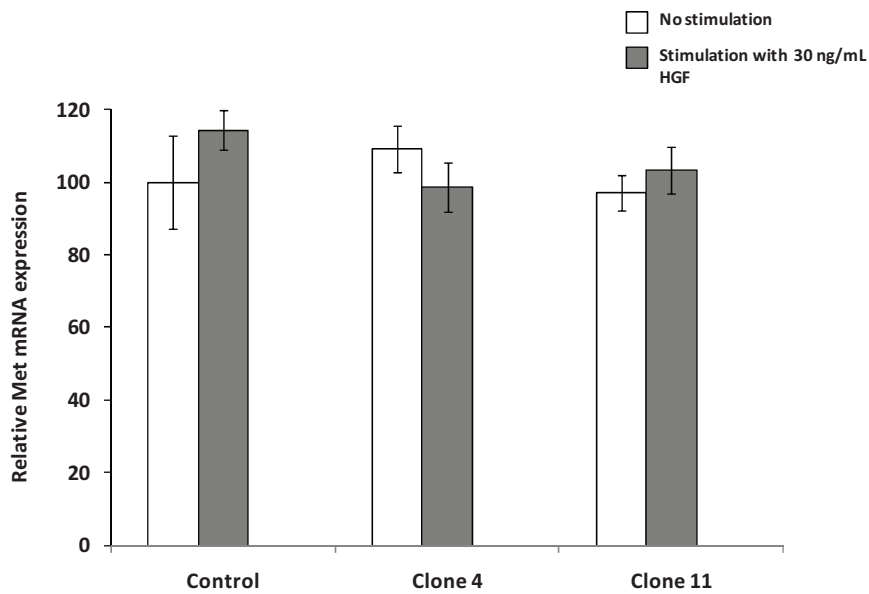


**Supplementary Figure 2: Analysis of c-Met distribution of MDA-MB-231 GD3S+ clones by immunocytochemistry and confocal microscopy.** Cells were cultured on glass for 2 days in serum-free medium, washed with phosphate-buffered saline (PBS) and then fixed with PBS containing 4 % paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min at room temperature. Cells were permeabilized with PBS containing 0.5 % Triton X-100 for 10 min and washed 3 times with PBS. The fixed cells were then incubated for at least 60 min (with a blocking solution containing 0.2 % casein, 0.1 % Tween-20 dissolved in PBS), subsequently incubated with anti-c-Met (1:500) diluted in blocking buffer. After three washes of 5 min with the blocking buffer, cells were incubated with Alexa Fluor® 488-conjugated secondary antibodies (1:1500). Cells were washed three times in PBS, then with deionized water, and finally mounted in Glycergel® (Dako). Nucleus was stained for all coverslips with Hoechst. Stained slides were examined under a Zeiss LSM 710 confocal microscope (470 nm excitation for Alexa Fluor® 488). The image acquisition characteristics were maintained throughout the experiments to ensure the comparability of the results and to allow the comparison of the fluorescence levels. The intensity of the signals was directly quantified on the confocal microscope with LSM examiner software (AIM 3.2; Zeiss, Le Pecq, France).

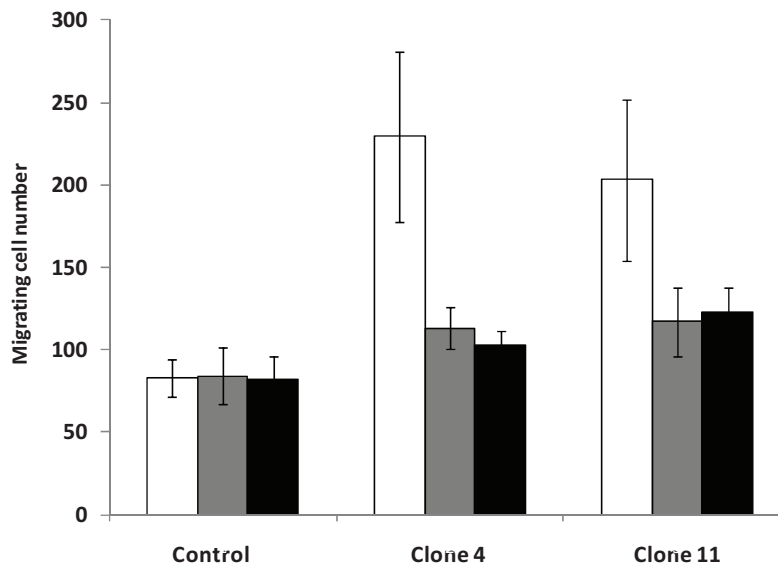


**Supplementary Figure 3: A. Proliferation assay using 5D5 anti c-Met antibody.** GD3S<sup>+</sup> clone 4 (□), clone 11 (△) and control cells (◇) were culture in the presence of 5D5 Fab. In parallel, clone 4 (■), clone 11 (▲) and control cells (◆) were cultured in serum-free medium in presence of control IgG. \*\**p* < 0.01, 5D5 Fab G<sub>D3</sub> over-expressing treated cells vs control cells. **B.** Wild type MDA-MB-231 cells were treated or not 15 min with 30 ng/ml in presence of 10 mg/ml 5D5 Fab or control IgG. Cell lysate were analyzed by Western blotting with antibody directed against human Met and the phosphorylated tyrosine residues of the kinase domain. Reprobing with anti-ERK2 antibody was performed to assess the loading.





**Supplementary Figure 4: Real-time PCR quantification of Met mRNA in GD3S<sup>+</sup> clones.** Levels of Met mRNA in absence (white bars) or after stimulation with HGF (grey bars) were expressed compared to the amount of Met mRNA in MDA-MB-231 control cells, which was regarded as 100 %. Results were normalised to the expression of HPRT mRNA. The quantification was performed by the method described by Livak and Schmittgen (Livak KJ, Schmittgen TD. Methods 2001;25:402-408).



**Supplementary Figure 5: Cell migration analysis.** Cells were seeded in the upper surface of Transwells and cultured for 6 h in DMEM medium supplemented with 0.1 % FCS and DMSO (white bars), SU11274 (grey bars) or PHA665752 (black bars). The number of cells passing through the filter was determined by counting the number of cell on the down side of the filter in ten microscopic fields (20 x) per sample.

### **Article 3: The ganglioside $G_{D2}$ induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the $G_{D3}$ synthase**

Les résultats présentés dans l'article 3 montrent que l'activation spécifique du récepteur c-Met dans les cellules MDA-MB-231 exprimant la  $G_{D3}$  synthétase est dépendante du  $G_{D2}$ . Des analyses en spectrométrie de masse ont montré que ce disialoganglioside représente le glycosphingolipide majoritaire des clones  $G_{D3}$  synthétase positifs. L'inhibition de l'expression du  $G_{D2}$  par ARN interférence de la  $G_{M2}/G_{D2}$  synthétase réduit de manière significative la phosphorylation de c-Met et la prolifération des clones d'intérêt. De plus, des expériences de compétition à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie saccharidique du  $G_{D2}$  permettent d'inhiber la prolifération des cellules qui expriment la  $G_{D3}$  synthétase. Les résultats obtenus suggèrent que la structure oligosaccharidique du  $G_{D2}$  joue un rôle essentiel dans la spécificité d'activation du récepteur c-Met, indépendamment de son ligand HGF.

Cet article sera prochainement soumis en qualité de « *Short Communication* » dans le journal *Glycobiology*.



## **The ganglioside G<sub>D2</sub> induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G<sub>D3</sub> synthase**

Aurélie Cazet<sup>1,2,3#</sup>, Marie Bobowski<sup>1,2,3#</sup>, Yoann Rombouts<sup>1,2,3</sup>, Jonathan Lefebvre<sup>1,4</sup>, Agata Steenackers<sup>1,2,3</sup>, Yann Guérardel<sup>1,2,3</sup>, Xuefen Le Bourhis<sup>1,5</sup>, David Tulasne<sup>1,4</sup> and Philippe Delannoy<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> USTL, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>3</sup> CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

<sup>4</sup> CNRS, UMR 8161, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France.

<sup>5</sup> USTL, INSERM U908, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France.

# The two first authors have equally participated to this work.

\* Correspondence should be addressed to Philippe Delannoy, at Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576, University of Sciences and Technologies of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel: +33 320 43 69 23, Fax: +33 320 43 65 55, e-mail: [philippe.delannoy@univ-lille1.fr](mailto:philippe.delannoy@univ-lille1.fr)

Running title: G<sub>D2</sub>-dependent activation of c-Met.

## Abstract

We have recently established and characterized cellular clones deriving from MDA-MB-231 breast cancer cells that express the human  $G_{D3}$  synthase, the key enzyme controlling b- and c-series gangliosides biosynthesis. The  $G_{D3}$  synthase positive clones show a proliferative phenotype in absence of serum or growth factors and an increased tumor growth in severe immunodeficiency mice. This phenotype results from the constitutive activation of c-Met receptor in spite of the absence of ligand, and subsequent activation of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathways. Here we show by mass spectrometry analysis of total glycosphingolipids that  $G_{D2}$  is the main ganglioside expressed by the  $G_{D3}$  synthase positive clones. Moreover, siRNAs silencing of the  $G_{A2}/G_{M2}/G_{D2}/G_{T2}$  synthase ( $\beta$ 4-GalNAc T1), which resulted in 87-90 % decrease of  $G_{D2}$  synthase mRNA level, efficiently reduced the expression of  $G_{D2}$  and reversed the proliferative phenotype due to the strong decrease of c-Met phosphorylation. Competition assays using anti- $G_{D2}$  monoclonal antibodies also inhibit cell proliferation of  $G_{D3}$  synthase positive clones in serum-free conditions. Altogether, these results clearly demonstrate the involvement of the disialoganglioside  $G_{D2}$  in MDA-MB-231 cell proliferation *via* the constitutive activation of c-Met in absence of ligand. The accumulation of  $G_{D2}$  in c-Met expressing cells could therefore reinforce the tumorigenicity and aggressiveness of breast cancer tumors.

**Key Words:** breast cancer, cell proliferation,  $G_{D3}$  synthase,  $G_{D2}$  ganglioside, MDA-MB-231

## Abbreviations

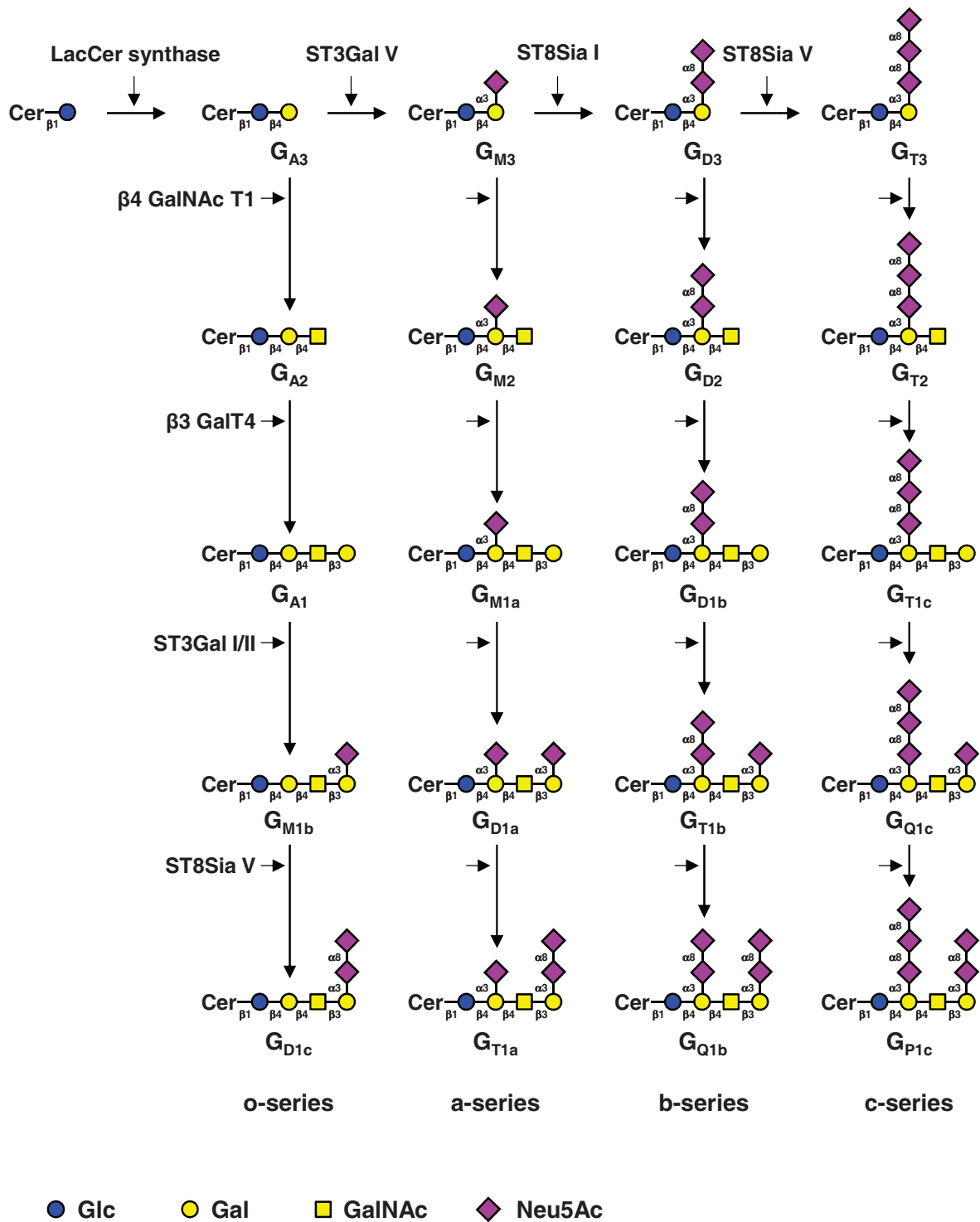
$\beta$ 4GalNAc T1,  $G_{A2}/G_{M2}$   $G_{D2}/G_{T2}$  synthase; BSA, Bovine Serum Albumin; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; EDTA, Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid; ER, estrogen Receptor; ERK, Extracellular Signal-Regulated Kinase; GlcCer, Glucosylceramide; FAK, Focal Adhesion Kinase; FBS, Fetal Bovine Serum; FITC, Fluorescein Isothiocyanate; Gal, Galactose; GalNAc, *N*-acetylgalactosamine; GD3S,  $G_{D3}$  synthase; GSL, glycosphingolipid; HGF/SF, Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor; HPRT, Hypoxanthine Phosphoribosyl-transferase; LacCer, Lactosylceramide; mAb, monoclonal Antibody; MEK, Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase/ERK kinase; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; Neu5Ac, *N*-acetylneuraminic acid; NGF, Nerve Growth Factor; pAkt, phospho-Akt; pERK, phospho-ERK; PBS, Phosphate Buffered Saline; PI3K, Phosphoinositide-3 Kinase; PR, progesterone receptor; QPCR, Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction; RTK, Receptor Tyrosine-kinase; SCID, Severe Combined Immunodeficiency; SCLC, Small Cell Lung Cancer; SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; siRNA, Small Interfering RNA; ST3Gal V,  $G_{M3}$  synthase; ST8Sia I,  $G_{D3}$  synthase; ST8Sia V,  $G_{T3}$  synthase; TACA, Tumor-Associated Carbohydrate Antigens.

## Introduction

Gangliosides are glycosphingolipids (GSL) carrying one or several sialic acid residues. They are essentially located on the outer leaflet of the plasma membrane in microdomains named “glycosynapses”, where they can interact with transmembrane receptors or signal transducers involved in cell proliferation and signaling (Hakomori, 2002; Todeschini and Hakomori, 2008a).

Gangliosides are usually classified in four series according to the presence of 0 to 3 sialic acid residues linked to lactosylceramide (LacCer,  $G_{A3}$ ). The transfer of sialic acid is catalyzed in the Golgi apparatus by specific sialyltransferases ( $G_{M3}$ ,  $G_{D3}$  and  $G_{T3}$  synthases, respectively) that show high specificity toward their glycolipid substrates (Zeng and Yu, 2008).  $G_{A3}$ ,  $G_{M3}$ ,  $G_{D3}$  and  $G_{T3}$  are therefore the precursors for o-, a-, b- and c-series gangliosides (Fig. 1) and the biosynthesis of these compounds determine the relative proportion of gangliosides in each series (Fig. 1). Afterwards, further monosaccharides, including *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), galactose (Gal) and sialic acid (Neu5Ac), can be transferred in a stepwise manner by other specific glycosyltransferases (Tettamanti, 2004). The steady state level of membrane associated gangliosides is therefore dependent on the activity of several glycosyltransferases including ST3Gal V ( $G_{M3}$  synthase), ST8Sia I ( $G_{D3}$  synthase, GD3S), ST8Sia V ( $G_{T3}$  synthase or the  $\beta$ 4GalNAc T1 ( $G_{A2}/G_{M2}/G_{D2}/G_{T2}$  synthase).

Normal human tissues mainly express a-series gangliosides (Fig. 1), whereas complex gangliosides from b- and c-series are essentially found in developing tissues, during embryogenesis, and mainly restricted to the central nervous system in healthy adults (Yamashita et al., 1999). In mammals, the expression of b- and c-series gangliosides increases in pathological conditions including cancer. In this context,  $G_{D3}$  and  $G_{D2}$  have been defined as tumor-associated carbohydrate antigens (TACA) in neuroectoderm-derived tumors such as melanoma, neuroblastoma and glioblastoma (Furukawa et al., 2006).



**Figure 1. Biosynthesis of gangliosides.** The action of ST3Gal V (G<sub>M3</sub> synthase), ST8Sia I (G<sub>D3</sub> synthase) and ST8Sia V (G<sub>T3</sub> synthase) leads to the biosynthesis of the precursor of a-, b- and c-series gangliosides, respectively. The o-series gangliosides are directly synthesized from lactosylceramide (G<sub>A3</sub>). Elongation is performed by the sequential action of *N*-acetyl-galactosaminyltransferase (β<sub>4</sub>GalNAc T1), galactosyltransferase (β<sub>3</sub>Gal T4) and sialyltransferases (ST3Gal I, ST3Gal II and ST8Sia V). Cer: ceramide; LacCer: lactosylceramide. ● : glucose; ● : galactose; ■ : *N*-acetylgalactosamine; ◆ : *N*-acetylneuraminic acid.



It has been also clearly demonstrated that complex gangliosides play a key role in tumor growth and metastasis, by mediating cell proliferation, migration, adhesion and angiogenesis (Birklé et al., 2003). Complex gangliosides have been used as target molecules for cancer immunotherapy, such as  $G_{D3}$  in melanoma (Chapman et al., 2004; Scott et al., 2005; Lo et al., 2010) or  $G_{D2}$  in neuroblastoma (Navid et al., 2010; Yu et al., 2010). However, in most of these studies, molecular functions of individual gangliosides in tumor progression and aggressiveness have not been elucidated. One mechanism by which gangliosides may exert their effects on proliferation is through the modulation of tyrosine kinase receptors (RTK) activation. For example,  $G_{D3}$  synthase expression in PC12 cells leads to the accumulation of  $G_{D1b}$  and  $G_{T1b}$  gangliosides, resulting in continuous neurotrophins receptor TrkA activation, enhancing cell growth without NGF binding (Fukumoto et al., 2000).

In normal breast tissues, complex gangliosides are absent or expressed at a very low level, but  $G_{D3}$ , 9-*O*-acetyl- $G_{D3}$  and 9-*O*-acetyl- $G_{T3}$  are oncofetal markers in invasive ductal breast carcinoma (Marquina et al., 1996). Two clinical studies have also shown that *ST8SIA1*, the GD3S encoding gene, the key enzyme that controls b- and c-series gangliosides biosynthesis, displayed higher expression among estrogen receptor (ER) negative breast cancer tumors (Ruckhäberle et al., 2008). Furthermore, *ST8SIA1* expression was associated with higher histological grade in ER negative tumors (Ruckhäberle et al., 2009).

We have recently developed a cellular model deriving from the triple negative (ER-, PR- and Her2-) MDA-MB-231 breast cancer cell line, expressing the human GD3S and showing a proliferative phenotype in absence of serum or exogenous growth factors (Cazet et al., 2009). The proliferative capacities of MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> clones in serum-free conditions directly proceed from the constitutive activation of c-Met receptor and downstream MEK/ERK and PI3K/Akt signaling pathways (Cazet et al., 2010). Moreover, GD3S expression not only promotes cell growth *in vitro* but also stimulates primary tumor growth in severe immunodef-

ciency (SCID) mice. Finally, micro-arrays analysis has shown a higher expression of *ST8SIA1* and *MET* in the basal subtype of human breast tumors (Cazet et al., 2010).

In the present study, we show by mass spectrometry analysis that  $G_{D2}$  is the main ganglioside expressed by MDA-MB-231  $GD3S^+$  clones whereas control MDA-MB-231 cells accumulate mainly  $G_{M3}$  and  $G_{M2}$ . We also demonstrate that  $G_{D2}$  is directly involved in the constitutive activation of c-Met in absence of the ligand HGF/SF, probably implicating specific interaction between c-Met receptor and the oligosaccharide moiety of  $G_{D2}$ .

## Material and methods

**Antibodies and reagents-** Anti-G<sub>D3</sub> R24 mAb was purchased from Abcam Company (Paris, France). Anti-G<sub>D2</sub> (mouse IgG3) 4G2 mAb (Portoukalian et al., 1989) and anti-G<sub>T3</sub> A2B5 mAb (Dubois et al., 1990) was kindly provided by Pr. Jacques Portoukalian (Department of Transplantation and Clinical Immunology, Claude Bernard University and Edouard Herriot Hospital, Lyon, France). The anti-G<sub>D2</sub> mAb was purified by chromatography on protein G affinity column (Sigma-Aldrich, Lyon, France) and protein concentration was determined by the Bio-Rad RC protein assay kit II. FITC-conjugated sheep anti-mouse IgG was purchased from GE Healthcare (Templemars, France). FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgM was purchased from Molecular Probes Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Small interfering RNAs (siRNAs) were manufactured by Dharmacon Company (Thermo Scientific, Illkirch, France) and QPCR primers were synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium).

**Cell Culture-** Cell culture reagents were purchased from Lonza (Levallois-Perret, France). The breast cancer cell line MDA-MB-231 was obtained from the American Type Cell Culture Collection (Rockville, MD, USA). These cells were routinely grown in monolayers and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin-streptomycin, at 37°C in 5 % CO<sub>2</sub>. MDA-MB-231 control (empty vector transfected) and MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> clones 4 and 11 were obtained as previously described (Cazet et al., 2009). The transfected cells were cultured in the presence of 1 mg/mL G418 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

**Extraction and preparation of glycolipids-** 20 dishes (10 cm diameter) of cultured cells were washed twice with ice-cold PBS and cells were scraped and homogenized. Cells were suspended in 200 µL of water and sonicated on ice. The resulting material was dried and then sequentially extracted three times by CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (2:1, v/v), three times by CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1, v/v) and three times by CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (1:2:0.8, v/v/v). Supernatants from the latter

extractions were pooled, dried, and subjected to a mild saponification in 0.1 M NaOH in CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1) at 37°C for 2 h and then evaporated to dryness (Schnaar, 1994). Sample was reconstituted in CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) and applied to a C<sub>18</sub> Sep-Pak cartridge (Waters, Milford, MA) equilibrated in the same solvent system. After washing with five volumes of CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v), GSL were eluted by two volumes of CH<sub>3</sub>OH, two volumes of CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1, v/v) and two volumes of CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (2:1, v/v).

**Mass spectrometry analysis of lipids/glycolipids-** Prior to mass spectrometry analysis, GSL were permethylated according to the Ciucanu and Kerek procedure (Ciucanu and Kerek, 1984). Briefly, compounds were incubated 2 h in a suspension of 200 mg/mL NaOH in dry DMSO (300 µL) and ICH<sub>3</sub> (200 µL). The methylated derivatives were extracted in CHCl<sub>3</sub> and washed several times with water. The reagents were evaporated and the sample was dissolved in CHCl<sub>3</sub> in the appropriate dilution. Mass spectrometry analysis of permethylated GSL was performed by matrix assisted laser desorption-ionization time-of-flight (MALDI-TOF) on a Voyager Elite reflectron mass spectrometer (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA), equipped with a 337 nm UV laser. Samples were prepared by mixing on tube 5 µL of diluted permethylated derivatives solution in CHCl<sub>3</sub> and 5 µL of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL dissolved in CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH (1:1, v/v)). The mixtures (2 µL) were then spotted on the target plate and air dried.

**RNA interference assays-** Cells were transfected with 200 nM duplexes siRNA targeting *B4GALNACT1* (L-011279-00) or a scramble sequence using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions with slight modifications. Cells were transfected in OptiMEM medium, in the absence of FBS. Two cycles of siRNA were done to achieve maximal knockdown. Cells were transfected twice with corresponding siRNAs at t = 0 h and t = 48 h and were collected for cell growth and phospho-array assays 24 h later and 48 h later for flow cytometry analysis.

**Reverse transcription and quantitative real-time PCR-** Total RNA was extracted using the Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to the protocol provided by the manufacturer. Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed using first strand cDNA synthesis kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany).

Quantitative real-time PCR (QPCR) and subsequent analysis were performed using the Mx-3005P Quantitative System (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands). Primer pairs for *B4GALNACT1* and *HPRT* (Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase) transcripts were previously described (Cazet et al., 2009). QPCR reactions (25 µL) were performed using 2X SYBR® Green Universal QPCR Master Mix (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) with 2 µL of 1:5 cDNA dilution and 300 nM final concentration of each primer. QPCR conditions were as follows: 95°C for 30 sec, 51°C for 45 sec, 72°C for 30 sec (40 cycles). Quantification was performed by the method described by Livak and Schmittgen (Livak and Schmittgen, 2001). Serial dilutions of the appropriate positive control cDNA sample were used to create standard curves for relative quantification and *B4GALNACT1* transcripts were normalized to *HPRT* expression. Assays were performed in triplicate and QPCR amplification was repeated 3 times. Negative control reactions were performed by replacing cDNA templates by sterile water or corresponding total RNA samples.

**Flow cytometry analysis-** Cells were detached by EDTA 4 mM in PBS and incubated for 1 h at 4°C with anti-gangliosides mAbs: anti-G<sub>D3</sub> (1:100), anti-G<sub>D2</sub> (1:75) and anti-G<sub>T3</sub> (1:10), diluted in PBS containing 0.5 % bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich). After washing with PBS/0.5 % BSA, cells were incubated for 1 h on ice with FITC-conjugated anti-mouse IgM or IgG. Controls were performed using appropriate isotype, as well as secondary antibodies alone. Cells were then subjected to flow cytometry analysis using a FACScalibur flow cytometer from Becton Dickinson (Le-Pont-de-Claix, France).

***Proliferation assays-*** Cell growth was analyzed using MTS reagent (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's procedure. For RNA interference assay,  $2 \times 10^3$  cells were seeded in 96-wells plates (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Germany) after two cycles of siRNA and then cultured during 5 days in DMEM serum-free medium. Cell numbers were determined after 1, 2, 3, 4 and 5 days by adding MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] to the wells 2 h before spectrophotometric reading (absorbance at 490 nm).

For cell growth inhibition assay, transfectant cells and control cells ( $2.5 \times 10^3$ ) were seeded in 96-wells plates and grown in DMEM culture medium containing 0.1 % FBS. After 12h, the medium was replaced and cells were treated with anti-G<sub>D2</sub> 4G2 mAb diluted to the indicated concentrations or with an irrelevant mAbs for 3 days.

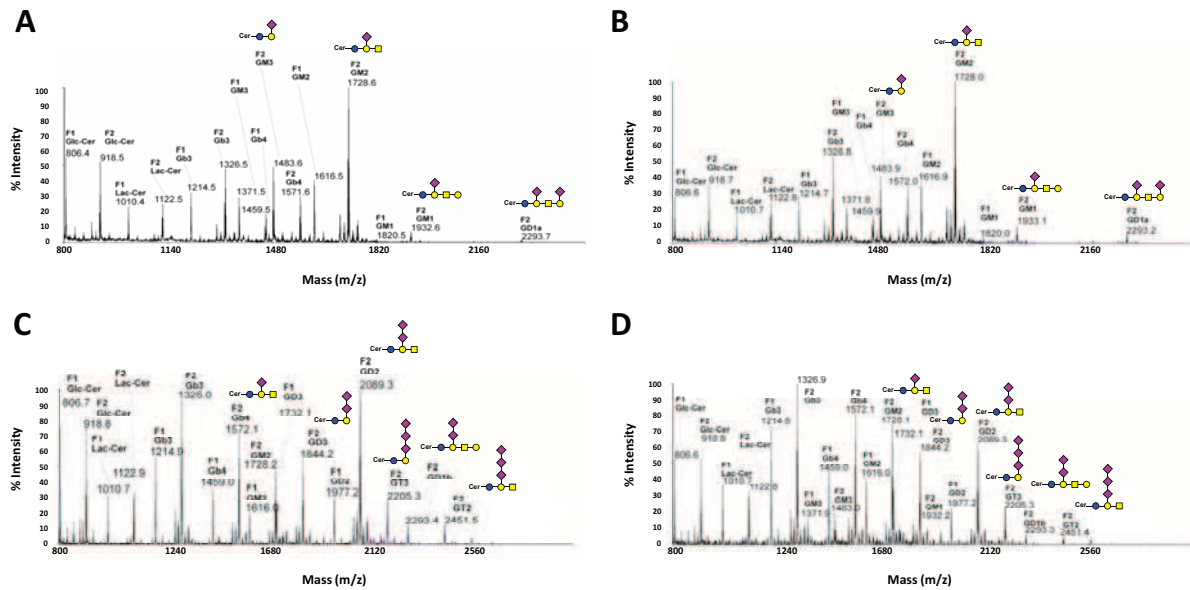
***Phospho-RTK array analysis-*** Two days after transfection with siRNA, cells were lysed in NP-40 lysis buffer (1 % NP-40, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10 % glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate and protease inhibitor cocktail tablet (Roche; Meylan, France)). The human Phospho-RTK array kit (R&D Systems Europe, Lille, France) was used according to the manufacturer's protocol. Briefly, the arrays were blocked in the appropriate blocking buffer and incubated overnight at 4°C with 200 µg of total protein extract. The arrays were washed three times and incubated with a horseradish-peroxidase-conjugated phospho-tyrosine detection antibody, 1 h at room temperature, before treated with ECL-Plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) and exposed to Kodak film (GE Healthcare).

***Statistical analyses-*** Student's t test was used for statistical analysis.  $p < 0.05$  was considered as statistically significant.

## Results

### Ganglioside contents of GD3S<sup>+</sup> MDA-MB-231 cells.

To precisely determine the ganglioside profile of GD3S<sup>+</sup> MDA-MB-231 cells, we analyzed the composition of GSL by mass spectrometry MALDI-TOF after permethylation (Fig. 2). Two ceramide isoforms is usually expressed in human tissues due to the substitution of the sphingosine by stearic acid C18:0 (F1) or lignoceric acid C24:0 (F2) (Fig. 2). As expected, wild type or empty vector-transfected MDA-MB-231 (control) cells only expressed a-series gangliosides, mainly G<sub>M2</sub> (Fig. 1A and 1B). Glucosylceramide (GlcCer) and LacCer precursors were also detected, as well as globo-series G<sub>b3</sub> and G<sub>b4</sub>. In the other hand, both GD3S<sup>+</sup> clones (clones 4 and 11) accumulated b- and c- series gangliosides, as it was previously shown by flow cytometry and confocal microscopy using different anti-ganglioside mAbs (Cazet et al., 2009). Interestingly, the G<sub>D2</sub> represents the most predominant complex ganglioside, whereas low amount of G<sub>D1b</sub>, G<sub>T3</sub> and G<sub>T2</sub> were detected (Figure 1C and 1D). These results fit well with the high expression of the β4GalNAc T1 in MDA-MB-231 cells, as previously shown by QPCR experiments (Cazet et al., 2009). In parallel, G<sub>M3</sub> and G<sub>M2</sub> expression levels were reduced in MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> cells compared to control cells. These results were confirmed by MALDI-TOF/TOF analysis (data not shown).



**Figure 2. MALDI-TOF analysis of permethylated GSL isolated from MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> cells.** Permethylated GSL isolated from (A) wild type MDA-MB-231 cells, (B) control MDA-MB-231 cells transfected with empty vector, (C) GD3S<sup>+</sup> MDA-MB-231 clone 4 and (D) clone 11 were analyzed by MALDI-TOF on a Voyager Elite reflectron mass spectrometer equipped with a 337 nm UV laser. Gangliosides from b- or c-series were not detected in wild type and control cells, whereas complex gangliosides containing 2 to 3 sialic acids residues (i.e. G<sub>D3</sub>, G<sub>D2</sub>, G<sub>T3</sub>, G<sub>T2</sub>) were detected in MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> cells. Cer: ceramide; LacCer: lactosylceramide; GlcCer: glucosylceramide; F1: Cer = *N*-stearyl-sphingosine; F2: Cer = *N*-lignoceryl-sphingosine.

**SiRNA inhibition of β4GalNAc T1 expression strongly reduces c-Met activation and reverses the proliferative phenotype of GD3S<sup>+</sup> cells.**

In order to determine the role of G<sub>D2</sub> in the activation of c-Met and proliferative phenotype, the G<sub>A2</sub>/G<sub>M2</sub>/G<sub>D2</sub>/G<sub>T2</sub> synthase (β4GalNAc T1) expression was inhibited in GD3S<sup>+</sup> cells with siRNA sequences. The ability of the siRNA to specifically silence the *B4GALNACT1* gene was evaluated by QPCR and flow cytometry analysis. In comparison with control siRNA, the silencing of the G<sub>A2</sub>/G<sub>M2</sub>/G<sub>D2</sub>/G<sub>T2</sub> synthase resulted in 90 %, 87 % and 90 % decrease of relative β4GalNAc T1 mRNA expression in MDA-MB-231 control, clone 4 and 11, respectively (data not shown). In parallel, siRNA efficiently reduced the expression of G<sub>D2</sub> in the both clones, whereas G<sub>D3</sub> and G<sub>T3</sub> expression were increased (Fig. 2A). SiRNA sequences did not modify the ganglioside profile of control cells (Fig. 2A). Silencing of G<sub>A2</sub>/G<sub>M2</sub>/G<sub>D2</sub>/G<sub>T2</sub> syn-

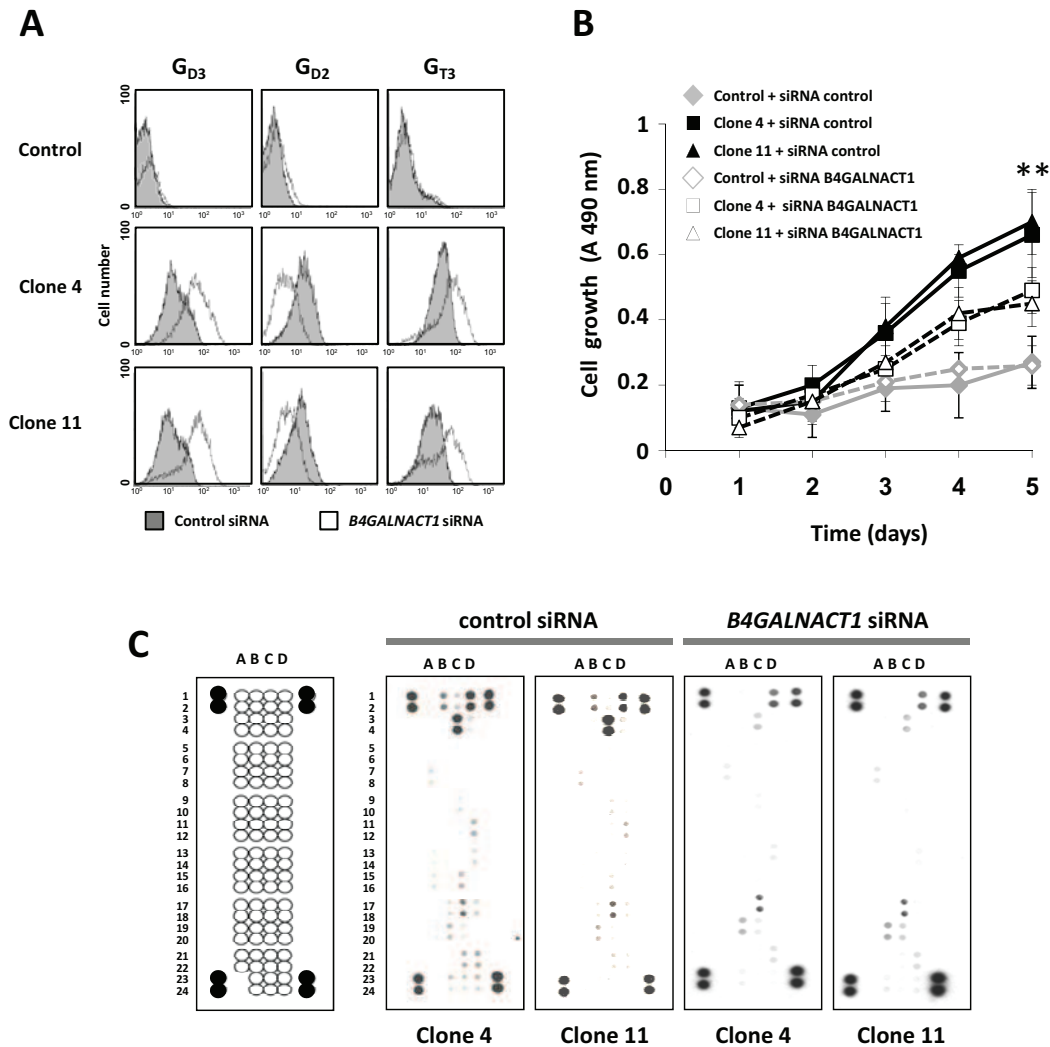


these expression decreased proliferation of both GD3S<sup>+</sup> clones during the first 3 days of culture, demonstrating the involvement of GalNAc-substituted complex gangliosides, mainly GD<sub>2</sub>, in GD3S<sup>+</sup> cells proliferation in deprivation conditions (Fig. 2B).

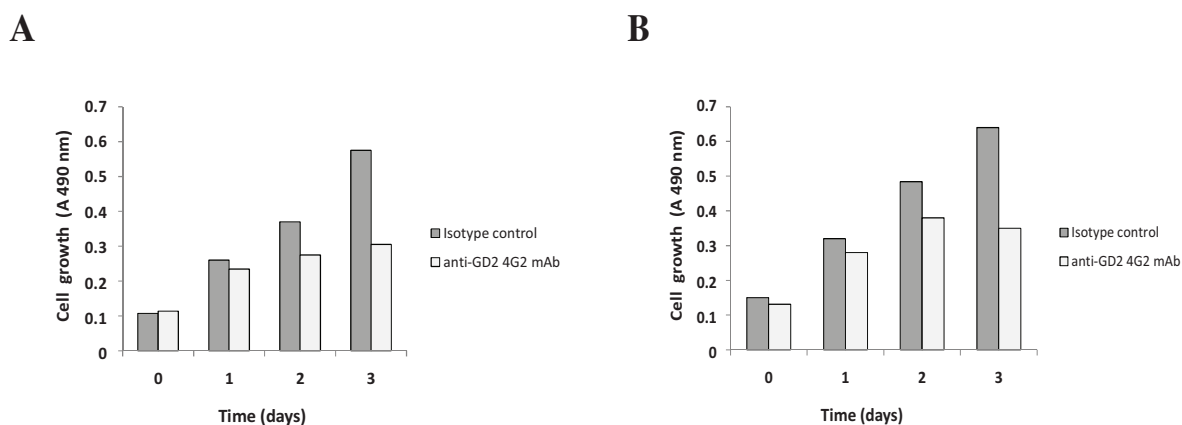
The phosphorylation status of 42 RTKs was simultaneously examined in MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> cells 24 h after transfection with corresponding siRNA using phospho-RTK arrays. As shown in Fig. 2C, inhibition of G<sub>A2</sub>/G<sub>M2</sub>/G<sub>D2</sub>/G<sub>T2</sub> synthase expression strongly decreased the phosphorylation of c-Met (coordinates C3, C4) compared to MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> cells transfected with control siRNA. A similar decrease of Tie-2 (coordinates B1, B2) and a slight decrease of EGFR (coordinates D1, D2) phosphorylation was also observed (Fig. 2C).

#### **Inhibition of cell growth by anti-G<sub>D2</sub> mAb.**

Effect of anti-G<sub>D2</sub> mAb on cell proliferation was then analyzed by adding the specific antibody to the culture medium. The high proliferative capacity of the MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> was strongly decreased in the presence of the anti-G<sub>D2</sub> mAb 4G2. The inhibition effects were dependent on the concentration of the added antibody and became significant even at 15 µg/mL (Fig. 4).



**Figure 3- SiRNA inhibition of  $\beta 4$ GalNAc T1 strongly reduces c-Met activation and reverses the proliferative phenotype of  $GD3S^+$  cells. A. Inhibition of  $G_{D2}$  expression.** Control and  $GD3S^+$  clones were transfected with siRNA targeting *B4GALNACT1* or with a scramble sequence. Cells were harvested and incubated with anti- $G_{D3}$ , anti- $G_{D2}$  and anti- $G_{T3}$  mAbs. The grey peaks: control siRNA; open peaks: *B4GALNACT1* siRNA. **B: Inhibition of  $G_{D2}$  expression reduces  $GD3S^+$  clones proliferation in serum-free conditions.** One day after transfection, cells were seeded in 96-wells plates and cultured during 5 days in serum-free medium as described in *Material and Methods* section. Cell growth was analyzed by MTS assay. Counting was performed in 16 wells and data are the mean of 3 independent manipulations. \*\*  $p < 0.01$ ,  $GD3S^+$  vs control. **C. Phospho-array analysis.** Total cell lysates from control,  $GD3S^+$  clone 4 and clone 11, transfected with specific siRNA targeting *B4GALNACT1* or with control sequence, were subjected to phospho-RTK array. Phospho-RTK Array coordinates are given on the left side of the figure. Black dots represent Phospho-Tyrosine Positive Control; A1, A2: EphA6; A3, A4: EphA7; A5, A6: EphB1; A7, A8: EphB2; A9, A10: EphB4; A11, A12: EphB6; A13, A14: Mouse IgG1 Negative Control; A15, A16: Mouse IgG2A Negative Control; A17, A18: Mouse IgG2B Negative Control; A19, A20: Goat IgG Negative Control; A21, A22: PBS Negative Control; B1, B2: Tie-2; B3, B4: TrkA; B5, B6: TrkB; B7, B8: TrkC; B9, B10: VEGFR1; B11, B12: VEGFR2; B13, B14: VEGFR3; B15, B16: MuSK; B17, B18: EphA1; B19, B20: EphA2; B21, B22: EphA3; B23, B24: EphA4; C1, C2: Mer; C3, C4: c-Met; C5, C6: MSPR; C7, C8: PDGFR $\alpha$ ; C9, C10: PDGFR $\beta$ ; C11, C12: SCFR; C13, C14: Flt-3; C15, C16: M-CSFR; C17, C18: c-Ret; C19, C20: ROR1; C21, C22: ROR2; C23, C24: Tie-1; D1, D2: EGFR; D3, D4: ErbB2; D5, D6: ErbB3; D7, D8: ErbB4; D9, D10: FGFR1; D11, D12: FGFR2 $\alpha$ ; D13, D14: FGFR3; D15, D16: FGFR4; D17, D18: Insulin R; D19, D20: IGF-I R; D21, D22: Axl; D23, D24: Dtk.



**Figure 4: Inhibition of the cell growth of MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> by using an anti-G<sub>D2</sub> mAb.** Cell proliferation of clones 4 (A) and clone 11 (B) over-expressing GD3S treated with 15  $\mu$ g/mL mAb 4G2 in serum-free conditions was determined by MTS assay. Each measure was performed in 8 wells and data are mean of 2 independent manipulations.

## Discussion

The pharmacological and genetic control of gangliosides expression has been applied during the past years to study the influence of b-series gangliosides on cell behavior, including cell proliferation, and accumulating evidences indicate the tumor-specific and malignant phenotype-associated expression of G<sub>D2</sub>. For example, G<sub>D2</sub> expression is required and sufficient to drive human small cell lung cancer (SCLC) proliferation, migration and invasion *in vitro* as well as tumor growth (Ko et al., 2006). In this context, the disialoganglioside G<sub>D2</sub> represents a valid therapeutic target for cancer immunotherapy (Ragupathi et al., 2003; Yvon et al., 2009; Lo et al., 2010).

Growth factor receptors are characterized by a common susceptibility to gangliosides, which modulate in glycosynaptic microdomains the receptor-associated tyrosine kinase activity (Miljan and Bremer, 2002; Kaucic et al., 2006). Studies conducted over the past 10 years have demonstrated inhibition of c-Met signaling by a-series gangliosides. G<sub>D1a</sub> inhibits HGF-induced motility of cancer cells through suppression of tyrosine phosphorylation of c-Met

(Hyuga et al., 2001).  $G_{M3}$  and  $G_{M2}$  form heterodimers that specifically interact with tetraspanin (CD82) and such complexes inhibit c-Met and its cross-talk with integrins, providing a basis for control of cell proliferation and invasiveness (Todeschini et al., 2007; 2008b). In parallel, we have demonstrated that the expression of GD3S and complex gangliosides in MDA-MB-231 cells leads to a proliferative phenotype by a positive regulation of c-Met phosphorylation and subsequent signal transduction MEK/ERK and PI3K/Akt pathways (Cazet et al., 2010). Consequently, these studies seem to indicate that the ganglioside-dependent regulation of c-Met is related to ganglioside sialylation status, a-series inhibiting c-Met phosphorylation, whereas b- or c-series gangliosides strongly activate the receptor in a ligand-independent manner.

Here we show by mass spectrometry analysis of total GSLs that  $G_{D2}$  is the main ganglioside expressed by MDA-MB-231  $GD3S^+$  cells. SiRNAs silencing of the  $G_{A2}/G_{M2}/G_{D2}/G_{T2}$  synthase reversed the proliferative phenotype due to the strong decrease of c-Met phosphorylation. Accumulation of other b- and c-series gangliosides at the plasma membrane,  $G_{D3}$  and  $G_{T3}$  respectively, has no effect on c-Met activation. Altogether, these results show that  $G_{D2}$  contributes to the constitutive activation of c-Met axis, independently on HGF binding, leading to enhanced signaling, as observed in basal subtype of breast cancers (Ponzo et al., 2009; Graveel et al., 2009).

Even if the interactions between  $G_{D2}$  and c-Met remain to be demonstrated, the inhibition of cell proliferation by anti- $G_{D2}$  mAb clearly indicates the role of the oligosaccharide moiety of  $G_{D2}$  in c-Met activation.  $G_{D2}$ -dependent c-Met activation might be achieved by the control of tyrosine kinase activity by a direct binding through carbohydrate-carbohydrate interactions between  $G_{D2}$  and *N*-glycosylated chains of the receptor, as it has been previously demonstrated for the EGFR (Yoon et al., 2006; Kawashima et al., 2009). On the other side, the  $G_{D2}$ -induced c-Met constitutive activation could be also dependent on a cross-talk between  $G_{D2}$ , c-

Met and other signaling molecules. Such complexes have been reported to modulate RTKs activity (Todeschini et al., 2007; 2008b; Park et al., 2009). Cross-communication between integrins and RTKs is thought to be required for maximal activation of the Ras-MAPK signal transduction pathway that drives cell proliferation. In parallel, the importance of ganglioside composition in defining integrin function is also well documented (Cheresh et al., 1986; Wang et al., 2001; 2002). G<sub>D2</sub> physically interacts with integrin and focal adhesion kinase (FAK) to activate the downstream signaling pathway MEK/ERK, playing pivotal role on cell proliferation and malignant properties of SCLC (Yoshida et al., 2001; Aixinjueluo et al., 2005). In this context, the proliferative phenotype of MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> cells could be due to the formation of a tertiary complex consisting of G<sub>D2</sub>, integrin and c-Met, which could contribute to the constitutive *trans*-phosphorylation of the receptor and reinforce the malignant properties of these cells. Eventual interactions between disialoganglioside G<sub>D2</sub> and integrin should be clarified using different approaches, such as co-immunoprecipitation, cross-linking and confocal microscopy, to further understand the mechanism of specific c-Met activation.

Interestingly, incubation with anti-G<sub>D2</sub> mAb seems to induce apoptosis of MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> cells after 3 days of culture in deprivation conditions (data not shown). Molecular mechanisms inducing the apoptosis of cancer cells by anti-G<sub>D2</sub> mAb were previously investigated. Treatment of M21 melanoma cells with anti-G<sub>D2</sub> mAb causes cell rounding and detachment from a fibronectin substrate (Cheresh and Klier, 1986). Furthermore, G<sub>D2</sub> positive lung cells treated with anti-G<sub>D2</sub> mAb undergo anoikis through the conformational changes of integrin molecules, subsequent FAK dephosphorylation and p38/MAPK activation (Aixinjueluo et al., 2005). The mechanism of apoptosis induction needs to be clarified in MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> cells but should provide a new possibility for immunotherapy application in drug-resistant breast cancer basal subtype.

In conclusion, by using a cellular model that mimic the *in vivo* situation that could occur in basal subtype breast cancer tumors expressing the GD3S, we have demonstrated that the oligosaccharide part of G<sub>D2</sub> specifically activates c-Met and subsequent transduction pathways, enhancing the oncogenic effect of c-Met receptor. This underlies the interest to develop such cellular models and shed light on the effect of ganglioside expression on breast cancer cell signaling.

### **Acknowledgments**

This work was supported the Association pour la Recherche sur le Cancer (grant n°7936 and 5023 (PD), and grant n°1137 (DT)), la Ligue régionale contre le Cancer (PD & DT) and l'ANR - Young investigator program (DT).

## References

- Aixinjueluo W., Furukawa K., Zhang Q., Hamamura K., Tokuda N., Yoshida S., Ueda R., Furukawa K. 2005. Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis. *J Biol Chem.* 280(33):29828-29836.
- Birklé S, Zeng G, Gao L, Yu RK, Aubry J. 2003. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie.* 85: 455-63.
- Cazet A, Groux-Degroote S, Teylaert B, Kwon KM, Lehoux S, Slomianny C, Kim CH, Le Bourhis X, Delannoy P. 2009. GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol Chem.* 390(7): 601-9.
- Cazet A, Lefebvre J, Adriaenssens E, Julien S, Bobowski M, Grigoriadis A, Tutt A, Tulasne D, Le Bourhis X, Delannoy P. 2010. GD3 synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation. *Mol Cancer Res.* In press. PMID: 20889649.
- Chapman PB., Wu D., Ragupathi G., Lu S., Williams L., Hwu WJ., Johnson D., Livingston PO. 2004. Sequential immunization of melanoma patients with GD3 ganglioside vaccine and anti-idiotypic monoclonal antibody that mimics GD3 ganglioside. *Clin Cancer Res.* 10(14):4717-4723.
- Cheresh DA, Klier FG. 1986. Disialoganglioside GD2 distributes preferentially into substrate-associated microprocesses on human melanoma cells during their attachment to fibronectin. *J Cell Biol.* 102(5):1887-97.
- Cheresh DA, Pierschbacher MD, Herzig MA, Mujoo K. 1986. Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in the attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J Cell Biol.* 102(3):688-96
- Ciucanu I, Kerek F. 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res.* 131(2): 209-17.
- Dyatlovitskaya EV, Kandyba AG. 2006. Role of biologically active sphingolipids in tumor growth. *Biochemistry.* 71:10-7.
- Dubois C, Manuguerra JC, Hauttecoeur B, Maze J. 1990. Monoclonal antibody A2B5, which detects cell surface antigens, binds to ganglioside GT3 (II3 (NeuAc)3LacCer) and to its 9-O-acetylated derivative. *J Biol Chem.* 265:2797-803.
- Fukumoto S, Mutoh T, Hasegawa T, Miyazaki H, Okada M, Goto G, Furukawa K, Urano T. 2000. GD3 synthase gene expression in PC12 cells results in the continuous activation of TrkA and ERK1/2 and enhanced proliferation. *J Biol Chem.* 275(8):5832-8.
- Furukawa K, Hamamura K, Aixinjueluo W, Furukawa K. 2006. Biosignals modulated by tumor-associated carbohydrate antigens: novel targets for cancer therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 1086:185-98.
- Graveel CR, DeGroot JD, Su Y, Koeman J, Dykema K, Leung S, Snider J, Davies SR, Swiatek PJ, Cottingham S, Watson MA, Ellis MJ, Sigler RE, Furge KA, Vande Woude GF. 2009. Met induces diverse mammary carcinomas in mice and is associated with human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A;* 106(31):12909-12914.
- Gross N, Beck D, Portoukalian J, Favre S, Carrel S. 1989. New anti-GD2 monoclonal antibodies produced from gamma-interferon-treated neuroblastoma cells. *Int J Cancer.* 43:665-71.

- Hakomori SI. 2002. Inaugural Article: The glycosynapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(1): 225-32.
- Hyuga S., Kawasaki N., Hyuga M., Ohta M., Shibayama R., Kawanishi T., Yamagata S., Yamagata T., Hayakawa T. 2001. Ganglioside GD1a inhibits HGF-induced motility and scattering of cancer cells through suppression of tyrosine phosphorylation of c-Met. *Int J Cancer*. 94(3):328-334.
- Kaucic K, Liu Y, Ladisch S. 2006. Modulation of growth factor signaling by gangliosides: positive or negative? *Methods Enzymol*. 417:168-85.
- Kawashima N, Yoon SJ, Itoh K, Nakayama K. 2009. Tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor is regulated by GM3 binding through carbohydrate to carbohydrate interactions. *J Biol Chem*. 284(10):6147-55.
- Ko K, Furukawa K, Takahashi T, Urano T, Sanai Y, Nagino M, Nimura Y, Furukawa K. 2006. Fundamental study of small interfering RNAs for ganglioside GD3 synthase gene as a therapeutic target of lung cancers. *Oncogene*. 25(52):6924-35.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4): 402-8.
- Lo AS., Ma Q., Liu DL., Junghans RP. 2010. Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor zeta designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors. *Clin Cancer Res*. 16(10):2769-2780.
- Marquina G, Waki H, Fernandez LE, Kon K, Carr A, Valiente O, Perez R, Ando S. 1996. Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res*. 56(22): 5165-71.
- Miljan EA, Bremer EG. Regulation of growth factor receptors by gangliosides. 2002. *Sci STKE*. 2002(160):re15
- Navid F, Santana VM, Barfield RC. 2010. Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Curr Cancer Drug Targets*. 10(2):200-9.
- Park SY, Yoon SJ, Freire-de-Lima L, Kim JH, Hakomori SI. 2009. Control of cell motility by interaction of gangliosides, tetraspanins, and epidermal growth factor receptor in A431 versus KB epidermoid tumor cells. *Carbohydr Res*. 344(12):1479-86.
- Ponzo MG, Lesurf R, Petkiewicz S, O'Malley FP, Pinnaduwege D, Andrulis IL, Bull SB, Chughtai N, Zuo D, Souleimanova M, Germain D, Omeroglu A, Cardiff RD, Hallett M, Park M. 2009. Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106(31):12903-12908.
- Portoukalian J., David M.J., Gain P., Richard M. 1993. Shedding of GD2 ganglioside in patients with retinoblastoma. *Int. J. Cancer*. 53(6): 948-951.
- Ragupathi G., Livingston PO., Hood C., Gathuru J., Krown SE., Chapman PB., Wolchok JD., Williams LJ., Oldfield RC., Hwu WJ. (2003). Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res*. 9(14):5214-5220.
- Ruckhäberle E, Rody A, Engels K, Gaetje R, von Minckwitz G, Schiffmann S, Grösch S, Geisslinger G, Holtrich U, Karn T, Kaufmann M. 2008. Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat*. 112(1): 41-52.
- Ruckhäberle E, Karn T, Rody A, Hanker L, Gätje R, Metzler D, Holtrich U, Kaufmann M. 2009. Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside



- GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 135(8): 1005-13.
- Schnaar RL. 1994. Isolation of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* 230: 348-70.
- Scott AM., Liu Z., Murone C., Johns TG., MacGregor D., Smyth FE., Lee FT., Cebon J., Davis ID., Hopkins W., Mountain AJ., Rigopoulos A., Hanai N., Old LJ. 2005. Immunological effects of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immun.* 22:3-15.
- Tettamanti G. 2004. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj J.* 20(5): 301-317.
- Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, Hakomori SI. 2007. Ganglioside GM2-tetraspanin CD82 complex inhibits met and its cross-talk with integrins, providing a basis for control of cell motility through glycosynapse. *J Biol Chem.* 282(11):8123-8133.
- Todeschini AR, Hakomori SI. 2008a. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochim Biophys Acta.* 1780(3): 421-33.
- Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, Hakomori SI. 2008b. Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(6):1925-1930.
- Wang XQ, Sun P, Paller AS. 2001. Inhibition of integrin-linked kinase/protein kinase B/Akt signaling: mechanism for ganglioside-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 276(48):44504-11.
- Wang XQ, Sun P, Paller AS. 2002. Ganglioside modulation regulates epithelial cell adhesion and spreading *via* ganglioside-specific effects on signaling. *J Biol Chem.* 277(43):40410-9.
- Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, Sandhoff K, Proia RL. 1999. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(16):9142-7
- Yoon SJ, Nakayama K, Hikita T, Handa K, Hakomori SI. 2006. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with *N*-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(50):18987-91.
- Yoshida S., Fukumoto S., Kawaguchi H., Sato S., Ueda R., Furukawa K. 2001. Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res.* 61(10):4244-4252.
- Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM. 2010. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med.* 363(14):1324-34
- Yvon E., Del Vecchio M., Savoldo B., Hoyos V., Dutour A., Anichini A., Dotti G., Brenner MK. 2009. Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells. *Clin Cancer Res.* 15(18):5852-5860.
- Zeng G, Yu RK. 2008. Cloning and transcriptional regulation of genes responsible for synthesis of gangliosides. *Curr Drug Targets.* 9: 317-24.

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**



Les travaux réalisés au cours de ma thèse ont permis de mettre en lumière un nouveau mécanisme d'activation de l'oncogène c-Met dépendant des gangliosides complexes, et plus particulièrement du  $G_{D2}$ . Au cours de cette discussion, nous reviendrons tout d'abord sur le rôle des gangliosides dans le contrôle de l'activité des RTKs, avec un accent particulier sur le récepteur c-Met. Nous envisagerons les différents mécanismes moléculaires permettant d'expliquer l'activation spécifique de c-Met. Nous discuterons ensuite de l'effet de l'expression de la  $G_{D3}$  synthétase sur le développement de la tumeur mammaire et des métastases. Enfin, nous évoquerons l'intérêt de cibler les gangliosides et/ou c-Met dans l'approche thérapeutique du cancer du sein. Dans chacune de ces parties, nous discuterons des perspectives envisageables dans la continuité de ces travaux.

## **I. Le $G_{D2}$ : activateur spécifique du récepteur c-Met dans les cellules mammaires triple-négative MDA-MB-231**

Depuis plusieurs années, le  $G_{D3}$  et le  $G_{D2}$  sont décrits comme des marqueurs oncofœtaux d'intérêt, impliqués dans la carcinogenèse des cellules d'origine neuro-ectodermique et du cancer du poumon à petites cellules. A ce titre, ils sont considérés comme des facteurs de mauvais pronostic. L'étude des mécanismes moléculaires par lesquels ces gangliosides renforcent l'agressivité tumorale est donc essentielle, bien que relativement peu de travaux y aient été consacrés.

Des travaux antérieurs à ma thèse indiquaient une surexpression du  $G_{D3}$ , du 9-*O*-acétyl- $G_{D3}$  et du 9-*O*-acétyl- $G_{T3}$  dans les carcinomes canaux infiltrants (Marquina *et al.*, 1996). Cette surexpression s'accompagne d'une augmentation d'expression du gène *ST8SIA1*, codant la  $G_{D3}$  synthétase (GD3S), dans les tumeurs mammaires ER négatives (Ruckhäberle *et al.*, 2008). Au travers ce projet de thèse, il nous est apparu important d'étudier les effets de l'expression de la  $G_{D3}$  synthétase sur l'agressivité des cellules cancéreuses de sein.

### **I. A. Rappel des résultats obtenus**

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans le modèle MDA-MB-231. Ces cellules mammaires appartiennent au sous-groupe *basal-like*, de mauvais pronostic (Subik *et al.*, 2010). Initialement prélevées à partir d'une effusion pleurale, ces cellules se caractérisent par une capacité proliférative et migratoire importante, par une résistance aux apoptogènes et

sont capables de former des adénocarcinomes peu différenciés de grade III lorsqu'elles sont inoculées chez des souris immunodéprimées (Cailleau *et al.*, 1974 ; Price *et al.*, 1990). Ainsi, ces cellules hormono-indépendantes sont caractéristiques d'un stade avancé de la maladie.

Malgré l'agressivité préexistante de cette lignée, nous avons démontré que l'expression de la G<sub>D3</sub> synthétase renforce les capacités prolifératives et migratoires des cellules MDA-MB-231, par un mécanisme d'activation spécifique du récepteur c-Met et des voies de signalisation intracellulaire MEK/ERK et PI3K/Akt, dépendant de l'expression du G<sub>D2</sub> (Cazet *et al.*, 2009 ; 2010). Par ailleurs, des résultats préliminaires mettent également en évidence une surexpression de la protéine de survie Bcl-2 dans les clones MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup>, permettant à ces cellules de résister à l'apoptose en absence de facteurs de croissance. D'autre part, ce phénotype prolifératif a été confirmé *in vivo* par des expériences de xénogreffes chez des souris immunodéficientes, les cellules MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> présentant une croissance tumorale accrue par rapport aux cellules contrôle (Cazet *et al.*, 2010).

### **I. B. Spécificité d'activation du récepteur c-Met**

Cette étude nous a permis d'apporter un regard nouveau sur la notion de spécificité d'activation des RTKs par les gangliosides.

L'analyse simultanée de la phosphorylation de 42 récepteurs par le système *Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array* nous a permis de mettre en évidence une activation constitutive du récepteur c-Met, en absence d'HGF, dans les clones GD3S<sup>+</sup> (**Article 2**, Cazet *et al.*, 2010). Bien que les récepteurs à l'EGF, Ret et Tie-2 soient également légèrement activés, la majorité des RTKs demeurent sous forme inactive en condition de sevrage, ce qui montre un effet spécifique des gangliosides complexes sur le récepteur c-Met dans les cellules MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup>. En particulier, la forme phosphorylée du récepteur au NGF (*Nerve Growth Factor*) TrkA n'est pas retrouvée dans les clones GD3S<sup>+</sup> alors que son activation constitutive a été démontrée dans des cellules de phéochromocytome de rat PC12 GD3S<sup>+</sup> (Fukumoto *et al.*, 2000). L'activation constitutive des RTKs dans les cellules GD3S<sup>+</sup> semble donc gouvernée par un mécanisme moléculaire fin, dépendant de la nature des gangliosides exprimés par la cellule, voire de leur localisation subcellulaire. Ainsi, des travaux récents du laboratoire montrent que l'expression de la GD3S dans des cellules de cancer du sein MCF-7 provoque l'expression de G<sub>D1b</sub> à la membrane plasmique. Ces cellules MCF-7 GD3S<sup>+</sup> présentent des capacités migratoires augmentées mais ne prolifèrent pas en absence de sérum. De même,

l'expression de la GD3S dans des cellules d'hépatocarcinome humain se traduit par l'augmentation de l'expression du G<sub>D3</sub> à la fois à la membrane plasmique et au niveau des membranes mitochondriales. Ces cellules deviennent sensibles à l'hypoxie, induisant la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) et la mort cellulaire (Lluis *et al.*, 2009). L'effet pro-apoptotique du G<sub>D3</sub> mitochondrial a d'ailleurs été démontré pour de nombreux types cellulaires (Malisan et Testi, 2002b ; Bektas et Spiegel, 2004 ; Malisan et Testi, 2005). Il est donc essentiel de déterminer précisément par quel mécanisme et par quel(s) ganglioside(s) le récepteur c-Met est activé.

Plusieurs études indépendantes ont tenté de déterminer les mécanismes moléculaires de régulation des RTKs par les gangliosides, soit par l'expression spécifique de ces gangliosides à la membrane cellulaire ou par ajout de gangliosides exogènes dans le milieu de culture (Miljan et Bremer, 2002a ; Kaucic *et al.*, 2006). Même si ces mécanismes restent encore à définir avec précision, trois modèles distincts semblent émerger : (i) un contrôle de l'activation du récepteur par une interaction ganglioside-ligand comme cela a été montré pour le FGF et le G<sub>M1</sub> (Rusnati *et al.*, 2002), (ii) une régulation de la dimérisation du récepteur par les gangliosides tel que le G<sub>M3</sub> qui inhibe la dimérisation de l'EGFR (Miljan *et al.*, 2002b) ou (iii) une régulation de l'activité dépendante de la mobilité et de la localisation du récepteur au sein des glycosynapses comme c'est le cas pour le récepteur à l'insuline et le G<sub>M3</sub> dans les microdomaines riches en glycosphingolipides (Kabayama *et al.*, 2007).

Bien qu'il existe de nombreuses études portant sur la régulation de l'EGFR, du PDGFR et du FGFR par les gangliosides, peu de données sont disponibles sur les relations entre ces GSLs et le récepteur c-Met. Les gangliosides de la série a- semblent globalement réguler négativement la phosphorylation de c-Met. Ainsi, l'expression du G<sub>D1a</sub> inhibe l'activation de c-Met par son ligand HGF, réduisant ainsi la croissance, la migration et la dispersion de différents types de cellules cancéreuses (Hyaga *et al.*, 2001). En parallèle, l'équipe du Pr Sen-Itiroh Hakomori a démontré que les interactions entre le suppresseur de tumeur CD82, la chaîne  $\alpha 3$  des intégrines et le récepteur c-Met sont régulées au sein des glycosynapses par le complexe G<sub>M3</sub>/G<sub>M2</sub>. Ce complexe G<sub>M3</sub>/G<sub>M2</sub> interagit spécifiquement avec la tétraspanine transmembranaire CD82, inhibant ainsi la *trans*-phosphorylation du récepteur dépendante des intégrines, le recrutement de la molécule clef Grb2 et l'activation des voies PI3K/Akt et MEK/ERK (Todeschini *et al.*, 2007 ; 2008b ; Zöllner *et al.*, 2009 ; Lai *et al.*, 2009).

Nos travaux ont montré pour la première fois que l'expression de la GD3S et des gangliosides complexes induit une activation constitutive et spécifique de l'oncogène c-Met, renforçant ainsi les capacités prolifératives des cellules MDA-MB-231. Cette régulation positive diffère donc du contrôle exercé par les gangliosides de la série a-. Pour compléter ces résultats novateurs, nous avons ensuite tenté de déterminer quel type de ganglioside(s) était responsable de ce phénotype.

### **I. C. Le G<sub>D2</sub> : principal acteur de l'activation de c-Met et de l'acquisition du phénotype prolifératif des cellules MDA-MB-231**

Les résultats présentés dans l'article 3 démontrent que le G<sub>D2</sub>, ganglioside majoritaire des clones GD3S<sup>+</sup>, est spécifiquement impliqué dans le contrôle de l'activation de c-Met. En effet, l'inhibition de l'expression du G<sub>D2</sub> par ARN interférence de la β4-GalNAc T1 (G<sub>M2</sub>/G<sub>D2</sub> synthétase) réduit de manière significative la phosphorylation de c-Met et la prolifération des clones GD3S<sup>+</sup>. De plus, des expériences de compétition à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie saccharidique du G<sub>D2</sub> permettent d'inhiber la prolifération des cellules GD3S<sup>+</sup>. En conséquence, nous pouvons conclure que la structure oligosaccharidique du G<sub>D2</sub>, chaîne disialylée porteuse d'un résidu de GalNAc, joue un rôle essentiel dans la spécificité d'activation du récepteur c-Met.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer le lien spécifique entre c-Met et le G<sub>D2</sub> dans les cellules mammaires GD3S<sup>+</sup>.

La spécificité d'activation de c-Met pourrait être liée à une interaction directe avec le G<sub>D2</sub>, *via* des interactions osidiques. La forme mature du récepteur porte des chaînes N-glycosylées (Giordano *et al.*, 1989a ; Faletto *et al.*, 1992). L'activation de c-Met pourrait donc être dépendante des interactions entre la partie oligosaccharidique du G<sub>D2</sub> et les résidus des chaînes N-glycanniques portées par le récepteur. En effet, ce type d'interaction participe au contrôle de la dimérisation de l'EGFR (Yoon *et al.*, 2006 ; Kawashima *et al.*, 2009). Des expériences de Pull-Down à l'aide de billes de polystyrène recouvertes de G<sub>D2</sub> (collaboration avec le Pr Sen-Itiroh Hakomori, Washington State University, Seattle, USA) de lysats protéiques de cellules MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup>, suivie d'une analyse en Western-Blot à l'aide d'anticorps anti-c-Met pourraient permettre de mettre en évidence ce type d'interaction. Cette approche, utilisée avec succès ces dernières années, permet de contourner les difficultés liées aux expériences de pontage à l'aide de réactifs bi-fonctionnels et de co-immunoprécipitation (co-IP) d'un GSL et

d'une protéine (Yoon *et al.*, 2006 ; Todeschini *et al.*, 2007 ; Kawashima *et al.*, 2009). Dans le cas où ce type d'interaction serait mis en évidence, l'activité lectinique putative de c-Met pourra être confirmée par l'analyse des interactions du domaine extracellulaire de c-Met sur puce à oligosaccharides en collaboration avec le Pr Ten Feizi (Imperial College, Londres, Royaume-Uni) (Feizi *et al.*, 2003 ; Feizi et Chai, 2004). Des expériences de co-localisation par microscopie confocale pourront aussi être envisagées.

La spécificité d'activation de c-Met par le G<sub>D2</sub> pourrait également s'expliquer par des interactions de type indirect. En effet, les gangliosides peuvent interagir par l'intermédiaire de leur chaîne oligosaccharidique avec des lectines telles que des Siglecs, des galectines ou encore des sélectines (Schauer, 2009 ; Lopez et Schnaar, 2009 ; Kopitz *et al.*, 1998). De plus, au sein des glycosynapses, les gangliosides interagissent avec un ensemble de protéines incluant des molécules de signalisation cytoplasmique (RhoA, Ras, Cas, c-Src), les tétraspanines, les intégrines et les RTKs (Hakomori, 2002 ; Todeschini et Hakomori, 2008a ; Hakomori, 2010). Plusieurs arguments sont en faveur du rôle central du G<sub>D2</sub> dans l'acquisition de la malignité des cellules tumorales par l'intermédiaire d'interactions G<sub>D2</sub> / intégrines (**Figure 24**) (Yoshida *et al.*, 2001 ; 2002 ; Aixinjueluo *et al.*, 2005). La liaison entre c-Met et la chaîne  $\beta 4$  des intégrines étant essentielle pour le relais des signaux oncogéniques dans les cellules mammaires, il est donc possible que la phosphorylation constitutive du récepteur passe par la formation d'un complexe supramoléculaire G<sub>D2</sub> / intégrine  $\beta 4$  / c-Met (Bertotti *et al.*, 2005 ; 2006 ; Corso *et al.*, 2005 ; Lai *et al.*, 2009). Des expériences de co-IP permettraient de déterminer les interactions physiques entre c-Met et les différentes chaînes des intégrines au niveau des microdomaines riches en GSLs des cellules cancéreuses de sein. D'autre part, l'inhibition de l'expression des sous-unités des intégrines par siRNA, suivie de tests de prolifération et d'une analyse de la phosphorylation de c-Met permettrait de déterminer si les intégrines représentent des intermédiaires indispensables au phénotype tumorigène des MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> (Todeschini *et al.*, 2007). Une liaison indirecte faisant intervenir une Siglec reconnaissant spécifiquement la séquence GalNAc $\beta$ 1-4[Neu5Ac $\alpha$ 2-8Neu5Ac $\alpha$ 2-3]Gal du G<sub>D2</sub> pourrait également être envisagée. Cependant aucune évidence n'a, à ce jour, permis de montrer une telle activité lectinique entre une Siglec et cette séquence glycanique disialylée (O'Reilly et Paulson, 2009).



### **I. D. Activation de c-Met dépendante du $G_{D2}$ : un nouveau mécanisme de contrôle de c-Met dans les cellules cancéreuses mammaires**

L'activation constitutive de c-Met dans les carcinomes mammaires est mise en évidence depuis plusieurs années. Elle conduit des cellules néoplasiques à se détacher de la masse tumorale, à franchir la membrane basale, infiltrer le stroma sous-jacent et coloniser des organes distants (Trusolino et Comoglio, 2002). Différentes altérations moléculaires peuvent expliquer cette activation anarchique. Tout d'abord, c-Met, seul ou en association avec l'HGF, est surexprimé dans la majorité des tumeurs primaires mammaires (Jin *et al.*, 1997 ; Edakuni *et al.*, 2001 ; Parr *et al.*, 2004). Cette surexpression entraîne une dimérisation du récepteur et une activation constitutive des voies de signalisation liées à la prolifération et à la survie cellulaire. Récemment, il a été démontré que le gène *MET* et son produit sont spécifiquement surexprimés dans les tumeurs de type *basal*, et cette expression est corrélée à un mauvais pronostic de survie (**Article 2**, Cazet *et al.*, 2010 ; Ponzio *et al.*, 2009; Hochgräfe *et al.*, 2010). De plus, c-Met peut être stimulé de manière anormale par des boucles de contrôle autocrine et/ou paracrine, sous l'influence de l'HGF (Jin *et al.*, 1997 ; Edakuni *et al.*, 2001). Enfin, l'activation de c-Met peut s'effectuer indépendamment de la fixation du ligand, par un phénomène de transactivation *via* d'autres protéines membranaires telles que les intégrines ou l'EGFR dans les cellules mammaires (Lai *et al.*, 2009).

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont permis de mettre en lumière un nouveau mécanisme d'activation de c-Met, indépendant de l'HGF. L'activation constitutive par le ganglioside  $G_{D2}$  renforce le caractère oncogénique de c-Met dans les cellules mammaires triple-négatives MDA-MB-231  $GD3S^+$ , favorisant ainsi la prolifération, la migration et la survie. Une question se pose cependant : ce phénotype peut-il être observé dans d'autres modèles de cellules tumorales en culture?

### **I. E. Activation de c-Met dépendante du $G_{D2}$ : un phénomène généralisable aux cellules cancéreuses $G_{D2}$ positives ?**

Lorsque nous avons débuté ce projet, nous avons analysé la biosynthèse des gangliosides dans différents modèles de cellules cancéreuses de sein et dans un modèle de cellules mammaires immortalisées non tumorales, par des techniques d'immunocytochimie, de microscopie confocale, de cytométrie de flux et de PCR quantitative (**Article 1**, Cazet *et al.*, 2009). Nous avons montré que l'ensemble de ces cellules présente un profil d'expression gangliosidique

restreint, essentiellement limité au  $G_{M1}$ . Ces résultats ont démontré que les modèles cellulaires du cancer du sein présentent un profil d'expression gangliosidique sensiblement différents de ceux du tissu mammaire, qu'il soit normal ou cancéreux (Marquina *et al.*, 1996). Des différences de glycosylation comparables ont déjà été observées entre cellules en culture et tissu tumoral, en particulier pour les gangliosides dans le poumon ou encore pour l'antigène sialyl-Tn dans le cancer du sein et du côlon (Yoshida *et al.*, 2001 ; Julien *et al.*, 2001 ; Brockhausen *et al.*, 1998). Selon ces auteurs, ces différences pourraient être dues à des conditions de culture non appropriées, ou encore à la perte progressive de la capacité à produire de telles structures par les cellules en culture.

Pour pallier à l'absence de modèle, nous avons choisi d'induire l'expression stable de la GD3S dans les cellules triple-négatives MDA-MB-231 (**Article 1**, Cazet *et al.*, 2009). La création de modèles cellulaires, bien que laborieuse, est incontournable aujourd'hui en cancérologie. L'expression stable de gangliosides complexes à la surface cellulaire permet de se rapprocher des conditions physiopathologiques et de l'environnement tumoral chez le patient. Ces modèles permettent d'analyser les mécanismes par lesquels les gangliosides régulent l'activité des RTKs au sein des microdomaines riches en GSLs.

Il serait intéressant de déterminer l'impact de l'expression de la GD3S et du  $G_{D2}$  sur l'activation des RTKs et sur la carcinogenèse d'autres modèles cellulaires mammaires. Le  $G_{D2}$  est-il capable d'induire la phosphorylation de c-Met indépendamment de son ligand dans des cellules du sous-groupe *luminal A*, *luminal B*, *normal-breast like*, *HER2+* ou dans d'autres lignées de type *basal-like* ? Autrement dit : l'acquisition de la malignité liée à l'expression de la GD3S est-elle caractéristique d'un type particulier de tumeur mammaire ? Ce phénotype est-il caractéristique d'un stade tardif dans le processus de cancérisation ?

Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons mis en place au laboratoire un modèle de cellules MCF-7 exprimant la GD3S (travaux d'Agata Steenackers). Ces cellules du sous-type *luminal A* ne montrent pas de modification significative de la prolifération cellulaire mais présentent une capacité de migration accrue. Ces clones expriment un profil gangliosidique différent des cellules MDA-MB-231  $GD3S^+$ , avec accumulation de  $G_{D1b}$  à la surface cellulaire. Il serait intéressant d'inhiber la  $G_{D1b}$  synthétase ( $\beta 3GalT4$ ) par ARN interférence de manière à bloquer la conversion du  $G_{D2}$  en  $G_{D1b}$  et ainsi d'accumuler du  $G_{D2}$ . La prolifération cellulaire pourrait être ensuite analysée afin de déterminer si des cellules MCF-7 exprimant du  $G_{D2}$  acquièrent un phénotype prolifératif comparable à celui des cellules MDA-MB-231  $GD3S^+$ . Si cette hypothèse était vérifiée, nous analyserons l'implication des RTKs par diffé-

rentes approches complémentaires (analyse par *Proteome Profiler Human Phospho-RTK Array*, Western-Blot, étude des voies de signalisation). La création d'autres modèles cellulaires exprimant la GD3S et le G<sub>D2</sub>, par utilisation de lignées de type *luminal B* (BT-474), *HER2+* (MDA-MB-435) ou *normal-breast like* (MDA-MB-453), peut également être envisagée.

Bien que l'implication du G<sub>D2</sub> dans la cancérogenèse des cellules pulmonaires et cérébrales soit communément admise, les mécanismes moléculaires impliquant ce ganglioside à l'acquisition de la malignité n'ont pas encore été décrits. Il serait judicieux d'analyser l'activation constitutive des RTKs et notamment de c-Met dans des cellules cancéreuses pulmonaires, de gliome ou de neuroblastome G<sub>D2</sub> positives. En parallèle, il serait important d'analyser l'implication des gangliosides et du G<sub>D2</sub> dans des modèles oncogéniques dépendants de c-Met comme la lignée gastrique GTL16, dans laquelle c-Met est constitutivement activé (Giordano *et al.*, 1989b).

Ces dernières années, les gangliosides sont apparus comme des régulateurs majeurs de l'activité des RTKs. Une expression anormale de ces GSLs pourrait expliquer l'activation continue et anarchique de RTKs et leur impact au cours de la carcinogenèse mammaire. Nous avons démontré une activation spécifique de l'oncogène c-Met dépendante d'un ganglioside, à ce jour jamais décrit. De manière intéressante, les propriétés biologiques agressives des cellules MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> ont pu être reportées dans un système complexe : le modèle de souris SCID.

## **II. Rôle de la GD3S dans la tumorigenèse chez le petit animal**

### **II. A. Effet sur la formation de la tumeur primaire**

L'agressivité accrue des cellules MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> a été démontrée par un test de tumorigénicité *in vivo* en souris SCID. Des tumeurs primaires palpables apparaissent au bout d'une semaine lorsque les clones GD3S<sup>+</sup> ont été inoculés dans le flanc des souris, alors qu'elles n'apparaissent qu'au bout de 3 semaines pour des cellules contrôle (**Article 2**, Cazet *et al.*, 2010). La croissance et le maintien des tumeurs primaires chez la souris nécessitent un ensemble de modifications moléculaires, conduisant à une prolifération cellulaire accrue ainsi qu'à une augmentation du phénomène d'angiogenèse (cf introduction, paragraphe I.B.3.c). L'environnement de l'organisme hôte lors d'une injection sous-cutanée, déficient en facteurs

de croissance, permet cependant le développement rapide des tumeurs primaires MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup>. L'activation constitutive de c-Met dans les cellules GD3S<sup>+</sup> et des voies de signalisation associées à la prolifération et à la survie pourrait favoriser dans un premier temps la croissance de la tumeur GD3S<sup>+</sup> malgré l'absence de facteurs de croissance dans l'environnement cellulaire, alors que les cellules contrôle se développent plus lentement. L'implication de la GD3S, du ganglioside G<sub>D2</sub> et de la forme activée de c-Met dans ce phénomène prolifératif pourrait être confirmée par la mise en évidence d'une corrélation entre le niveau d'expression de la GD3S, du G<sub>D2</sub> et la taille des tumeurs. De plus, il serait intéressant de comparer la forme phosphorylée activée de c-Met sur des coupes histologiques de tumeurs issues d'animaux inoculés avec des cellules contrôle *versus* cellules MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup>.

Dans un second temps, l'activation de c-Met pourrait jouer un rôle essentiel dans le phénomène d'angiogenèse. En effet, il a été démontré que l'activation du récepteur augmente de façon concomitante le niveau d'expression de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) sécrété par les cellules tumorales et du VEGFR2 exprimé par les cellules endothéliales (Xin *et al.*, 2001 ; Zhang *et al.*, 2003). En parallèle, le niveau de thrombospondine, inhibiteur de l'angiogenèse, est diminué (Zhang *et al.*, 2003). Ainsi, la coopération entre les voies de signalisation de c-Met et du VEGFR pourrait augmenter la formation de capillaires et la vascularisation de la tumeur primaire GD3S<sup>+</sup> *in vivo*.

De plus, l'analyse de la phosphorylation des RTKs, présentée dans les articles 2 et 3, a révélé une légère activation de Tie-2 dépendante du G<sub>D2</sub> dans les cellules GD3S<sup>+</sup>. Tie-2 pourrait jouer un rôle pro-angiogénique dans le développement des tumeurs GD3S<sup>+</sup>. Ce récepteur aux angiopoïétines est principalement exprimé à la surface des cellules endothéliales, où il joue un rôle clef dans le maintien de la plasticité vasculaire. La stimulation anarchique de Tie-2 induit ainsi un ensemble d'effets biologiques contribuant au développement tumoral: angiogenèse, inflammation et extravasation. De manière intéressante, l'expression de Tie-2 a été mise en évidence dans des tissus non vasculaires, à la fois au niveau du stroma et des cellules qui composent la tumeur primaire de sein (Shirakawa *et al.*, 2001). Sa relevance physiopathologique est inconnue. Il serait ainsi intéressant de déterminer l'effet de l'activation de Tie-2 dans les cellules MDA-MB-231 GD3S<sup>+</sup> sur l'angiogenèse, *in vitro* et dans un modèle de souris. Des expériences de siRNA de Tie-2 suivies de tests de migration, d'invasion en chambre de Boyden et de xénogreffes en Matrigel dans un modèle de souris SCID pourront être envisagés (Zeng *et al.*, 2000).

Finalement, plusieurs approches expérimentales ont démontré la fonction des gangliosides complexes dans l'angiogenèse, comme stimulateur de la sécrétion du VEGF (Koocekpour *et al.*, 1996 ; Zeng *et al.*, 2000). La progression des tumeurs solides est en effet dépendante de l'angiogenèse, et les gangliosides libérés dans le microenvironnement tumoral y jouent un rôle central. Ainsi le  $G_{D1a}$  et le  $G_{D3}$ , libérés par les tumeurs cérébrales, favorisent l'autophosphorylation du récepteur VEGF2 et l'activation des voies de signalisation PI3K/Akt et ERK/MAPK des cellules endothéliales environnantes, en stimulant la sécrétion du ligand (Zeng *et al.*, 2000 ; Liu *et al.*, 2006). La libération de gangliosides complexes par les cellules MDA-MB-231  $GD3S^+$  pourrait renforcer la néo-angiogenèse de la tumeur primaire au sein d'un modèle animal complexe.

## **II. B. Effet de l'expression de la GD3S sur la dissémination des cellules mammaires et l'apparition des métastases**

Plus de 90% des patientes atteintes d'un cancer du sein au stade métastatique décèdent dans les 10 années qui suivent le diagnostic, indépendamment du sous-type moléculaire de la tumeur. Cette donnée souligne la nécessité d'identifier des marqueurs biologiques de dissémination et d'implantation des cancers secondaires de mauvais pronostic. Pendant de nombreuses années, l'élucidation des mécanismes moléculaires gouvernant la formation des métastases a été limitée par des obstacles conceptuels, par la nature complexe et multifactorielle du processus et par l'absence de modèles disponibles. La compréhension de ces mécanismes génétique et moléculaire est aujourd'hui une préoccupation d'intérêt en cancérologie.

Une étude récente portant sur le tropisme des métastases du cancer du sein a permis de démontrer que l'expression du gène *ST6GALNAC5*, codant une sialyltransférase impliquée dans la biosynthèse des gangliosides de la série  $\alpha$ , permet aux cellules mammaires de métastaser spécifiquement au cerveau (Bos *et al.*, 2009 ; cf. introduction, paragraphe IV.B). En parallèle, des cellules mammaires migrant au niveau du tissu osseux surexpriment également *ST8SIA1* (Carcel-Trullols *et al.*, 2006). Ces données ont renforcé le rôle de la glycosylation de surface dans le processus de cancérisation mammaire et apporté un regard nouveau sur la fonction des glycosyltransférases dans le tropisme particulier des métastases. Les clones MDA-MB-231  $GD3S^+$  colonisent-ils des organes spécifiques chez des souris immunodéficientes ?

Des expériences préliminaires semblent indiquer que les cellules mammaires MDA-MB-231  $GD3S^+$  provoquent l'apparition rapide de métastases au niveau du cerveau (résultats non présentés). Malheureusement, les conditions expérimentales utilisées n'étaient pas optimales

pour confirmer rigoureusement ces observations. Ce sujet mérite d'être approfondi. La réalisation de nouvelles expériences adaptées à l'étude de la dissémination des cellules cancéreuses débutera dans les prochains mois. Dans un premier temps, des cellules GFP<sup>+</sup> (contrôle ou GD3S<sup>+</sup>, disponibles au laboratoire) seront inoculées au niveau du flanc de souris SCID. Lorsque les tumeurs atteindront un volume d'environ 2 cm<sup>3</sup>, les animaux seront sacrifiés et disséqués. Les organes (foie, poumon et cerveau) seront prélevés, digérés et les cellules seront analysées en cytométrie de flux afin de quantifier le pourcentage de cellules GFP<sup>+</sup> ayant migré spécifiquement vers les différents organes. En parallèle, une collaboration avec le laboratoire du Pr. Roméo Cecchelli (Physiopathologie de la barrière hémato-encéphalique, Université d'Artois, Lens, France) est actuellement en cours, et visera à déterminer les capacités d'adhérence et le passage des clones GD3S<sup>+</sup> dans un modèle mimant la barrière hémato-encéphalique (Bos *et al.*, 2009).

Ces expériences permettront de déterminer l'impact de l'expression de la GD3S sur le tropisme métastatique des cellules cancéreuses mammaires.

### **III. Rôle de la GD3S dans la tumorigenèse chez le malade**

#### **III. A. La GD3S et la tumeur primaire**

Ces dernières années, l'équipe de Kaufmann a déterminé la valeur pronostique d'un ensemble de gènes impliqués dans le métabolisme des sphingolipides, dans le cancer du sein. Ces études cliniques, réalisées sur différentes banques de données d'analyse transcriptomique, ont permis de mettre en évidence la surexpression de *ST8SIA1* dans les tumeurs ER négatives, corrélée à un grade histopronostique élevé (Ruckhäberle *et al.*, 2008 ; 2009). Nous avons confirmé et affiné ces résultats en comparant l'expression de *ST8SIA1* dans les différents sous-types de tumeurs mammaires définis par Sorlie et coll. (Sorlie *et al.*, 2001 ; 2003). Ainsi, la surexpression de *ST8SIA1* est principalement associée aux tumeurs triple-négatives de mauvais pronostic (**Article 2**, Cazet *et al.*, 2010). De manière intéressante, une forte expression du gène *MET* est également caractéristique des tumeurs triple-négatives (**Article 2**, Cazet *et al.*, 2010 ; Charafe-Jauffret *et al.*, 2006). Hormis l'intérêt pronostique, ces résultats soulèvent la question du ou des mécanisme(s) permettant la surexpression du gène *ST8SIA1* dans ce sous-type particulier de cancer du sein.

Deux études cliniques ont également montré que le *N*-glycolyl-G<sub>M3</sub>, le G<sub>D3</sub>, le 9-*O*-acétyl-G<sub>D3</sub> et le 9-*O*-acétyl-G<sub>T3</sub> sont exprimés dans les carcinomes canauxaires infiltrants (Marquina *et al.*, 1996 ; Oliva *et al.*, 2006). Au vu de la nouvelle classification moléculaire du cancer du sein, ces données mériteraient d'être affinées et il serait intéressant d'analyser la composition glycosphingolipidique de chaque sous-type de tumeurs. L'expression des gangliosides pourrait être déterminée sur des coupes de tumeurs par immunohistochimie à l'aide d'anticorps anti-gangliosides. Nous déterminerons ainsi si l'expression du G<sub>D2</sub> est corrélée aux tumeurs mammaires de type *basal*, en combinaison avec l'oncogène *c-Met* (Garcia *et al.*, 2007a).

### **III. B. Relation entre l'expression de la GD3S et des paramètres d'agressivité tumorale**

L'analyse par PCR quantitative de l'expression de *ST8SIA1* dans un ensemble de tumeurs ER- a été menée au laboratoire par Marie Bobowski, en collaboration avec le Dr Sylvain Julien (Breast Cancer Biology Group, Guy's Hospital, London, UK). L'expression du transcrit codant la GD3S est nettement plus élevée dans les tumeurs ER-, et plus particulièrement dans les tumeurs de type *basal*, que dans les cellules MDA-MB-231. De manière intéressante, le pouvoir métastatique des tumeurs mammaires triple négatives est corrélé à l'expression de *ST8SIA1*. Les patientes présentant des tumeurs avec un niveau de *ST8SIA1* élevé ont tendance à présenter des récurrences locales, un envahissement d'un nombre important de ganglions lymphatiques et des métastases distantes au niveau du foie, du cerveau et des méninges. Les récurrences locales et les métastases observées semblent indiquer un pouvoir invasif élevé des tumeurs. Le récepteur *c-Met* ayant un rôle important dans les phénomènes invasifs du cancer du sein, les produits des deux gènes *ST8SIA1* et *MET* pourraient coopérer pour renforcer l'agressivité des tumeurs mammaires triple-négatives et ainsi représenter des facteurs de mauvais pronostic de survie des patientes (Lengyel *et al.*, 2005 ; Garcia *et al.*, 2007b).

### **III. C. Les gangliosides complexes : cibles thérapeutiques d'intérêt dans le cancer du sein ?**

L'un des grands défis actuels de la recherche contre le cancer est la mise au point de thérapies alternatives, fondées sur des bases moléculaires validées. Ces dernières années, la mise en évidence de l'hétérogénéité du cancer du sein et la découverte de cibles moléculaires définissant des sous-types de tumeurs ont permis de développer de nouvelles approches thérapeutiques ciblant certains groupes de patientes. Ces thérapies visent notamment à inhiber la signalisation des RTKs (Wakeling *et al.*, 2005). Dans ce contexte, le récepteur *c-Met* représente

une cible d'intérêt pour le développement de molécules anticancéreuses chez des patientes du sous groupe *basal* (Corso *et al.*, 2005 ; You et McDonald, 2008). Plusieurs traitements sont actuellement en phase de développement, certains ayant atteint la phase III d'essais cliniques. Il s'agit notamment d'anticorps anti-HGF (AMG102), d'anticorps monoclonaux anti-c-Met (MetmAb) ou encore d'inhibiteurs de sa fonction kinase (SU11274, XL184). Cependant, ces traitements donnent des résultats relativement limités lorsqu'ils sont utilisés seuls (Eder *et al.*, 2009).

Nos données suggèrent que l'activation de c-Met et des voies de prolifération et de survie associées est dépendante de l'expression du ganglioside  $G_{D2}$  dans un modèle de cellules en culture. Il est évident que ces résultats sont très préliminaires pour en tirer des perspectives thérapeutiques. Une étude plus approfondie dans un échantillonnage plus grand de cellules de cancer du sein est nécessaire, tout comme une validation chez le patient. Néanmoins, si les travaux présentés au cours de cette thèse étaient validés *in vivo*, de nouvelles approches thérapeutiques combinant inhibiteurs de c-Met et anticorps anti-gangliosides pourraient être envisagées.

En conclusion, mon travail de thèse a permis d'apporter de nouvelles données sur l'activation des RTKs par les gangliosides. La partie oligosaccharidique du  $G_{D2}$  active spécifiquement le récepteur c-Met dans des cellules triple-négatives MDA-MB-231, renforçant ainsi les capacités prolifératives et migratoires de cellules mammaires *in vitro* et dans un modèle animal. Ce sujet ouvre désormais de nouvelles perspectives et nous pouvons proposer d'orienter les recherches futures selon trois grands axes : (i) préciser le mécanisme moléculaire par lequel le  $G_{D2}$  active de manière spécifique c-Met ; (ii) déterminer l'impact de l'expression de la GD3S sur le tropisme des métastases mammaires dans un modèle animal ; (iii) comprendre les mécanismes de régulation transcriptionnelle de *ST8SIA1* dans le cancer du sein.





## **REFERENCES**



- Aaltonen K., Amini RM., Landberg G., Eerola H., Aittomäki K., Heikkilä P., Nevanlinna H., Blomqvist C.** (2009). Cyclin D1 expression is associated with poor prognostic features in estrogen receptor positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 113:75-82.
- Ablan S., Rawat SS., Blumenthal R., Puri A.** (2001). Entry of influenza virus into a glycosphingolipid-deficient mouse skin fibroblast cell line. *Arch Virol.* 146:2227-22238.
- Agrawal A., Murphy RF., Agrawal DK.** (2007). DNA methylation in breast and colorectal cancers. *Mod Pathol.* 20:711-721.
- Aixinjueluo W., Furukawa K., Zhang Q., Hamamura K., Tokuda N., Yoshida S., Ueda R., Furukawa K.** (2005). Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis. *J Biol Chem.* 280:29828-29836.
- Al-Hajj M., Wicha MS., Benito-Hernandez A., Morrison SJ., Clarke MF.** (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3983-3988.
- Alimonti A., Carracedo A., Clohessy JG., Trotman LC., Nardella C., Egia A., Salmena L., Sampieri K., Haveman WJ., Brogi E., Richardson AL., Zhang J., Pandolfi PP.** (2010). Subtle variations in Pten dose determine cancer susceptibility. *Nat Genet.* 42:454-458.
- Allemand H., Seradour B., Weill A., Ricordeau P.** (2008). Decline in breast cancer incidence in 2005 and 2006 in France: a paradoxical trend. *Bull Cancer.* 95:11-15.
- Allinen M., Beroukhi R., Cai L., Brennan C., Lahti-Domenici J., Huang H., Porter D., Hu M., Chin L., Richardson A., Schnitt S., Sellers WR., Polyak K.** (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer Cell.* 6:17-32
- Amoureux MC., Coulibaly B., Chinot O., Loundou A., Metellus P., Rougon G., Figarella-Branger D.** (2010). Polysialic acid neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) is an adverse prognosis factor in glioblastoma, and regulates olig2 expression in glioma cell lines. *BMC Cancer.* 10:91.
- Ardail D., Popa I., Bodennec J., Louisot P., Schmitt D., Portoukalian J.** (2003). The mitochondria-associated endoplasmic-reticulum subcompartment (MAM fraction) of rat liver contains highly active sphingolipid-specific glycosyltransferases. *Biochem J.* 371:1013-1019.
- Arnold A., Papanikolaou A.** (2005). Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J Clin Oncol.* 23:4215-4224.
- Bajorin DF., Chapman PB., Wong G., Coit DG., Kunicka J., Dimaggio J., Cordon-Cardo C., Urmacher C., Dantes L., Templeton MA., Liu J., Oettgen HF., Houghton AN.** (1990). Phase I evaluation of a combination of monoclonal antibody R24 and interleukin 2 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Res.* 50:7490-7495.
- Bandyopadhyay S., Zhan R., Chaudhuri A., Watabe M., Pai SK., Hirota S., Hosobe S., Tsukada T., Miura K., Takano Y., Saito K., Pauza ME., Hayashi S., Wang Y., Mohinta S., Mashimo T., Iizumi M., Furuta E., Watabe K.** (2006). Interaction of KAI1 on tumor cells with DARC on vascular endothelium leads to metastasis suppression. *Nat Med.* 12:933-938.

- Baselga J., Swain SM.** (2009). Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*. 9:463-75.
- Bektas M., Spiegel S.** (2004). Glycosphingolipids and cell death. *Glycoconj J*. 20:39-47.
- Bennaceur K., Popa I., Chapman JA., Migdal C., Péguet-Navarro J., Touraine JL., Portoukalian J.** (2009). Different mechanisms are involved in apoptosis induced by melanoma gangliosides on human monocyte-derived dendritic cells. *Glycobiology*. 19:576-582.
- Berra B., Gaini SM., Riboni L.** (1985). Correlation between ganglioside distribution and histological grading of human astrocytomas. *Int J Cancer*. 36:363-366.
- Bertheau P., Espié M., Turpin E., Lehmann J., Plassa LF., Varna M., Janin A., de Thé H.** (2008). TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology*. 75:132-139.
- Bertotti A., Comoglio PM., Trusolino L.** (2005). Beta4 integrin is a transforming molecule that unleashes Met tyrosine kinase tumorigenesis. *Cancer Res*. 65:10674-10679.
- Bertotti A., Comoglio PM., Trusolino L.** (2006). Beta4 integrin activates a Shp2-Src signaling pathway that sustains HGF-induced anchorage-independent growth. *J Cell Biol*. 175:993-1003.
- Bieberich E., Freischütz B., Liour SS., Yu RK.** (1998). Regulation of ganglioside metabolism by phosphorylation and dephosphorylation. *J Neurochem*. 71:972-979.
- Bieberich E., Tencomnao T., Kapitonov D., Yu RK.** (2000). Effect of *N*-glycosylation on turnover and subcellular distribution of *N*-acetylgalactosaminyltransferase I and sialyltransferase II in neuroblastoma cells. *J Neurochem*. 74:2359-2364.
- Birklé S., Gao L., Zeng G., Yu RK.** (2000). Down-regulation of GD3 ganglioside and its *O*-acetylated derivative by stable transfection with antisense vector against GD3-synthase gene expression in hamster melanoma cells: effects on cellular growth, melanogenesis, and dendricity. *J Neurochem*. 74:547-554.
- Birklé S., Zeng G., Gao L., Yu RK., Aubry J.** (2003). Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie*. 85:455-463.
- Bordeleau L., Panchal S., Goodwin P.** (2010). Prognosis of BRCA-associated breast cancer: a summary of evidence. *Breast Cancer Res Treat*. 119:13-24.
- Bos PD., Zhang XH., Nadal C., Shu W., Gomis RR., Nguyen DX., Minn AJ., van de Vijver MJ., Gerald WL., Foekens JA., Massagué J.** (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*. 459:1005-1009.
- Bosco EE., Knudsen ES.** (2007a). RB in breast cancer: at the crossroads of tumorigenesis and treatment. *Cell Cycle*. 6:667-671.
- Bosco EE., Wang Y., Xu H., Zilfou JT., Knudsen KE., Aronow BJ., Lowe SW., Knudsen ES.** (2007b). The retinoblastoma tumor suppressor modifies the therapeutic response of breast cancer. *J Clin Invest*. 117:218-228.

- Bremer EG., Schlessinger J., Hakomori S.** (1986). Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 261:2434-2440.
- Brockhausen I., Yang J., Dickinson N., Ogata S., Itzkowitz S.H.** (1998). Enzymatic basis for sialyl-Tn expression in human colon cancer cells. *Glycoconj. J.*, 15:595-603.
- Buck M.** (2008). A novel domain of BRCA1 interacts with p53 in breast cancer cells. *Cancer Lett.* 268:137-145.
- Buckhaults P., Chen L., Fregien N., Pierce M.** (1997). Transcriptional regulation of *N*-acetylglucosaminyltransferase V by the src oncogene. *J Biol Chem.* 272:19575–19581.
- Burstein HJ., Polyak K., Wong JS., Lester SC., Kaelin CM.** (2004). Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med.* 350:1430-1441.
- Cailleau R., Young R., Olivé M., Reeves WJ Jr.** (1974). Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst.* 53:661-674.
- Carcel-Trullols J., Stanley JS., Saha R., Shaaf S., Bendre MS., Monzavi-Karbassi B., Suva LJ., Kieber-Emmons T.** (2006). Characterization of the glycosylation profile of the human breast cancer cell line, MDA-231, and a bone colonizing variant. *Int J Oncol.* 28:1173-1183.
- Carey LA., Perou CM., Livasy CA., Dressler LG., Cowan D., Conway K., Karaca G., Troester MA., Tse CK., Edmiston S., Deming SL., Geradts J., Cheang MC., Nielsen TO., Moorman PG., Earp HS., Millikan RC.** (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 295:2492-502.
- Cartellieri M., Bachmann M., Feldmann A., Bippes C., Stamova S., Wehner R., Temme A., Schmitz M.** (2010). Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2010:956304.
- Carubia JM., Yu RK., Macala LJ., Kirkwood JM., Varga JM.** (1984). Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 120:500-504.
- Casey PM., Cerhan JR., Pruthi S.** (2008). Oral contraceptive use and risk of breast cancer. *Mayo Clin Proc.* 83:86-90.
- Cazet A., Groux-Degroote S., Teylaert B., Kwon KM., Lehoux S., Slomianny C., Kim CH., Le Bourhis X., Delannoy P.** (2009). GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol Chem.* 390:601-609.
- Cazet A., Lefebvre J., Adriaenssens E., Julien S., Bobowski M., Grigoriadis A., Tutt A., Tulasne D., Le Bourhis X., Delannoy P.** (2010). GD<sub>3</sub> synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation. *Molecular Cancer Research.* In press
- Chammas R., Sonnenburg JL., Watson NE., Tai T., Farquhar MG., Varki NM., Varki A.** (1999). De-*N*-acetyl-gangliosides in humans: unusual subcellular distribution of a novel tumor antigen. *Cancer Res.* 59:1337-1346.

- Chapman PB., Wu D., Ragupathi G., Lu S., Williams L., Hwu WJ., Johnson D., Livingston PO.** (2004). Sequential immunization of melanoma patients with GD3 ganglioside vaccine and anti-idiotypic monoclonal antibody that mimics GD3 ganglioside. *Clin Cancer Res.* 10:4717-4723.
- Charafe-Jauffret E., Ginestier C., Monville F., Finetti P., Adélaïde J., Cervera N., Fekairi S., Xerri L., Jacquemier J., Birnbaum D., Bertucci F.** (2006). Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene.* 25:2273-2284.
- Chen LC., Brown AB., Cheung IY., Cheung NK., Kris MG., Krug LM.** (2010). Analysis of GD2/GM2 synthase mRNA as a biomarker for small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 67:216-220.
- Chen Y., Olopade OI.** (2008). MYC in breast tumor progression. *Expert Rev Anticancer Ther.* 8:1689-1698.
- Cheresh DA., Reisfeld RA., Varki AP.** (1984). O-acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science.* 225:844-846.
- Cheresh DA., Rosenberg J., Mujoo K., Hirschowitz L., Reisfeld RA.** (1986). Biosynthesis and expression of the disialoganglioside GD2, a relevant target antigen on small cell lung carcinoma for monoclonal antibody-mediated cytotoxicity. *Cancer Res.* 46:5112-5118.
- Cheung IY., Lo Piccolo MS., Kushner BH., Cheung NK.** (2003). Early molecular response of marrow disease to biologic therapy is highly prognostic in neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 21:3853-3858.
- Cheung IY., Sahota A., Cheung NK.** (2004). Measuring circulating neuroblastoma cells by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Cancer.* 101:2303-2308.
- Choi HJ., Park YG., Kim CH.** (2007). Lactosylceramide alpha2,3-sialyltransferase is induced via a PKC/ERK/CREB-dependent pathway in K562 human leukemia cells. *Mol Cells.* 23:138-144.
- Chung TW., Choi HJ., Lee YC., Kim CH.** (2005). Molecular mechanism for transcriptional activation of ganglioside GM3 synthase and its function in differentiation of HL-60 cells. *Glycobiology.* 15:233-244.
- Cocconi G.** (1995). The natural history of operable breast cancer after primary treatment. *Ann Oncol.* 2:11-21.
- Copani A., Melchiorri D., Caricasole A., Martini F., Sale P., Carnevale R., Gradini R., Sortino MA., Lenti L., De Maria R., Nicoletti F.** (2002). Beta-amyloid-induced synthesis of the ganglioside GD3 is a requisite for cell cycle reactivation and apoptosis in neurons. *J Neurosci.* 22:3963-3978.
- Corso S., Comoglio PM., Giordano S.** (2005). Cancer therapy: can the challenge be MET? *Trends Mol Med.* 11:284-292.

- Couch FJ., Farid LM., DeShano ML., Tavtigian SV., Calzone K., Campeau L., Peng Y., Bogden B., Chen Q., Neuhausen S., Shattuck-Eidens D., Godwin AK., Daly M., Radford DM., Sedlacek S., Rommens J., Simard J., Garber J., Merajver S., Weber BL.** (1996). BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet.* 13:123-125.
- Crespo PM., Torres Demichelis V., Daniotti JL.** (2010). Neobiosynthesis of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycosyltransferases. *J Biol Chem.* PMID: 20639193
- Crocker PR., Paulson JC., Varki A.** (2007). Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 7:255-266.
- Dae HM., Kwon HY., Kang NY., Song NR., Kim KS., Kim CH., Lee JH., Lee YC.** (2009). Isolation and functional analysis of the human glioblastoma-specific promoter region of the human GD3 synthase (hST8Sia I) gene. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 41:237-245.
- Daniel L., Durbec P., Gautherot E., Rouvier E., Rougon G., Figarella-Branger D.** (2001). A nude mice model of human rhabdomyosarcoma lung metastases for evaluating the role of polysialic acids in the metastatic process. *Oncogene.* 20:997-1004.
- Daniotti JL., Rosales Fritz V., Kunda P., Nishi T., Maccioni HJ.** (1997). Cloning, characterization and developmental expression of alpha2,8 sialyltransferase (GD3 synthase, ST8Sia I) gene in chick brain and retina. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15: 767-776.
- Daniotti JL., Zurita AR., Trindade VM., Maccioni HJ.** (2002). GD3 expression in CHO-K1 cells increases growth rate, induces morphological changes, and affects cell-substrate interactions. *Neurochem Res.* 27:1421-1429.
- De Maria R., Lenti L., Malisan F., d'Agostino F., Tomassini B., Zeuner A., Rippo MR., Testi R.** (1997). Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science.* 277:1652-1655.
- Defilippi P., Di Stefano P., Cabodi S.** (2006). p130Cas: a versatile scaffold in signaling networks. *Trends Cell Biol.* 16:257-263.
- Degroote S., Wolthoorn J., van Meer G.** (2004). The cell biology of glycosphingolipids. *Semin Cell Dev Biol.* 15:375-387.
- Demetriou M., Nabi IR., Coppolino M., Dedhar S., Dennis JW.** (1995). Reduced contact-inhibition and substratum adhesion in epithelial cells expressing GlcNAc-transferase V. *J Cell Biol.* 130:383-392.
- Dennis JW., Laferté S., Waghorne C., Breitman ML., Kerbel RS.** (1987) 1-6 branching of Asn-linked oligosaccharides is directly associated with metastasis. *Science.* 236:582-585.
- Di Pasquale E., Fantini J., Chahinian H., Maresca M., Taïeb N., Yahi N.** (2010). Altered ion channel formation by the Parkinson's-disease-linked E46K mutant of alpha-synuclein is corrected by GM3 but not by GM1 gangliosides. *J Mol Biol.* 397:202-218.



- Diaz LK., Cristofanilli M., Zhou X., Welch KL., Smith TL., Yang Y., Sneige N., Sahin AA., Gilcrease MZ.** (2005). Beta4 integrin subunit gene expression correlates with tumor size and nuclear grade in early breast cancer. *Mod Pathol.* 18:1165-1175.
- Dippold WG., Lloyd KO., Li LT., Ikeda H., Oettgen HF., Old LJ.** (1980). Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 177:6114-6118.
- Dong Y., Ikeda K., Hamamura K., Zhang Q., Kondo Y., Matsumoto Y., Ohmi Y., Yamauchi Y., Furukawa K., Taguchi R., Furukawa K.** (2010). GM1 / GD1b / GA1 synthase expression results in the reduced cancer phenotypes with modulation of composition and raft-localization of gangliosides in a melanoma cell line. *Cancer Sci.* PMID: 20594196
- Driouch K., Landemaine T., Sin S., Wang S., Lidereau R.** (2007). Gene arrays for diagnosis, prognosis and treatment of breast cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 24:575-85.
- Dube DH., Bertozzi CR.** (2005). Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov.* 4:477-488.
- Edakuni G., Sasatomi E., Satoh T., Tokunaga O., Miyazaki K.** (2001). Expression of the hepatocyte growthfactor/c-Met pathway is increased at the cancer front in breast carcinoma. *Pathol Int.* 51:172-178.
- Eder JP., Vande Woude GF., Boerner SA., LoRusso PM.** (2009). Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 15:2207-2214.
- Eidels L., Proia RL., Hart DA.** (1983). Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol Rev.* 47:596-620.
- Escot C., Theillet C., Lidereau R., Spyrtatos F., Champeme MH., Gest J., Callahan R.** (1986). Genetic alteration of the c-myc protooncogene (MYC) in human primary breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:4834-4838.
- Espié M., Gorins A.** (2001). Le sein : du normal au pathologique : état de l'art. Editions ESKA, Paris.
- Faletto DL., Tsarfaty I., Kmiecik TE., Gonzatti M., Suzuki T., Vande Woude GF.** (1992). Evidence for non-covalent clusters of the c-met proto-oncogene product. *Oncogene.* 7:1149-1157.
- Feinberg AP., Tycko B.** (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer.* 4:143-153.
- Feizi T., Fazio F., Chai W., Wong CH.** (2003). Carbohydrate microarrays - a new set of technologies at the frontiers of glycomics. *Curr Opin Struct Biol.* 13:637-645.
- Feizi T., Chai W.** (2004). Oligosaccharide microarrays to decipher the glyco code. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:582-588.
- Friedrichs N., Jäger R., Paggen E., Rudlowski C., Merkelbach-Bruse S., Schorle H., Buettner R.** (2005). Distinct spatial expression patterns of AP-2alpha and AP-2gamma in non-neoplastic human breast and breast cancer. *Mod Pathol.* 18:431-438.

- Fujimoto Y., Izumoto S., Suzuki T., Kinoshita M., Kagawa N., Wada K., Hashimoto N., Maruno M., Nakatsuji Y., Yoshimine T.** (2005). Ganglioside GM3 inhibits proliferation and invasion of glioma. *J Neurooncol.* 71:99-106.
- Fukumoto S., Miyazaki H., Goto G., Urano T., Furukawa K., Furukawa K.** (1999). Expression cloning of mouse cDNA of CMP-NeuAc:Lactosylceramide alpha2,3-sialyltransferase, an enzyme that initiates the synthesis of gangliosides. *J Biol Chem.* 274:9271-9276.
- Fukumoto S., Mutoh T., Hasegawa T., Miyazaki H., Okada M., Goto G., Furukawa K., Urano T.** (2000). GD3 synthase gene expression in PC12 cells results in the continuous activation of TrkA and ERK1/2 and enhanced proliferation. *J Biol Chem.* 275:5832-5838.
- Furukawa K., Takamiya K., Furukawa K.** (2002). Beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase--GM2/GD2 synthase: a key enzyme to control the synthesis of brain-enriched complex gangliosides. *Biochim Biophys Acta.* 1573:356-362.
- Furukawa K., Horie M., Okutomi K., Sugano S., Furukawa K.** (2003). Isolation and functional analysis of the melanoma specific promoter region of human GD3 synthase gene. *Biochim Biophys Acta.* 1627:71-78.
- Furukawa K., Hamamura K., Aixinjueluo W., Furukawa K.** (2006). Biosignals modulated by tumor-associated carbohydrate antigens: novel targets for cancer therapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1086:185-198.
- Futreal PA., Liu Q., Shattuck-Eidens D., Cochran C., Harshman K., Tavtigian S., Bennett LM., Haugen-Strano A., Swensen J., Miki Y., Eddington K., McClure M., Frye C., Weaver-Feldhaus J., Ding W., Gholami Z., Soderkvist P., Terry L., Jhanwar S., Berchuck S., Iglehart JD., Marks J., Ballinger DG., Barrett JC., Skolnick MH., Kamb A., Wiseman R.** (1994). BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science.* 266:120-122.
- Garcia S., Dalès JP., Charafe-Jauffret E., Carpentier-Meunier S., Andrac-Meyer L., Jacquemier J., Andonian C., Lavaut MN., Allasia C., Bonnier P., Charpin C.** (2007a). Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increased expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basal-like phenotype. *Hum Pathol.* 38:830-841.
- Garcia S., Dales JP., Charafe-Jauffret E., Carpentier-Meunier S., Andrac-Meyer L., Jacquemier J., Andonian C., Lavaut MN., Allasia C., Bonnier P., Charpin C.** (2007b) Overexpression of c-Met and of the transducers PI3K, FAK and JAK in breast carcinomas correlates with shorter survival and neoangiogenesis. *Int J Oncol.* 31:49-58.
- Ghiringhelli F, Zitvogel L.** (2006). Vaccine strategies against melanoma. *Med Sci.* 22:183-187.
- Ginestier C., Korkaya H., Dontu G., Birnbaum D., Wicha MS., Charafe-Jauffret E.** (2007). The cancer stem cell: the breast cancer driver. *Med Sci.* 23:1133-1139.
- Giordano S., Di Renzo MF., Narsimhan RP., Cooper CS., Rosa C., Comoglio PM.** (1989a). Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene.* 4:1383-1388.

- Giordano S., Ponzetto C., Di Renzo MF., Cooper CS., Comoglio PM.** (1989b). Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. *Nature*. 339:155-156.
- Giraud CG., Daniotti JL., Maccioni HJ.** (2001). Physical and functional association of glycolipid *N*-acetyl-galactosaminyl and galactosyl transferases in the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:1625-30.
- Giraud CG., Maccioni HJ.** (2003). Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells. *J Biol Chem*. 278:40262-40271.
- Granovsky M., Fata J., Pawling J., Muller WJ., Khokha R., Dennis JW.** (2000). Suppression of tumor growth and metastasis in *Mgat5*-deficient mice. *Nat Med*. 6:306-312.
- Grant SC., Kostakoglu L., Kris MG., Yeh SD., Larson SM., Finn RD., Oettgen HF., Cheung NV.** (1996). Targeting of small-cell lung cancer using the anti-GD2 ganglioside monoclonal antibody 3F8: a pilot trial. *Eur J Nucl Med*. 23:145-149.
- Gu X., Preuss U., Gu T., Yu RK.** (1995). Regulation of sialyltransferase activities by phosphorylation and dephosphorylation. *J Neurochem*. 64:2295-2302.
- Guérin S., Hill C.** (2009). Cancer epidemiology in France in 2010, comparison with the USA. *Bull Cancer*. 97:47-54.
- Gupta G., Surolia A.** (2010). Glycosphingolipids in microdomain formation and their spatial organization. *FEBS Lett*. 584:1634-1641.
- Gupta GP., Nguyen DX., Chiang AC., Bos PD., Kim JY., Nadal C., Gomis RR., Manova-Todorova K., Massagué J.** (2007a). Mediators of vascular remodelling co-opted for sequential steps in lung metastasis. *Nature*. 446:765-770.
- Gupta GP., Perk J., Acharyya S., de Candia P., Mittal V., Todorova-Manova K., Gerald WL., Brogi E., Benezra R., Massagué J.** (2007b). ID genes mediate tumor reinitiation during breast cancer lung metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:19506-19511.
- Hakomori S.** (2002). Inaugural Article: The glycosynapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:225-232.
- Hakomori S.** (2003). Structure, organization, and function of glycosphingolipids in membrane. *Curr Opin Hematol*. 10:16-24.
- Hakomori S.** (2010). Glycosynaptic microdomains controlling tumor cell phenotype through alteration of cell growth, adhesion, and motility. *FEBS Lett*. 584:1901-1916.
- Hamamura K., Furukawa K., Hayashi T., Hattori T., Nakano J., Nakashima H., Okuda T., Mizutani H., Hattori H., Ueda M., Urano T., Lloyd KO., Furukawa K.** (2005). Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:11041-11046.
- Hamamura K., Tsuji M., Ohkawa Y., Nakashima H., Miyazaki S., Urano T., Yamamoto N., Ueda M., Furukawa K., Furukawa K.** (2008). Focal adhesion kinase as well as p130Cas and paxillin is crucially involved in the enhanced malignant properties under expression of ganglioside GD3 in melanoma cells. *Biochim Biophys Acta*. 1780:513-519.

- Hammache D., Pieroni G., Yahi N., Delezay O., Koch N., Lafont H, Tamalet C, Fantini J.** (1998). Specific interaction of HIV-1 and HIV-2 surface envelope glycoproteins with monolayers of galactosylceramide and ganglioside GM3. *J. Biol. Chem.* 273:7967–7971.
- Hanada K., Kumagai K., Tomishige N., Yamaji T.** (2009). CERT-mediated trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta.* 1791:684-691.
- Hanahan D., Weinberg RA.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell.* 100:57-70.
- Haraguchi M., Yamashiro S., Yamamoto A. Furukawa K., Takamiya K., Lloyd K.O., Shiku H., Furukawa K.** (1994) Isolation of GD<sub>3</sub> Synthase Gene by Expression Cloning of GM<sub>3</sub>  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferase cDNA Using Anti-GD<sub>2</sub> Monoclonal Antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 10455-10459.
- Haraguchi M., Yamashiro S., Furukawa K., Takamiya K., Shiku H., Furukawa K.** (1995). The effects of the site-directed removal of *N*-glycosylation sites from beta-1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase on its function. *Biochem J.* 312 :273-280.
- Harduin-Lepers A., Mollicone R., Delannoy P., Oriol R.** (2005). The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology.* 15:805-817.
- Harduin-Lepers A.** (2010) Comprehensive Analysis of Sialyltransferases in Vertebrate Genomes. *Glycobiology Insights.* <http://www.la-press.com/>
- Hebbar M., Krzewinski-Recchi MA., Hornez L., Verdière A., Harduin-Lepers A., Bonnetterre J., Delannoy P., Peyrat JP.** (2003). Prognostic value of tumoral sialyltransferase expression and circulating E-selectin concentrations in node-negative breast cancer patients. *Int J Biol Markers.* 18:116-122.
- Hedberg KM., Dellheden B., Wikstrand CJ., Fredman P.** (2000). Monoclonal anti-GD3 antibodies selectively inhibit the proliferation of human malignant glioma cells *in vitro*. *Glycoconj J.* 17:717-726.
- Hettmer S., Malott C., Woods W., Ladisch S., Kaucic K.** (2003). Biological stratification of human neuroblastoma by complex "B" pathway ganglioside expression. *Cancer Res.* 63:7270-7276.
- Hettmer S., Ladisch S., Kaucic K.** (2005). Low complex ganglioside expression characterizes human neuroblastoma cell lines. *Cancer Lett.* 225:141-149.
- Hidari JK., Ichikawa S., Furukawa K., Yamasaki M., Hirabayashi Y.** (1994). Beta 1-4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase can synthesize both asialoglycosphingolipid GM2 and glycosphingolipid GM2 *in vitro* and *in vivo*: isolation and characterization of a beta 1-4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase cDNA clone from rat ascites hepatoma cell line AH7974F. *Biochem J.* 303:957-965.
- Hirabayashi Y., Hyogo A., Nakao T., Tsuchiya K., Suzuki Y., Matsumoto M., Kon K., Ando S.** (1990). Isolation and characterization of extremely minor gangliosides, GM1b and GD1 alpha, in adult bovine brains as developmentally regulated antigens. *J Biol Chem.* 265:8144-8151.

- Hochgräfe F., Zhang L., O'Toole SA., Browne BC., Pinese M., Porta Cubas A., Lehrbach GM., Croucher DR., Rickwood D., Boulghourjian A., Shearer R., Nair R., Swarbrick A., Faratian D., Mullen P., Harrison DJ., Biankin AV., Sutherland RL., Raftery MJ., Daly RJ.** (2010). Tyrosine phosphorylation profiling reveals the signaling network characteristics of basal breast cancer cells. *Cancer Res.* PMID: 20861192
- Holmberg LA., Sandmaier BM.** (2004). Vaccination with Theratope (STn-KLH) as treatment for breast cancer. *Expert Rev Vaccines.* 3:655-663.
- Houghton AN., Mintzer D., Cordon-Cardo C., Welt S., Fliegel B., Vadhan S., Carswell E., Melamed MR., Oettgen HF., Old LJ.** (1985). Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82:1242-1246.
- Hu G., Chong RA., Yang Q., Wei Y., Blanco MA., Li F., Reiss M., Au JL., Haffty BG., Kang Y.** (2009). MTDH activation by 8q22 genomic gain promotes chemoresistance and metastasis of poor-prognosis breast cancer. *Cancer Cell.* 15:9-20.
- Hyuga S., Kawasaki N., Hyuga M., Ohta M., Shibayama R., Kawanishi T., Yamagata S., Yamagata T., Hayakawa T.** (2001). Ganglioside GD1a inhibits HGF-induced motility and scattering of cancer cells through suppression of tyrosine phosphorylation of c-Met. *Int J Cancer.* 94:328-334.
- Iber H., van Echten G., Klein RA., Sandhoff K.** (1990). pH-dependent changes of ganglioside biosynthesis in neuronal cell culture. *Eur J Cell Biol.* 52:236-240.
- Ichikawa N., Iwabuchi K., Kurihara H., Ishii K., Kobayashi T., Sasaki T., Hattori N., Mizuno Y., Hozumi K., Yamada Y., Arikawa-Hirasawa E.** (2009). Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *J Cell Sci.* 122:289-299.
- Ishii A., Ohta M., Watanabe Y., Matsuda K., Ishiyama K., Sakoe K., Nakamura M., Inokuchi J., Sanai Y., Saito M.** (1998). Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase. *J Biol Chem.* 273:31652-31655.
- IUPAC-IUB** (1978). The nomenclature of lipids (recommendations 1976). Commission on Biochemical Nomenclature. *J Lipid Res.* 19:114-28.
- Järvinen TA., Liu ET.** (2006). Simultaneous amplification of HER-2 (ERBB2) and topoisomerase IIalpha (TOP2A) genes--molecular basis for combination chemotherapy in cancer. *Curr Cancer Drug Targets.* 6:579-602.
- Jeyakumar M., Dwek RA., Butters TD., Platt FM** (2005). Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain. *Nat Rev Neurosci.* 6:713-725.
- Jin L., Fuchs A., Schnitt SJ., Yao Y., Joseph A., Lamszus K., Park M., Goldberg ID., Rosen EM.** (1997). Expression of scatter factor and c-met receptor in benign and malignant breast tissue. *Cancer.* 79:749-760.

- Julien S., Krzewinski-Recchi M.A., Harduin-Lepers A., Gouyer V., Huet G., Le Bourhis X., Delannoy P.** (2001). Expression of sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc alpha2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I) cDNA. *Glycoconj. J.*, 18:883-893.
- Julien S., Adriaenssens E., Ottenberg K., Furlan A., Courtand G., Vercoutter-Edouart AS., Hanisch FG., Delannoy P., Le Bourhis X.** (2006). ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. *Glycobiology*. 16:54-64.
- Julien S., Picco G., Sewell R., Vercoutter-Edouart AS., Tarp M., Miles D., Clausen H., Taylor-Papadimitriou J., Burchell JM.** (2009). Sialyl-Tn vaccine induces antibody-mediated tumour protection in a relevant murine model. *Br J Cancer*. 100:1746-1754.
- Kabayama K., Sato T., Kitamura F., Uemura S., Kang BW., Igarashi Y., Inokuchi J.** (2005). TNFalpha-induced insulin resistance in adipocytes as a membrane microdomain disorder: involvement of ganglioside GM3. *Glycobiology*. 15:21-29.
- Kabayama K., Sato T., Saito K., Loberto N., Prinetti A., Sonnino S., Kinjo M., Igarashi Y., Inokuchi J.**(2007). Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:13678-13683.
- Kahlenborn C., Modugno F., Severs WB.** (2008). Oral contraceptives and breast cancer. *Mayo Clin Proc*. 83:849-850.
- Kakugawa K., Wada T., Yamaguchi K., Yamanami H., Ouchi K., Sato I., Miyagi T.** (2002). Up-regulation of plasma membrane-associated ganglioside sialidase (Neu 3) in human colon cancer and its involvement in apoptosis suppression, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:10718–10723.
- Kamangar F., Dores GM., Anderson WF.** (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 24:2137-2150.
- Kanda N., Nakai K., Watanabe S.** (2001). Gangliosides GD1b, GT1b, and GQ1b suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukin-8 production: the inhibition of adenylate cyclase. *J Invest Dermatol*. 117:284-293.
- Kang R., Saito H., Ihara Y., Miyoshi E., Koyama N., Sheng Y., Taniguchi N.** (1996). Transcriptional regulation of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene in human bile duct carcinoma cells (HuCC-T1) is mediated by Ets-1. *J Biol Chem*. 271:26706–26712.
- Kang NY., Kang SK., Lee YC., Choi HJ., Lee YS., Cho SY., Kim YS., Ko JH., Kim CH.** (2006). Transcriptional regulation of the human GD3 synthase gene expression in Fas-induced Jurkat T cells: a critical role of transcription factor NF-kappaB in regulated expression. *Glycobiology*. 16:375-389.
- Kang NY., Kim CH., Kim KS., Ko JH., Lee JH., Jeong YK., Lee YC.** (2007). Expression of the human CMP-NeuAc: GM3 alpha2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) gene through the NF-kappaB activation in human melanoma SK-MEL-2 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1769:622-630.

- Kang Y., Siegel PM., Shu W., Drobnjak M., Kakonen SM., Cordón-Cardo C., Guise TA., Massagué J.** (2003). A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 3:537-549.
- Kannagi R., Izawa M., Koike T., Miyazaki K., Kimura N.** (2004). Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci*. 95:377-384.
- Kawamura YI., Toyota M., Kawashima R., Hagiwara T., Suzuki H., Imai K., Shinomura Y., Tokino T., Kannagi R., Dohi T.** (2008). DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology*. 135:142-151.
- Kaucic K., Liu Y., Ladisch S.** (2006). Modulation of growth factor signaling by gangliosides: positive or negative? *Methods Enzymol*. 417:168-185.
- Kawashima N., Yoon SJ., Itoh K., Nakayama K.** (2009). Tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor is regulated by GM3 binding through carbohydrate to carbohydrate interactions. *J Biol Chem*. 284:6147-6155.
- Key TJ., Verkasalo PK., Banks E.** (2001). Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol*. 2:133-140.
- Kim KW., Kim SW., Min KS., Kim CH., Lee YC.** (2001): Genomic structure of human GM3 synthase gene (hST3Gal V) and identification of mRNA isoforms in the 5'-untranslated region. *Gene*. 273: 163-171.
- Kim YJ., Varki A.** (1997). Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J*.14:569-576.
- Kirkwood JM., Mascari RA., Edington HD., Rabkin MS., Day RS., Whiteside TL., Vlock DR., Shipe-Spotloe JM.** (2000). Analysis of therapeutic and immunologic effects of R(24) anti-GD3 monoclonal antibody in 37 patients with metastatic melanoma. *Cancer*. 88:2693-2702.
- Klima H., Klein A., van Echten G., Schwarzmann G., Suzuki K., Sandhoff K.** (1993) Overexpression of a functionally active human GM2-activator protein in Escherichia coli, *Biochem. J*. 292: 571–576.
- Knudson AG.** (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:10914-10921.
- Knutson KL.** (2002) GMK (Progenics Pharmaceuticals). *Curr Opin Investig Drugs*. 3:159-164.
- Ko K., Furukawa K., Takahashi T., Urano T., Sanai Y., Nagino M., Nimura Y., Furukawa K.** (2006). Fundamental study of small interfering RNAs for ganglioside GD3 synthase gene as a therapeutic target of lung cancers. *Oncogene*. 25:6924-6935.
- Kohla G., Stockfleth E., Schauer R.** (2002). Gangliosides with *O*-acetylated sialic acids in tumors of neuroectodermal origin. *Neurochem Res*. 27:583-592.

- Koochekpour S., Merzak A., Pilkington G.J.** (1996). Vascular endothelial growth factor production is stimulated by gangliosides and TGF-beta isoforms in human glioma cells *in vitro*. *Cancer Lett.* 102:209-215.
- Kopitz J., von Reitzenstein C., Burchert M., Cantz M., Gabius HJ.** (1998). Galectin-1 is a major receptor for ganglioside GM1, a product of the growth-controlling activity of a cell surface ganglioside sialidase, on human neuroblastoma cells in culture. *J Biol Chem.* 273:11205-11311.
- Kotani M., Hosoya H., Kubo H., Itoh K., Sakuraba H., Kusubata M., Inagaki M., Yazaki S., Suzuki Y., Tai T.** (1994). Evidence for direct binding of intracellularly distributed ganglioside GM2 to isolated vimentin intermediate filaments in normal and Tay-Sachs disease human fibroblasts. *Cell Struct Funct.* 19:81-87.
- Kroes RA., He H., Emmett MR., Nilsson CL., Leach FE 3rd., Amster IJ., Marshall AG., Moskal JR.** (2010). Overexpression of ST6GalNAcV, a ganglioside-specific alpha2,6-sialyltransferase, inhibits glioma growth *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:12646-12651.
- Kuphal S., Bauer R., Bosserhoff AK.** (2005). Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 24:195-222.
- Ladisch S., Chang F., Li R., Cogen P., Johnson D.** (1997). Detection of medulloblastoma and astrocytoma-associated ganglioside GD3 in cerebrospinal fluid. *Cancer Lett.* 120:71-78.
- Lai AZ., Abella JV., Park M.** (2009). Crosstalk in Met receptor oncogenesis. *Trends Cell Biol.* 19:542-551.
- Lau K., Partridge EA., Silvescu CI., Grigorian A., Pawling J., Reinhold VN., Demetriou M., Dennis JW.** (2007). Complex *N*-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell.* 129:123-124.
- Lau KS., Dennis JW.** (2008). *N*-Glycans in cancer progression. *Glycobiology.* 18:750-760.
- Lazebnik Y.** (2010). What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer.* 10:232-233.
- Le Marer N., Laudet V., Svensson E.C., Cazlaris H., Van Hille B., Lagrou C., Stéhelin D., Montreuil J., Verbert A., Delannoy, P.** (1992). The *c-Ha-ras* oncogene induces increased expression of  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase in rat fibroblast (FR3T3) cells. *Glycobiology.* 2: 49-56.
- Le Marer N., Stéhelin D.** (1995) High  $\alpha$ 2,6-sialylation of *N*-acetylglucosamine sequences in *ras*-transformed rat fibroblasts correlates with high invasive potential. *Glycobiology* 5: 219-256.
- Lehmann U., Hasemeier B., Christgen M., Müller M., Römermann D., Länger F., Kreipe H.** (2008). Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer. *J Pathol.* 214:17-24.
- Lengyel E., Prechtel D., Resau JH., Gauger K., Welk A., Lindemann K., Salanti G., Richter T., Knudsen B., Vande Woude GF., Harbeck N.** (2005). C-Met overexpression in node-positive breast cancer identifies patients with poor clinical outcome independent of Her2/neu. *Int J Cancer.* 113:678-82.



- Levine AJ., Oren M.** (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 9:749-758.
- Li R., Villacreses N., Ladisch S.** (1995). Human tumor gangliosides inhibit murine immune responses *in vivo*. *Cancer Res*. 55:211-214.
- Li R., Gage D., McKallip R., Ladisch S.** (1996). Structural characterization and *in vivo* immunosuppressive activity of neuroblastoma GD2. *Glycoconj J*. 13:385-389.
- Linke T., Wilkening G., Sadeghlar F., Mozcall H., Bernardo K., Schuchman E., Sandhoff K.** (2001). Interfacial regulation of acid ceramidase activity. Stimulation of ceramide degradation by lysosomal lipids and sphingolipid activator proteins. *J. Biol. Chem*. 276: 5760-5768.
- Liu JW., Sun P., Yan Q., Paller AS., Gerami P., Ho N., Vashi N., Le Poole IC., Wang XQ.** (2009). De-*N*-acetyl GM3 promotes melanoma cell migration and invasion through urokinase plasminogen activator receptor signaling-dependent MMP-2 activation. *Cancer Res*. 69:8662-8669.
- Liu Y., Li R., Ladisch S.** (2004). Exogenous ganglioside GD1a enhances epidermal growth factor receptor binding and dimerization. *J. Biol Chem*. 279:36481-36489.
- Liu Y., McCarthy J., Ladisch S.** (2006). Membrane ganglioside enrichment lowers the threshold for vascular endothelial cell angiogenic signaling. *Cancer Res*. 66:10408-10414.
- Liu Y., Yan S., Wondimu A., Bob D., Weiss M., Sliwinski K., Villar J., Notario V., Sutherland M., Colberg-Poley AM., Ladisch S.** (2010). Ganglioside synthase knockout in oncogene-transformed fibroblasts depletes gangliosides and impairs tumor growth. *Oncogene*. 29:3297-3306.
- Lluis JM., Llacuna L., von Montfort C., Bárcena C., Enrich C., Morales A., Fernandez-Checa JC.** (2009). GD3 synthase overexpression sensitizes hepatocarcinoma cells to hypoxia and reduces tumor growth by suppressing the cSrc/NF-kappaB survival pathway. *PLoS One*. 4:e8059
- Lo AS., Ma Q., Liu DL., Junghans RP.** (2010). Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/T-cell receptor zeta designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors. *Clin Cancer Res*. 16:2769-2780.
- Lopez PH., Schnaar RL.** (2009). Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol*. 19:549-557.
- Ma, L., Teruya-Feldstein J, Behrendt N, Chen Z, Noda T, Hino O, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP.** (2005). Genetic analysis of Pten and Tsc2 functional interactions in the mouse reveals asymmetrical haploinsufficiency in tumor suppression. *Genes Dev*. 19, 1779-1786.
- Malisan F., Franchi L., Tomassini B., Ventura N., Condò I., Rippo MR., Rufini A., Liberati L., Nachtigall C., Kniep B., Testi R.** (2002a). Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside. *J Exp Med*. 196:1535-1541.
- Malisan F., Testi R.** (2002b). GD3 ganglioside and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 1585:179-187.

- Malisan F., Testi R.** (2005). The ganglioside GD3 as the Greek goddess Hecate: several faces turned towards as many directions. *IUBMB Life*. 57:477-482.
- Mandal C., Tringali C., Mondal S., Anastasia L., Chandra S., Venerando B., Mandal C.** (2010). Down regulation of membrane-bound Neu3 constitutes a new potential marker for childhood acute lymphoblastic leukemia and induces apoptosis suppression of neoplastic cells. *Int J Cancer*. 126:337-349.
- Marquina G., Waki H., Fernandez LE., Kon K., Carr A., Valiente O., Perez R., Ando S.** (1996). Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res*. 56:5165-5171.
- Martina JA., Daniotti JL., Maccioni HJ.** (1998). Influence of *N*-glycosylation and *N*-glycan trimming on the activity and intracellular traffic of GD3 synthase. *J Biol Chem*. 273:3725-3731.
- Martina JA., Daniotti JL., Maccioni HJ.** (2000). GM1 synthase depends on *N*-glycosylation for enzyme activity and trafficking to the Golgi complex. *Neurochem Res*. 25:725-731.
- Matrosovich M., Suzuki T., Hirabayashi Y., Garten W., Webster RG., Klenk HD.** (2006). Gangliosides are not essential for influenza virus infection. *Glycoconj J*. 23:107-113.
- Melchor L., Benítez J.** (2008). An integrative hypothesis about the origin and development of sporadic and familial breast cancer subtypes. *Carcinogenesis*. 29:1475-82.
- Mennel HD., Lell B.** (2005). Ganglioside (GD2) expression and intermediary filaments in astrocytic tumors. *Clin Neuropathol*. 24:13-18.
- Metcalf KA., Foulkes WD., Kim-Sing C., Ainsworth P., Rosen B., Armel S., Poll A., Eisen A., Gilchrist D., Chudley A., Ghadirian P., Maugard C., Lemire EG., Sun P., Narod SA.** (2008). Family history as a predictor of uptake of cancer preventive procedures by women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Clin Genet*. 73:474-479.
- Miki Y., Swensen J., Shattuck-Eidens D., Futreal PA., Harshman K., Tavtigian S., Liu Q., Cochran C., Bennett LM., Ding W., Qingyun Liu, Charles Cochran, Bell R., Rosenthal J., Hussey C., Tran T., McClure M., Frye C., Hattier T., Phelps R., Haugen-Strano A., Katcher H., Yakumo K., Gholami Z., Shaffer D., Stone S., Bayer S., Wray C., Bogden R., Dayananth P., Ward J., Tonin P., Narod S., Bristow PK., Norris FH., Helvering L., Morrison P., Rosteck P., Lai M., Barrett JC., Lewis C., Neuhausen S., Cannon-Albright L., David Goldgar, Wiseman R., Kamb A., Skolnick MH.** (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 266:66-71.
- Miles D., Papazisis K.** (2003). Rationale for the clinical development of STn- KLH (Therape) and anti-MUC-1 vaccines in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 3: S134:S138.
- Miljan EA., Bremer EG.**(2002a). Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci STKE*. PMID: 12454318.
- Miljan EA., Meuillet EJ., Mania-Farnell B., George D., Yamamoto H., Simon HG., Bremer EG.** (2002b). Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. *J Biol Chem*. 277:10108-10113.

- Minn AJ., Gupta GP., Siegel PM., Bos PD., Shu W., Giri DD., Viale A., Olshen AB., Gerald WL., Massagué J.** (2005). Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature*. 436:518-524.
- Mirkin BL., Clark SH., Zhang C.** (2002). Inhibition of human neuroblastoma cell proliferation and EGF receptor phosphorylation by gangliosides GM1, GM3, GD1A and GT1B. *Cell Prolif.* 35:105-115.
- Miyagi T., Wada T., Yamaguchi K., Hata K., Shiozaki K.** (2008). Plasma membrane-associated sialidase as a crucial regulator of transmembrane signalling. *J Biochem.* 144:279-285.
- Morales A., Colell A., Mari M., Garcia-Ruiz C., Fernandez-Checa JC.** (2004). Glycosphingolipids and mitochondria: role in apoptosis and disease. *Glycoconj J.* 20:579-588.
- Mukherjee K., Chava AK., Mandal C., Dey SN., Kniep B., Chandra S., Mandal C.** (2008). O-acetylation of GD3 prevents its apoptotic effect and promotes survival of lymphoblasts in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *J Cell Biochem.* 105:724-734.
- Mullan PB., Millikan RC.** (2007). Molecular subtyping of breast cancer: opportunities for new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci.* 64:3219-32.
- Mundy GR.** (2002). Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2:584-593.
- Murayama K., Levery SB., Schirmacher V., Hakomori S.** (1986) Qualitative differences in position of sialylation and surface expression of glycolipids between murine lymphomas with low metastatic (Eb) and high metastatic (ESb) potentials and isolation of a novel disialo-ganglioside (GD1 alpha) from Eb cells. *Cancer Res.* 46:1395-1402.
- Nakagoe T., Sawai T., Tsuji T., Jibiki M., Nanashima A., Yamaguchi H., Kurosaki N., Yasutake T., Ayabe H.** (2001). Circulating sialyl Lewis(x), sialyl Lewis(a), and sialyl Tn antigens in colorectal cancer patients: multivariate analysis of predictive factors for serum antigen levels. *J Gastroenterol.* 36:166-172.
- Nakano J., Raj BK., Asagami C., Lloyd KO.** (1996). Human melanoma cell lines deficient in GD3 ganglioside expression exhibit altered growth and tumorigenic characteristics. *J Invest Dermatol.* 107:543-548.
- Nakano J., Yasui H., Lloyd KO., Muto M.** (1999). Biologic roles of gangliosides G(M3) and G(D3) in the attachment of human melanoma cells to extracellular matrix proteins. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 4:173-186.
- Nakatsuji Y., Miller RH.** (2001). Selective cell-cycle arrest and induction of apoptosis in proliferating neural cells by ganglioside GM3. *Exp Neurol.* 168:290-299.
- Nakayama J., Fukuda MN., Hirabayashi Y., Kanamori A., Sasaki K., Nishi T., Fukuda M.** (1996). Expression cloning of a human GT3 synthase. GD3 AND GT3 are synthesized by a single enzyme. *J Biol Chem.* 271:3684-3691.

- Nara K., Watanabe Y., Maruyama K., Kasahara K., Nagai Y. and Sinai Y.** (1994). Expression Cloning of a CMP-NeuAc Gal $\beta$ 1,4Glc $\beta$ 1-1'-Cer  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferase (G<sub>D3</sub> Synthase) from Human Melanoma Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 7952-7956.
- Nasi ML., Meyers M., Livingston PO., Houghton AN., Chapman PB.** (1997). Anti-melanoma effects of R24, a monoclonal antibody against GD3 ganglioside. *Melanoma Res.* 2:155-162.
- Nguyen DX., Bos PD., Massagué J.** (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 9:274-284.
- Nicoll G., Avril T., Lock K., Furukawa K., Bovin N., Crocker PR.** (2003). Ganglioside GD3 expression on target cells can modulate NK cell cytotoxicity *via* siglec-7-dependent and -independent mechanisms. *Eur J Immunol.* 33:1642-1648.
- Niederhafner P., Reinis M., Sebestík J., Jezek J.** (2008). Glycopeptide dendrimers, part III: a review. Use of glycopeptide dendrimers in immunotherapy and diagnosis of cancer and viral diseases. *J Pept Sci.* 14:556-587.
- Nikolsky Y., Sviridov E., Yao J., Dosymbekov D., Ustyansky V., Kaz-nacheev V., Dezso Z., Mulvey L., Macconail LE., Winckler W., Sere-bryiskaya T., Nikolskaya T., Polyak K.** (2008). Genome-wide functional synergy between amplified and mutated genes in human breast cancer. *Cancer Res.* 68:9532-9540.
- Nohara K., Wang F., Spiegel S.** (1998). Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 48:149-157.
- Noll EN., Lin J., Nakatsuji Y., Miller RH., Black PM.** (2001). GM3 as a novel growth regulator for human gliomas. *Exp Neurol.* 168:300-309.
- Nores GA., Caputto R.** (1984). Inhibition of the UDP-N-acetylgalactosamine: GM3, N-acetylgalactosaminyl transferase by gangliosides. *J Neurochem.* 42:1205-1211.
- Nowell PC.** (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 194:23-28.
- O'Reilly MK., Paulson JC.** (2009). Siglecs as targets for therapy in immune-cell-mediated disease. *Trends Pharmacol Sci.* 30(5):240-248.
- Oblinger JL., Pearl DK., Boardman CL., Saqr H., Prior TW., Scheithauer BW., Jenkins RB., Burger PC., Yates AJ.** (2006). Diagnostic and prognostic value of glycosyltransferase mRNA in glioblastoma multiforme patients. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 32:410-418.
- Ohkawa Y., Miyazaki S., Hamamura K., Kambe M., Miyata M., Tajima O., Ohmi Y., Yamauchi Y., Furukawa K., Furukawa K.** (2010). Ganglioside GD3 enhances adhesion signals and augments malignant properties of melanoma cells by recruiting integrins to glycolipid-enriched microdomains. *J Biol Chem.* 285:27213-27223.
- Ohtani Y., Tamai Y., Ohnuki Y., Miura S.** (1996). Ganglioside alterations in the central and peripheral nervous systems of patients with Creutzfeldt-Jacob disease. *Neurodegeneration.* 5:331-338.

- Oliva JP., Valdes Z., Casaco A., Pimentel G., Gonzalez J., Alvarez I., Osorio M., Velazco M., Figueroa M., Ortiz R. Escobar X., Orozco M., Cruz J., Franco S., Díaz M., Roque L., Carr A., Vázquez AM., Mateos C., Rubio MC., Pérez R., Fernández LE.** (2006). Clinical evidences of GM3 (NeuGc) ganglioside expression in human breast cancer using the 14F7 monoclonal antibody labelled with (99m)Tc. *Breast Cancer Res Treat.* 96:115-121.
- Olivier M., Langerød A., Carrieri P., Bergh J., Klaar S., Eyfjord J., Theillet C., Rodriguez C., Lidereau R., Bièche I., Varley J., Bignon Y., Uhrhammer N., Winqvist R., Jukola-Vuorinen A., Niederacher D., Kato S., Ishioka C., Hainaut P., Børresen-Dale AL.**(2006). The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 12:1157-1167.
- Owens MA., Horten BC., Da Silva MM.** (2004). HER2 amplification ratios by fluorescence *in situ* hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin. Breast Cancer.* 5:63–69.
- Padua D., Zhang XH., Wang Q., Nadal C., Gerald WL., Gomis RR., Massagué J.** (2008). TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell.* 133:66-77.
- Pan B., Fromholt SE., Hess EJ., Crawford TO., Griffin JW., Sheikh KA., Schnaar R.L.** (2005). Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp. Neurol.* 195: 208–217.
- Pan SY., DesMeules M.** (2009). Energy intake, physical activity, energy balance, and cancer: epidemiologic evidence. *Methods Mol Biol.* 472:191-215.
- Papini N., Anastasia L., Tringali C., Croci G., Bresciani R., Miyagi T., Yamaguchi K., Preti A., Prinetti A., Prioni S., Sonnino S., Tettamanti G., Venerando B., Monti E.** (2004). The plasma membrane-associated sialidase Neu3 modifies the cell surface ganglioside pattern through cell-to-cell interactions. *J. Biol. Chem.* 279:16989–16995.
- Parr C., Watkins G., Mansel RE., Jiang WG.** (2004). The hepatocyte growth factor regulatory factors in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 10:202-211.
- Partridge EA., Le Roy C., Di Guglielmo GM., Pawling J., Cheung P., Granovsky M., Nabi IR., Wrana JL., Dennis JW.** (2004). Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science.* 306:120–124.
- Pawitan Y., Bjöhle J., Amler L., Borg AL., Egyhazi S., Hall P., Han X., Holmberg L., Huang F., Klaar S., Liu ET., Miller L., Nordgren H., Ploner A., Sandelin K., Shaw PM., Smeds J., Skoog L., Wedrén S., Bergh J.** (2005). Gene expression profiling spares early breast cancer patients from adjuvant therapy: derived and validated in two population-based cohorts. *Breast Cancer Res.* 7:953-64.
- Péguet-Navarro J., Sportouch M., Popa I., Berthier O., Schmitt D., Portoukalian J.** (2003). Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol.* 170:3488-3494.

- Perou CM., Sørlie T., Eisen MB., van de Rijn M., Jeffrey SS., Rees CA., Pollack JR., Ross DT., Johnsen H., Akslen LA., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu SX., Lønning PE., Børresen-Dale AL., Brown PO., Botstein D.** (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 406:747-52.
- Perry RJ., Ridgway ND.** Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport. *Biochim Biophys Acta*. 1734:220-234.
- Pharoah PD., Day NE., Duffy S., Easton DF., Ponder BA.** (1997). Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 71:800-809.
- Polyak K.** (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 117:3155-3163.
- Ponzo MG., Lesurf R., Petkiewicz S., O'Malley FP., Pinnaduwege D., Andrulis IL., Bull SB., Chughtai N., Zuo D., Souleimanova M., Germain D., Omeroglu A., Cardiff RD., Hallett M., Park M.** (2009). Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:12903-12908.
- Popa I., Pons A., Mariller C., Tai T., Zanetta JP., Thomas L., Portoukalian J.** (2007). Purification and structural characterization of de-N-acetylated form of GD3 ganglioside present in human melanoma tumors. *Glycobiology*. 17:367-373.
- Porter PL.** (2009). Global trends in breast cancer incidence and mortality. *Salud Publica Mex*. 51:141-146.
- Portoukalian J., Zwingelstein G., Doré JF.** (1979). Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur J Biochem*. 94:19-23.
- Price JE., Polyzos A., Zhang RD., Daniels LM.** (1990). Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res*. 50:717-721.
- Prinetti A., Loberto N., Chigorno V., Sonnino S.** (2009). Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1788:184-193.
- Rakha EA., Elsheikh SE., Aleskandarany MA., Habashi HO., Green AR., Powe DG., El-Sayed ME., Benhasouna A., Brunet JS., Akslen LA., Evans AJ., Blamey R., Reis-Filho JS., Foulkes WD., Ellis IO.** (2009). Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*. 15:2302-10.
- Ragupathi G., Meyers M., Adluri S., Howard L., Musselli C., Livingston PO.** (2000). Induction of antibodies against GD3 ganglioside in melanoma patients by vaccination with GD3-lactone-KLH conjugate plus immunological adjuvant QS-21. *Int J Cancer*. 85:659-666.
- Ragupathi G., Livingston PO., Hood C., Gathuru J., Krown SE., Chapman PB., Wolchok JD., Williams LJ., Oldfield RC., Hwu WJ.** (2003). Consistent antibody response against ganglioside GD2 induced in patients with melanoma by a GD2 lactone-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine plus immunological adjuvant QS-21. *Clin Cancer Res*. 9:5214-5220.

- Ragupathi G., Damani P., Srivastava G., Srivastava O., Sucheck SJ., Ichikawa Y., Livingston PO.** (2009). Synthesis of sialyl Lewis(x) (sLe(x), CA19-9) and construction of an immunogenic sLe(x) vaccine. *Cancer Immunol Immunother.* 58:1397-405.
- Ravindranath MH., Muthugounder S., Presser N., Selvan SR., Santin AD., Bellone S., Saravanan TS., Morton DL.** (2007). Immunogenic gangliosides in human ovarian carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 353:251-258.
- Rawat SS., Gallo SA., Eaton J., Martin TD., Ablan S., KewalRamani VN., Wang JM., Blumenthal R., Puri A.** (2004). Elevated expression of GM3 in receptor-bearing targets confers resistance to human immunodeficiency virus type 1 fusion. *J Virol.* 78:7360-7378.
- Recchi MA., Hebbar M., Hornez L., Harduin-Lepers A., Peyrat JP., Delannoy P.** (1998). Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer. *Cancer Res.* 58:4066-4070.
- Rippo MR., Malisan F., Ravagnan L., Tomassini B., Condo IP., Constantini P., Susin SA., Rufini A., Todaro M., Kroemer G., Testi R.** (2000). GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2 controlled fashion. *FASEB J* 14: 2047-2054.
- Romond EH., Perez EA., Bryant J., Suman VJ., Geyer CE Jr., Davidson NE., Tan-Chiu E., Martino S., Paik S., Kaufman PA., Swain SM., Pisansky TM., Fehrenbacher L., Kutteh LA., Vogel VG., Visscher DW., Yothers G., Jenkins RB., Brown AM., Dakhil SR., Mamounas EP., Lingle WL., Klein PM., Ingle JN., Wolmark N.** (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 353:1673-1684.
- Rosen EM., Fan S., Ma Y.** (2006). BRCA1 regulation of transcription. *Cancer Lett.* 236:175-185.
- Ruan S., Lloyd KO.** (1992). Glycosylation pathways in the biosynthesis of gangliosides in melanoma and neuroblastoma cells: relative glycosyltransferase levels determine ganglioside patterns. *Cancer Res.* 52:5725-5731.
- Ruan S., Raj BK., Lloyd KO.** (1999). Relationship of glycosyltransferases and mRNA levels to ganglioside expression in neuroblastoma and melanoma cells. *J Neurochem.* 72:514-521.
- Ruckhäberle E., Rody A., Engels K., Gaetje R., von Minckwitz G., Schiffmann S., Grösch S., Geisslinger G., Holtrich U., Karn T/, Kaufmann M.** (2008). Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 112:41-52.
- Ruckhäberle E., Karn T., Rody A., Hanker L., Gätje R., Metzler D., Holtrich U., Kaufmann M.** (2009). Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 135:1005-1013.
- Rusnati M., Urbinati C., Tanghetti E., Dell'Era P., Lortat-Jacob H., Presta M.** (2002). Cell membrane GM1 ganglioside is a functional coreceptor for fibroblast growth factor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99. 4367-4437.

- Saito M., Sugiyama K.** (2002). Characterization of nuclear gangliosides in rat brain: concentration, composition, and developmental changes. *Arch Biochem Biophys.* 398:153-159.
- Sano R., Annunziata I., Patterson A., Moshiach S., Gomero E., Opferman J., Forte M., d'Azzo A.** (2009). GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptosis. *Mol Cell.* 36:500-511.
- Saqr HE., Omran O., Dasgupta S., Yu RK., Oblinger JL., Yates AJ.** (2006). Endogenous GD3 ganglioside induces apoptosis in U-1242 MG glioma cells. *J Neurochem.* 96:1301-1314.
- Sasaki K., Kurata K., Kojima N., Kurosawa N., Ohta S., Hanai N., Tsuji S., Nishi T.** (1994) Expression Cloning of a GM3  $\alpha$ 2,8-Sialyltransferase (GD3 Synthase). *J. Biol. Chem.* 269: 15950-15956.
- Sawada M., Moriya S., Saito S., Shineha R., Satomi S., Yamori T., Tsuruo T., Kannagi R., Miyagi T.** (2002). Reduced sialidase expression in highly metastatic variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression. *Int J Cancer.* 97:180-195.
- Schauer R.** (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol.* 19:507-514.
- Schnaar RL.** (2010). Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Lett.* 584:1741-1747.
- Scheideler MA., Dawson G.** (1986). Direct demonstration of the activation of UDP-N-acetylgalactosamine: [GM3]N-acetylgalactosaminyltransferase by cyclic AMP. *J Neurochem.* 46:1639-1643.
- Schreiber SC., Giehl K., Kastilan C., Hasel C., Mühlenhoff M., Adler G., Wedlich D., Menke A.** (2008). Polysialylated NCAM represses E-cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic tumor cells. *Gastroenterology.* 134:1555-1566.
- Schulze H., Kolter T., Sandhoff K.** (2009). Principles of lysosomal membrane degradation: Cellular topology and biochemistry of lysosomal lipid degradation *Biochim Biophys Acta.* 1793:674-683.
- Scott AM., Lee FT., Hopkins W., Cebon JS., Wheatley JM., Liu Z., Smyth FE., Murone C., Sturrock S., MacGregor D., Hanai N., Inoue K., Yamasaki M., Brechbiel MW., Davis ID., Murphy R., Hannah A., Lim-Joon M., Chan T., Chong G., Ritter G., Hoffman EW., Burgess AW., Old LJ.** (2001). Specific targeting, biodistribution, and lack of immunogenicity of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma: results of a phase I trial. *J Clin Oncol.* 19:3976-3987.
- Scott AM., Liu Z., Murone C., Johns TG., MacGregor D., Smyth FE., Lee FT., Cebon J., Davis ID., Hopkins W., Mountain AJ., Rigopoulos A., Hanai N., Old LJ.** (2005). Immunological effects of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immun.* 22:3-15.
- Seal MD., Chia SK.** (2010). What is the difference between triple-negative and basal breast cancers? *Cancer J.* 16:12-6.



- Senn HJ., Orth M., Fitzke E., Wieland H., Gerok W.** (1989). Gangliosides in normal human serum. Concentration, pattern and transport by lipoproteins. *Eur J Biochem.* 181:657-662.
- Séradour B., Allemand H., Weill A., Ricordeau P.** (2010). Sustained lower rates of breast cancer incidence in France in 2007. *Breast Cancer Res Treat.* 121:799-800.
- Sergina NV., Moasser MM.** (2007). The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med.* 13:527-534.
- Shinoura N., Dohi T., Kondo T., Yoshioka M., Takakura K., Oshima M.** (1992). Ganglioside composition and its relation to clinical data in brain tumors. *Neurosurgery.* 31:541-549.
- Shipitsin M., Campbell LL., Argani P., Weremowicz S., Bloushtain-Qimron N., Yao J., Nikolskaya T., Serebryiskaya T., Beroukhim R., Hu M., Halushka MK., Sukumar S., Parker LM., Anderson KS., Harris LN., Garber JE., Richardson AL., Schnitt SJ., Nikolsky Y., Gelman RS., Polyak K.** (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell.* 11:259-273.
- Shipitsin M., Polyak K.** (2008). The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance *Lab Invest.* 88:459-463.
- Shirakawa K., Tsuda H., Heike Y., Kato K., Asada R., Inomata M., Sasaki H., Kasumi F., Yoshimoto M., Iwanaga T., Konishi F., Terada M., Wakasugi H.** (2001). Absence of endothelial cells, central necrosis, and fibrosis are associated with aggressive inflammatory breast cancer. *Cancer Res.* 61:445-451.
- Shitara K., Kuwana Y., Nakamura K., Tokutake Y., Ohta S., Miyaji H., Hasegawa M., Hanai N.** (1993). A mouse/human chimeric anti-(ganglioside GD3) antibody with enhanced antitumor activities. *Cancer Immunol Immunother.* 36:373-380.
- Simon BM., Malisan F., Testi R., Nicotera P., Leist M.** (2002). Disialoganglioside GD3 is released by microglia and induces oligodendrocyte apoptosis. *Cell Death Differ.* 9:758-767.
- Sims AH., Howell A., Howell SJ., Clarke RB.** (2007). Origins of breast cancer subtypes and therapeutic implications. *Nat Clin Pract Oncol.* 4:516-525.
- Slamon DJ., Leyland-Jones B., Shak S., Fuchs H., Paton V., Bajamonde A., Fleming T., Eiermann W., Wolter J., Pegram M., Baselga J., Norton L.** (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 344:783-792.
- Soares R., Marinho A., Schmitt F.** (1996). Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters. *Pathol Res Pract.* 192:1181-1186.
- Sørli T., Perou CM., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen MB., van de Rijn M., Jeffrey SS., Thorsen T., Quist H., Matese JC., Brown PO., Botstein D., Eystein Lønning P., Børresen-Dale AL.** (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:10869-74.

- Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron JS., Nobel A., Deng S., Johnsen H., Pesich R., Geisler S., Demeter J., Perou CM., Lønning PE., Brown PO., Børresen-Dale AL., Botstein D.** (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:8418-23.
- Sotiriou C., Neo SY., McShane LM., Korn EL., Long PM., Jazaeri A., Martiat P., Fox SB., Harris AL., Liu ET.** (2003). Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10393-8.
- Sotiriou C., Piccart MJ.** (2007). Taking gene-expression profiling to the clinic: when will molecular signatures become relevant to patient care? *Nat Rev Cancer*. 7:545-53.
- Sottocornola E., Colombo I., Vergani V., Taraboletti G., Berra B.** (1999). Increased tumorigenicity and invasiveness of C6 rat glioma cells transfected with the human alpha-2,8 sialyltransferase cDNA. *Invasion Metastasis*. 18:142-154.
- Sternlicht MD.** (2006) Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res*. 8:201-212.
- Subik K., Lee JF., Baxter L., Strzepak T., Costello D., Crowley P., Xing L., Hung MC., Bonfiglio T., Hicks DG., Tang P.** (2010). The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer* . 4:35-41.
- Suhrke P., Zahl PH., Maehlen J.** (2009). Declining breast cancer incidence and decreased HRT use. *Lancet*. 373:460-461.
- Suzuki M, Suzuki M, Nakayama J, Suzuki A, Angata K, Chen S, Sakai K, Hagihara K, Yamaguchi Y, Fukuda M.** (2005). Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology*. 15:887-894.
- Suzuki Y.** (1994). Gangliosides as influenza virus receptors. Variation of influenza viruses and their recognition of the receptor sialo-sugar chains. *Prog Lipid Res*. 33:429-457.
- Svennerholm L.** (1964). The gangliosides. *Journal of Lipid Research*. 5: 145-155.
- Swarbrick A., Roy E., Allen T., Bishop JM.** (2008). Id1 cooperates with oncogenic Ras to induce metastatic mammary carcinoma by subversion of the cellular senescence response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:5402-5407.
- Tagami S., Inokuchi Ji J., Kabayama K., Yoshimura H., Kitamura F., Uemura S., Oga-  
wa C., Ishii A., Saito M., Ohtsuka Y., Sakaue S., Igarashi Y.** (2002). Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J Biol Chem*. 277:3085-3092.
- Takada A., Ohmori K., Yoneda T., Tsuyuoka K., Hasegawa A., Kiso M., Kannagi R.** (1993). Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res*. 53:354-361.
- Takashima S., Kono M., Kurosawa N., Yoshida Y., Tachida Y., Inoue M., Kanematsu T., Tsuji S.** (2000). Genomic organization and transcriptional regulation of the mouse GD3 synthase gene (ST8Sia I): comparison of genomic organization of the mouse sialyltransferase genes. *J Biochem*. 128:1033-1043.

- Taki T., Hirabayashi Y., Ishikawa H., Ando S., Kon K., Tanaka Y., Matsumoto M.** (1986). A ganglioside of rat ascites hepatoma AH 7974F cells. Occurrence of a novel disialo-ganglioside (GD1 alpha) with a unique *N*-acetylneuraminosyl (alpha 2-6)-*N*-acetyl-galactosamine structure. *J Biol Chem.* 261:3075-3078.
- Tavazoie SF., Alarcón C., Oskarsson T., Padua D., Wang Q., Bos PD., Gerald WL., Massagué J.** (2008). Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature.* 451:147-152.
- Tempera I., Buchetti B., Lococo E., Gradini R., Mastronardi A., Mascellino MT., Sale P., Mosca L., d'Erme M., Lenti L.** (2008). GD3 nuclear localization after apoptosis induction in HUT-78 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 368:495-500.
- Tettamanti G.** (2004). Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj J.* 20:301-317.
- Thampoe IJ., Furukawa K., Vellvé E., Lloyd KO.** (1989). Sialyltransferase levels and ganglioside expression in melanoma and other cultured human cancer cells. *Cancer Res.* 49:6258-6264.
- Thomas CP., Buronfosse A., Portoukalian J., Fertil B.** (1997). The gangliosides as a possible molecular coupling factor between the proportion of radiosensitive cells in vitro and the metastatic potential in vivo within a human melanoma cell line. *Br J Cancer.* 75:639-649.
- Thomas CP., Buronfosse A., Combaret V., Pedron S., Fertil B., Portoukalian J.** (1996). Gangliosides protect human melanoma cells from ionizing radiation-induced clonogenic cell death. *Glycoconj J.* 13:377-384.
- Thompson D., Easton D.** (2004). The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 9:221-236.
- Tlsty TD., Crawford YG., Holst CR., Fordyce CA., Zhang J., McDermott K., Kozakiewicz K., Gauthier ML.** (2004). Genetic and epigenetic changes in mammary epithelial cells may mimic early events in carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 9:263-274.
- Todeschini AR., Dos Santos JN., Handa K., Hakomori SI.** (2007). Ganglioside GM2-tetraspanin CD82 complex inhibits met and its cross-talk with integrins, providing a basis for control of cell motility through glycosynapse. *J Biol Chem.* 282:8123-8133.
- Todeschini R., Hakomori SI.** (2008a). Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochim Biophys Acta.* 1780:421-433.
- Todeschini AR., Dos Santos JN., Handa K., Hakomori SI.** (2008b). Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:1925-1930.
- Tokuyama S., Moriya S., Taniguchi S., Yasui A., Miyazaki J., Orikasa S., Miyagi T.** (1997). Suppression of pulmonary metastasis in murine B16 melanoma cells by transfection of a sialidase cDNA. *Int J Cancer.* 73:410-415.

- Trusolino L., Comoglio PM.** (2002). Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat Rev Cancer*. 2:289-300.
- Turner CE.** (2000). Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol*. 2:231-236.
- Uliana AS., Crespo PM., Martina JA., Daniotti JL., Maccioni HJ.** (2006). Modulation of GalT1 and SialT1 sub-Golgi localization by SialT2 expression reveals an organellar level of glycolipid synthesis control. *J Biol Chem*. 281:32852-32860.
- Vadhan-Raj S., Cordon-Cardo C., Carswell E., Mintzer D., Dantis L., Duteau C., Templeton MA., Oettgen HF., Old LJ., Houghton AN.** (1988). Phase I trial of a mouse monoclonal antibody against GD3 ganglioside in patients with melanoma: induction of inflammatory responses at tumor sites. *J Clin Oncol*. 6:1636-1648.
- van Cruijssen H., Ruiz MG., van der Valk P., de Gruijl TD., Giaccone G.** (2009). Tissue micro array analysis of ganglioside *N*-glycolyl GM3 expression and signal transducer and activator of transcription (STAT)-3 activation in relation to dendritic cell infiltration and microvessel density in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. PMID: 19519895
- van de Vijver MJ., He YD., van't Veer LJ., Dai H., Hart AA., Voskuil DW., Schreiber GJ., Peterse JL., Roberts C., Marton MJ., Parrish M., Atsma D., Witteveen A., Glas A., Delahaye L., van der Velde T., Bartelink H., Rodenhuis S., Rutgers ET., Friend SH., Bernards R.** (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 347:1999-2009.
- van Meer G.** (2001). What sugar next? Dimerization of sphingolipid glycosyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:1321-1323.
- Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME.** (2009). Essentials of Glycobiology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Veeck J., Esteller M.** (2010). Breast cancer epigenetics: from DNA methylation to micro-RNAs. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 15:5-17.
- Visvader JE., Lindeman GJ.** (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer*. 8:755-768.
- Wakeling AE.** (2005). Inhibitors of growth factor signalling. *Endocr Relat Cancer*. 1:S183-187.
- Wang HR., Hsieh CV., Twu YC, Yu LC.** (2008). Expression of the human Sd(a) beta-1,4-n-acetylgalactosaminyltransferase II gene is dependent on the promoter methylation status. *Glycobiology*. 18:104-113.
- Wang XQ., Sun P., Al-Qamari A., Tai T., Kawashima I., Paller AS.** (2001a). Carbohydrate-carbohydrate binding of ganglioside to integrin alpha(5) modulates alpha(5)beta(1) function, *J. Biol. Chem*. 276 8436-8444.
- Wang XQ., Sun P., Paller AS.** (2001b). Inhibition of integrin-linked kinase/protein kinase B/Akt signaling: mechanism for ganglioside-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 276:44504-44511.

- Wang Z., Sun Z., Li AV., Yarema KJ.** (2006). Roles for UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc 6-kinase outside of sialic acid biosynthesis: modulation of sialyltransferase and BiP expression, GM3 and GD3 biosynthesis, proliferation, and apoptosis, and ERK1/2 phosphorylation. *J Biol Chem.* 281:27016-27028.
- Watanabe Y., Nara K., Takahashi H., Nagai Y., Sanai Y.** (1996). The molecular cloning and expression of alpha2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) in a rat brain. *J. Biol Chem.* 120: 1020-1027.
- Weil RJ., Palmieri DC., Bronder JL., Stark AM., Steeg PS.** (2005). Breast cancer metastasis to the central nervous system. *Am J Pathol.* 167:913-920.
- Wen FQ., Jabbar AA., Patel DA., Kazarian T., Valentino LA.** (1999). Atherosclerotic aortic gangliosides enhance integrin-mediated platelet adhesion to collagen. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:519-524.
- Wilkening G., Linke T., Sandhoff K.** (1998). Lysosomal degradation on vesicular membrane surfaces. Enhanced glucosylceramide degradation by lysosomal anionic lipids and activators, *J. Biol. Chem.* 273:30271–30278.
- Wilkening G., Linke T., Uhlhorn-Dierks G., Sandhoff K.** (2000). Degradation of membrane-bound ganglioside GM1. Stimulation by bis(monoacylglycero)phosphate and the activator proteins SAP-B and GM2-AP. *J. Biol. Chem.* 275 35814–35819.
- Wooster R., Bignell G., Lancaster J., Swift S., Seal S., Mangion J., Collins N., Gregory S., Gumbs C., Micklem G.** (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* 378:789-792.
- Wu G., Lu ZH., Obukhov AG., Nowycky MC., Ledeen RW.** (2007) Induction of calcium influx through TRPC5 channels by cross-linking of GM1 ganglioside associated with alpha5beta1 integrin initiates neurite outgrowth. *J. Neurosci.* 27: 7447–7458.
- Xin X., Yang S., Ingle G., Zlot C., Rangell L., Kowalski J., Schwall R., Ferrara N., Gerritsen ME.** (2001). Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Am J Pathol.* 158:1111-1120.
- Yamaji T., Teranishi T., Alphey MS., Crocker PR., Hashimoto Y.** (2002). A small region of the natural killer cell receptor, Siglec-7, is responsible for its preferred binding to alpha 2,8-disialyl and branched alpha 2,6-sialyl residues. A comparison with Siglec-9. *J Biol Chem.* 277:6324-6332.
- Yamamoto A., Yamashiro S., Takamiya K., Atsuta M. Shiku H. Furukawa K.** (1995). Diverse expression of beta 1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase gene in the adult mouse brain, *J. Neurochem.* 65:2417–2424.
- Yamamoto A., Haraguchi M., Yamashiro S., Fukumoto S., Furukawa K., Takamiya K., Atsuta M., Shiku H., Furukawa K.** (1996). Heterogeneity in the expression pattern of two ganglioside synthase genes during mouse brain development. *J Neurochem.* 66:26-34.

- Yamashiro S., Okada M., Haraguchi M., Furukawa K., Lloyd KO., Shiku H., Furukawa K.** (1995). Expression of alpha 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) gene in human cancer cell lines: high level expression in melanomas and up-regulation in activated T lymphocytes. *Glycoconj J.* 12:894-900.
- Yamashita T., Wada R., Sasaki T., Deng C., Bierfreund U., Sandhoff K., Proia RL.** (1999). A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:9142-9147.
- Yamashita T., Hashiramoto A., Haluzik M., Mizukami H., Beck S., Norton A., Kono M., Tsuji S., Daniotti JL., Werth N., Sandhoff R., Sandhoff K., Proia RL.** (2003). Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3445-3449.
- Yamashita T., Wu YP., Sandhoff R., Werth N., Mizukami H., Ellis JM., Dupree JL., Geyer R., Sandhoff K., Proia RL.** (2005). Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glia interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:2725-2730.
- Yang J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A.** (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 117, 927–939.
- Yang J., Weinberg RA.** (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell.* 14:818-829.
- Yang X., Wei L., Tang C., Slack R., Montgomery E., Lippman M.** (2000). KAI1 protein is down-regulated during the progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 6:3424-3429.
- Yao M., Zhou DP., Jiang SM., Wang QH., Zhou XD., Tang ZY., Gu JX.** (1998) Elevated activity of *N*-acetylglucosaminyltransferase V in human hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 124:27-30.
- Yoon SJ., Nakayama K., Hikita T., Handa K., Hakomori SI.** (2006). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with *N*-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:18987-18991.
- Yoshida K., Miki Y.** (2004). Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 95:866-871.
- Yoshida S., Fukumoto S., Kawaguchi H., Sato S., Ueda R., Furukawa K.** (2001). Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res.* 61:4244-4252.
- Yoshida S., Kawaguchi H., Sato S., Ueda R., Furukawa K.** (2002). An anti-GD2 monoclonal antibody enhances apoptotic effects of anti-cancer drugs against small cell lung cancer cells via JNK (c-Jun terminal kinase) activation. *Jpn J Cancer Res.* 93:816-824.
- Yoshida Y., Kojima N., Kurosawa N., Hamamoto T., Tsuji S.** (1995) Molecular Cloning of Sialyltransferase from Mouse Brain. *J. Biol. Chem.* 270: 14628-14633.

- Yoshizumi S., Suzuki S., Hirai M., Hinokio Y., Yamada T., Yamada T., Tsunoda U., Aburatani H., Yamaguchi K., Miyagi T., Oka Y.** (2007). Increased hepatic expression of ganglioside-specific sialidase, NEU3, improves insulin sensitivity and glucose tolerance in mice. *Metabolism*. 56:420-429.
- You WK., McDonald DM.** (2008). The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB Rep*. 41:833-839.
- Yu RK., Macala LJ., Taki T., Weinfield HM., Yu FS.** (1988). Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain. *J Neurochem*. 50:1825-1829.
- Yu RK., Bieberich E.** (2001). Regulation of glycosyltransferases in ganglioside biosynthesis by phosphorylation and dephosphorylation. *Mol Cell Endocrinol*. 177:19-24.
- Yusuf HK., Schwarzmann G., Pohlentz G., Sandhoff K.** (1987). Oligosialogangliosides inhibit GM2- and GD3-synthesis in isolated Golgi vesicles from rat liver. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 368: 455-462.
- Yvon E., Del Vecchio M., Savoldo B., Hoyos V., Dutour A., Anichini A., Dotti G., Brenner MK.** (2009). Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells. *Clin Cancer Res*. 15:5852-5860.
- Zava S., Milani S., Sottocornola E., Berra B., Colombo I.** (2010). Two active and differently *N*-glycosylated isoforms of human ST3Gal-V are produced from the placental mRNA variant by a leaky scanning mechanism. *FEBS Lett*. 584:1476-1480.
- Zen K., Liu DQ., Guo YL., Wang C., Shan J., Fang M., Zhang CY., Liu Y.** (2008) CD44v4 is a major E-selectin ligand that mediates breast cancer cell transendothelial migration. *PLoS One*. 3:e1826.
- Zeng G., Gao L., Yu RK.** (1998). Isolation and functional analysis of the promoter of the rat CMP-NeuAc:GM3  $\alpha$ 2,8 sialyltransferase gene 1. *Biochim Biophys Acta*. 1397:126-130.
- Zeng G., Li DD., Gao L., Birklé S., Bieberich E., Tokuda A., Yu RK.** (1999). Alteration of ganglioside composition by stable transfection with antisense vectors against GD3-synthase gene expression. *Biochemistry*. 38:8762-8769.
- Zeng G., Gao L., Birkle S., Yu R.K.** (2000). Suppression of ganglioside G<sub>D3</sub> expression in a rat F-11 tumor cell line reduces tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor production. *Cancer Res*. 60:6670-6676.
- Zeng G., Gao L., Xia T., Tencomnao T., Yu RK.** (2003). Characterization of the 5'-flanking fragment of the human GM3-synthase gene. *Biochim Biophys Acta*. 1625:30-45.
- Zhang S., Cordon-Cardo C., Zhang HS., Reuter VE., Adluri S., Hamilton WB., Lloyd KO., Livingston PO.** (1997a). Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: I. Focus on gangliosides. *Int J Cancer*. 73:42-49.
- Zhang S., Zhang HS., Cordon-Cardo C., Reuter VE., Singhal AK., Lloyd KO., Livingston PO.** (1997b). Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: II. Blood group-related antigens. *Int J Cancer*. 73:50-56.

## Références

**Zhang YW., Su Y., Volpert OV., Vande Woude GF.** (2003). Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:12718-12723.

**Zheng M., Fang H., Tsuruoka T., Tsuji T., Sasaki T., Hakomori S.** (1993). Regulatory role of GM3 ganglioside in alpha 5 beta 1 integrin receptor for fibronectin-mediated adhesion of FUA169 cells. *J Biol Chem.* 268:2217-2222.

**Zhou Q., Hakomori S., Kitamura K., Igarashi Y.** (1994). GM3 directly inhibits tyrosine phosphorylation and de-*N*-acetyl-GM3 directly enhances serine phosphorylation of epidermal growth factor receptor, independently of receptor-receptor interaction. *J Biol Chem.* 269:1959-1965.

**Zöller M.** (2009). Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer.* 9:40-55.