THESE DE DOCTORAT

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE – LILLE 1 ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille

par

Marie BOBOWSKI

Régulation transcriptionnelle et rôle de la G_{D3} synthétase, enzyme clef de la biosynthèse des gangliosides, dans le cancer du sein

Soutenue le 14 décembre 2012 devant la commission d'examen :

Président :	Dr. Jean-Claude MICHALSKI	Université Lille 1
Rapporteurs :	Pr. Pascale COHEN	Université Claude Bernard, Lyon 1
	Pr. Abderrahman MAFTAH	Université de Limoges
Examinateurs :	Pr. Xuefen LE BOURHIS	Université Lille 1
	Dr. Joy BURCHELL	Guy's Hospital, London
Directeur de thèse :	Pr. Philippe DELANNOY	Université Lille 1

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier chaleureusement le Professeur **Philippe Delannoy** de m'avoir encadré et de m'avoir fait confiance pour mener ce projet de thèse. Durant nos 4 années de collaboration, j'ai apprécié nos discussions scientifiques et vos conseils avisés. J'ai conscience de la chance que j'ai eu de bénéficier d'autant de libertés dans le travail, de voir mes rapports corrigés avec tant de réactivité, de participer à plusieurs congrès internationaux et de voyager ainsi à travers le monde. Ces expériences m'ont apporté une réelle ouverture d'esprit et un éveil à la fois scientifique et humain. Tout simplement, merci d'avoir largement contribué à mon épanouissement professionnel.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury :

- les professeurs **Pascale COHEN** et **Abderrahman MAFTAH** pour l'honneur qu'ils me font d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

- Dr. Jean-Claude Michalski d'avoir accepté d'être président de mon jury. J'ai apprécié votre gentillesse et votre convivialité durant mes années au C9.

- Pr. **Xuefen Le Bourhis**, je suis très heureuse que vous ayez accepté d'être examinatrice de ma thèse. Merci pour votre disponibilité et vos nombreux conseils notamment grâce à votre regard d'expert en biologie cellulaire.

- Dr **Joy Burchell**, it is a great pleasure and an honour for me that you take part in my jury. Thank you for reviewing this work even if a part of this manuscript is in French.

J'adresse mes sincères remerciements à tous les membres et ex-membres de l'équipe 017 :

- Aurélie, tu m'as initiée à la recherche et au monde des gangliosides. Je peux dire que ton enthousiasme et ton dynamisme au quotidien m'ont largement motivée à continuer dans ce domaine. J'ai l'impression que tu es comme un « poisson dans l'eau » en Australie, j'espère pouvoir t'y rejoindre prochainement. Je ne me fais aucun souci pour ton avenir dans la recherche !

-la « LFB team », **Edwige** et **Béatrice**, mes formatrices de cœur. Merci d'avoir été si présentes durant mon année de M2 et de m'avoir formée en biologie cellulaire et biologie moléculaire (j'ai gardé les bonnes habitudes, je vous rassure !).

- **Agata**, ma « polonaise préférée ». Merci pour ta gentillesse, ton soutien, tes succulentes recettes et tout ce que nous avons pu partager au labo et en dehors. Tu as fait tant

de progrès en français depuis ton arrivée au laboratoire. A l'avenir, j'espère quand même que tu garderas ton accent qu'on adore !

- **Florent**, merci pour ton aide au quotidien sur l'interprétation de mes résultats et les instants de détente partagés. J'admire ton importante culture scientifique, mais surtout ta capacité, pour un Lyonnais, à boire du Picon bière ! Je n'oublierais pas nos soirées mémorables. Tout simplement, merci à Agata et toi d'être mes amis.

- **Sylvain**, ton arrivée au laboratoire a été une véritable aubaine pour moi grâce à ton expertise sur le cancer du sein. Un grand merci pour l'aide et les conseils que tu m'as apportés. J'ai également apprécié ta créativité sans limite et je suis sûre que ton incroyable jeu «labotomisé » a encore un grand avenir devant lui !

- Marie-Ange, j'aimerais te remercier vivement pour tes conseils d'experte en biologie moléculaire et pour ta gentillesse. Je te souhaite un réel épanouissement dans ton nouveau sujet.

- **Sophie**, merci pour ton aide technique et ta bonne humeur au quotidien. Je te souhaite plein de bonnes choses pour ta carrière mais surtout de continuer à être une excellente pédagogue !

- Anne, j'ai pu apprécier nos discussions scientifiques et les conseils que tu m'as prodigués tout au long de ma thèse. Je te souhaite d'évoluer dans ta carrière aussi bien que tu l'as bien fait ces derniers temps

Une pensée également à mon prédécesseur Dr. Sylvain Lehoux et à Cindy, notre nouvelle recrue.

Je n'oublie pas les petits stagiaires que j'ai pu encadrer durant ma thèse. Merci à **Nabil** et **Sandy** d'avoir participé à ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à l'équipe du Dr. **David Tulasne** pour sa collaboration et son expertise sur le récepteur c-Met. Un merci tout particulier à **Jonathan Lefebvre** grâce à qui j'ai pu réaliser les expériences de microscopie confocale.

Je souhaite remercier vivement le Professeur **Koichi Furukawa** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Ce séjour au Japon fut pour moi une expérience unique où j'ai beaucoup appris à la fois au niveau scientifique et culturel. Merci à Ohmi San de m'avoir enseigné la purification des radeaux lipidiques. Une pensée également à Lanyi et Esthelle avec qui j'ai pu partager des instants de « culture japonaise ».

A tous les étudiants du C9 : Karine, reine de la Zumba et de l'orthographe, un grand merci pour tes corrections. Stéphanie, merci pour ton soutien en tant que collègue de thèse. Je te souhaite un super post-doc aux Etats Unis. J'ai hâte de partager avec vous deux un dernier verre entre voisines au Colbert. Ludivine, je n'oublie pas nos nombreux kilomètres de course partagés, merci pour ta gentillesse et nos instants de détente partagés. Je te souhaite plein de bonheur dans ta nouvelle vie à Paris. Je salue également Adeline, Estelle, Audrey, Yoann, Yobana, Pierre, Jorick, Héla, Hande, Fanny et j'en oublie certainement avec qui j'ai pu échanger au cours de ma thèse que ce soit au laboratoire ou en dehors.

D'une manière générale, je remercie tous les membres du C9 que j'ai pu côtoyer qui, par sourire ou un échange, ont contribué au bon déroulement de ma thèse. Je crois que l'ambiance unique du C9 va me manquer !

Je terminerais par remercier ma famille et en particulier mes parents, ma grande sœur et mes grands parents pour leur soutien sans faille.

Enfin, j'adresse tout mon amour à Alexis qui contribue à mon équilibre et ainsi, à sa manière, à la bonne réalisation de ce travail. Merci pour ton aide précieuse sur la mise en page ces derniers jours mais surtout pour ta capacité à me faire si bien relativiser dans les moments de doute.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au sein de :

- De l'Unité de « Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle » (Unité Mixte de Recherche n° 8576 du CNRS, Université Lille Nord de France, d'irigée par le Docteur Jean-Claude Michalski), sous la direction du Professeur Philippe Delannoy

- Du laboratoire « Department of Molecular Biochemistry », Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japon, sous l'encadrement du Professeur Furukawa.

L'ensemble de ces travaux a été financé par l'Université Lille Nord de France, la fondation Canon, l'Association de la Recherche contre le Cancer (ARC) et la Ligue Régionale contre le cancer. Les travaux accomplis au cours de cette thèse ou de mon Master Recherche ont fait l'objet des publications et communications suivantes.

PUBLICATIONS

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

Cazet, A., Julien, S., **Bobowski, M**., Burchell, J., and Delannoy, P. (2010). Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. Breast Cancer Res. *12*, 204.

Cazet, A., Lefebvre, J., Adriaenssens, E., Julien, S., **Bobowski, M**., Grigoriadis, A., Tutt, A., Tulasne, D., Le Bourhis, X., and 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. *8*, 1526–1535.

Teylaert, B., Meurice, E., **Bobowski, M**., Harduin-Lepers, A., Gaucher, C., Fontayne, A., Jorieux, S., and Delannoy, P. (2011). Molecular cloning, characterization, genomic organization and promoter analysis of the α1,6-fucosyltransferase gene (fut8) expressed in the rat hybridoma cell line YB2/0. BMC Biotechnol. *11*, 1.

Cazet, A., **Bobowski, M**., Rombouts, Y., Lefebvre, J., Steenackers, A., Popa, I., Guérardel, Y., Le Bourhis, X., Tulasne, D., and Delannoy, P. (2012). The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase. Glycobiology *22*, 806–816.

Steenackers, A., Vanbeselaere, J., Cazet, A., **Bobowski, M**., Rombouts, Y., Colomb, F., Bourhis, X.L., Guérardel, Y., and Delannoy, P. (2012). Accumulation of Unusual Gangliosides G_{Q3} and G_{P3} in Breast Cancer Cells Expressing the G_{D3} Synthase. Molecules *17*, 9559–9572.

Bobowski, M., Steenackers, A., Colomb, F., Julien, S., Delannoy, P. (2012). Estradiol represses the expression of the G_{D3} synthase gene *ST8SIA1* in breast cancer. Plos One, in reviewing

COMMUNICATIONS ORALES

Department of Biochemistry II meeting, 13 octobre 2011, Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan. G_{D3} synthase in breast cancer

Journée "Doctorants Cancer", 11 juin 2012, Institut de Biologie de Lille, France. Régulation de l'expression de la G_{D3} synthétase dans le cancer du sein

Doctoriales,17-22 juin 2012, Mont Saint-Aubert, Belgique. Les gangliosides dans le cancer du sein.

Sialoglyco, 9-12 septembre 2012, Academia Sinica, Taipei, Taiwan. Regulation of G_{D3} synthase expression in breast cancer

COMMUNICATIONS PAR AFFICHE

Bobowski M, Cazet A, Julien S, Colomb C, Krzewinski-Recchi MA, Groux-Degroote S, Harduin-Lepers A, Delannoy P. Transcriptionnal regulation of the G_{D3} synthase (*ST8SIA1*) gene in breast cancer, *Sialoglyco 2010*, 21-26 aout 2010, Potsdam, Allemagne

Bobowski M, Cazet A, Julien S, Colomb C, Krzewinski-Recchi MA, Groux-Degroote S, Harduin-Lepers A, Delannoy P Transcriptionnal regulation of the G_{D3} synthase (*ST8SIA1*) gene in breast cancer. *21nd Joint Glycobiology Meeting*, 7-9 novembre 2010, Ghent, Belgique.

Bobowski M, Steenackers A, Cazet A, Julien S, Delannoy P. Régulation de l'expression de la G_{D3} synthétase dans le cancer du sein. *4^{èmes} journées du Cancéropôles Nord-Ouest*, 5-6 mai 2011, Deauville, France.

Bobowski M, Steenackers A, Cazet A, Julien S, Delannoy P. Régulation de l'expression de la G_{D3} synthétase dans le cancer du sein. *5^{ème} colloque Glycosciences et Santé*, 6 juin 2011, Nantes France

Bobowski M, Cazet A, Lefebvre J, Rombouts Y, Steenackers A, Adrienssens A, Guérardel Y, Tulasne D, Le Bourhis X, Delannoy P. The G_{D2} ganglioside induces a proliferative phenotype in MDA-MB-231 breast cancer cells via the constitutive activation of the receptor tyrosine-kinase c-Met. *10th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium*, 31 mars- 3 avril 2012, Den Haag, Pays-Bas.

Bobowski M, Steenackers A, Julien S, Delannoy P. Estradiol represses the expression of the GD3 synthase gene *ST8SIA1* in breast cancer. *Sialoglyco 2012*, 9-12 septembre 2012, Academia Sinica, Taipei, Taiwan

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	5
I- Les gangliosides	9
A- Les glycosphingolipides	9
 B- Les gangliosides 1) Nomenclature 2) Structure 3) Distribution subcellulaire 4) Biosynthèse 5) Catabolisme 	11 11 12 14 16
II- Mécanismes de régulation de l'expression des gangliosides membranaires	ş 19
 A- Evénements de régulation à la membrane 1) Evénements métaboliques 2) Evénements non métaboliques : Internalisation et externalisation des ganglios membranaires 	19 19 sides 20
 B- Régulation des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des gangliosides Régulation transcriptionnelle Régulation post-traductionnelle Régulation post-traductionnelle N-Glycosylation Régulation dépendante de l'organisation supramoléculaire des glycosyltransfé 24 Autres facteurs de régulation des glycosyltransférases 	21 24 24 24 erases (GTs) 25
III- Rôles des gangliosides en conditions physiologiques	26
 A- A l'échelle de l'organisme 1) Rôle des gangliosides au cours de l'embryogenèse et dans le système nerveu 2) Importance des gangliosides dans les cellules souches 	26 ux central 26 28
 B- A l'échelle cellulaire et moléculaire 1) La reconnaissance cellulaire dépendante des gangliosides a- Rôles dans les interactions avec des pathogènes b- Rôles dans les interactions myéline-axone c- Rôles dans les interactions avec la matrice extracellulaire 2) Rôles des gangliosides dans la modulation de l'activité de molécules de signa a- Les intégrines b- Les récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (RTKs) c- Le récepteur de l'insuline 	28 28 29 30 lisation 31 31 32 34

IV- Dérégulation de l'expression des gangliosides dans les pathologies	36
A- Rôles des gangliosides dans la maladie d'Alzheimer	36
B- Rôles des gangliosides complexes des séries b- et c- dans la progression des tumeurs d'origine neuroectodermique	36
V- La G_{D3} synthétase, une enzyme « clef » de la biosynthèse des gangliosides	
complexes des séries B et C	39
A- Activité catalytique	39
B- Expression tissulaire et fonction	39
C- Organisation génomique de ST8SIA1	40
D- Mécanisme de régulation transcriptionnelle	41
1) Dans les cellules de mélanome	42
2) Dans les cellules de dichlastome	/3
2) Dans les cellules de glioblastome	40
3) Dans les cellules de neuroblastome	43
VI- Le cancer du sein	45
A- Classification des tumeurs mammaires	45
1) Classification histologique	45
a- Les différents types de cancer du sein	45
b- Les grades du cancer du sein	46
c- Les stades du cancer du sein	47
2) Classification moléculaire	47
	47
a- Description	47
b- Implication thérapeutique	49
B- Mécanismes de la tumorigenèse mammaire	50
1) Formation de la tumeur primaire : lien entre croissance, survie et instabilité génomique	51
 a- Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs 	51
b- Activation d'oncogène	53
c- Altérations épigénétiques	54
2) Invasion et métastases	54
a- Le processus métastatique (Figure 22)	55
h_ Les altérations génétiques contribuant au processus métastatique	57
b- Les alterations génériques contribuant au processus metastatique	57
c- Les traitements pour le cancer du sein metastatique	20
3) Les cellules souches de cancer du sein	59
C- Les antigènes glucidiques associés aux tumeurs de sein	59
1) Les O-glycannes de type mucine	61
2) Les antigènes Lewis	62
3) Les analiosides	62
oj Leo gangilosideo	02
VII- La G _{D3} synthétase dans le cancer du sein	65
A- Profil d'expression	65

B- Rôle de la G_{D3} synthétase dans la carcinogenèse mammaire, le modèle MDA-MB-231 GD3S+	66
VIII-Problématiques et objectifs de la thèse	67
A- Quels gangliosides sont impliqués dans l'auto-activation de c-Met et le phénotype prolifératif dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+?	67
B- Quels sont les mécanismes moléculaires qui conduisent à la surexpression de la G _D synthétase dans les cellules cancéreuses mammaires?	⁰³ 67
Article 1:	69
The ganglioside G_{D2} induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G_{D3} synthase	t 69
Article 2:	83
Estradiol represses the expression of the G_{D3} synthase gene ST8SIA1 in breast cancer	83
I- Rôle de la G _{D3} synthétase dans le développement du cancer du sein	03
A- Le G _{D2} : activateur spécifique du récepteur c-Met dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ 1) Rappel des résultats obtenus 10 2) Le récepteur à activité tyrosine kinase c-Met 10 3) Co-localisation de c-Met et du G _{D2} 10 4) Mécanismes d'activation de c-Met par le G _{D2} 10	03 03 04 05 06
B- GD3S et tumeurs primaires 10	07
C- GD3S et métastases 10	80
II- Régulation transcriptionnelle du gène <i>ST8SIA1</i> dans le cancer du sein 1	11
 A- Caractérisation de la région 5'UTR et du promoteur de ST8SIA1 dans les cellules de cancer du sein 1) Niveau expression du gène ST8SIA1 dans les lignées de cancer du sein et les tumeurs mammaires 1) Les transcrits de ST8SIA1 dans les lignées de cancer du sein et les tumeurs mammaires 	, 11 11 s
3)Activité promotrice de ST8SIA1 dans les cellules de cancer du sein1	13
 B- Effet de l'œstradiol sur l'expression transcriptionnelle de ST8SIA1 1) La répression de ST8SIA1 par l'œstradiol, quelles conséquences chez les patientes ? 1 2) Mécanisme général de la signalisation par les œstrogènes 3) Mécanisme de la répression transcriptionnelle par E2 4) La répression de ST8SIA1 par l'œstradiol est indépendante des sites ERE identifiés sur promoteur 	14 14 15 Ie 16

REFERENCES	121
ANNEXES	139

Revue : Role of complex gangliosides in cancer progression

LISTE DES ABREVIATIONS

- 5'-RACE: 5' Rapid Amplification of cDNA ends
- 5'UTR: 5' Untranslated Region
- **ADN**: Acide Desoxyribonucléique
- AGAT: Antigènes Glucidiques Associés aux tumeurs
- ALDH: Aldéhyde déhydrogénase
- AMPc: Adénosine MonoPhosphate cyclique
- APP: Amyloid Precursor Protein
- ARN: Acide Ribonucléique
- **A**β: Protéine amyloïde β
- BCSC: Cellule souches de cancer du sein
- β3Gal T4: GA1/GM1a/GD1b/GT1c synthétase
- β 4GaINAc T1: G_{A2}/G_{M2}/G_{D2}/G_{T2} synthétase
- BRCA1: Breast Cancer Suceptibility 1
- BRCA2: Breast Cancer Suceptibility 2
- Cer: Céramide
- CHIP: Chromatin Immunoprecipitation
- c-Met: Tyrosine kinase receptor for hepatocyte growth factor
- CMP-Neu5Ac : Cytidine monophosphate-N-acétylneuraminique
- Cox-2: Cyclooygénase-2
- DCIS: Ductal Carcinoma In Situ
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- E2: Œstradiol
- EGF: Epidermal Growth Factor
- EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
- EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay
- EMT: Epithelial mesenchymal transition
- ER: Estrogen Receptor
- ERE: Estrogen Response Element
- ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase
- **ERα**: Estrogen Receptor alpha
- FAK: Focal Adhesion Kinase
- FGF: Fibroblast Growth Factor
- FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer
- Gal: Galactose
- GalCer: Galactosylcéramide
- GaINAc: N-acétylgalactosamine

- GAB: Protéine AB liée aux gangliosides
- GD3S: GD3 synthétase
- GD3S+: GD3 synthétase positif
- GEM: Glycosphingolipids Enriched Microdomain
- GIc: Glucose
- GlcCer: Glucosylcéramide
- GIcNAc: N-acétylglucosamine
- GM2-AP: GM2-activator protein
- GNE: UDP-N-acétylglucosamine-2-épimérase/N-acétylmannosamine6-kinase
- **GPI**: Glycophosphatidylinositol
- **GSLs**: Glycosphingolipides
- GTFs: Facteurs de transcription généraux
- **GTs**: Glycosyltransférases
- HGF/SF: Hepatocyte Growth Factor/scatter factor
- HIV-1: Human Immunodeficiency Virus type 1
- HPRT: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase
- HSO₃-3GalCer: Galactosylcéramide 3 sulfate
- HSO₃-3LacCer: Lactosylcéramide 3 sulfate
- IDC: Invasive Ductal breast Carcinoma
- **JNK**: c-Jun NH2-terminal kinase
- Kb: Kilobases
- KO: Knock-Out
- LacCer: Lactosylcéramide
- **Le^x**: Lewis^X
- MAG: Myelin-Associated Glycoprotein
- MEK: Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase/ERK kinase
- MET: Mesenchymal-to-epithelial-transition
- Neu3 : Neuraminidase 3
- Neu5,9Ac2: Acide N-acétyl-9-O-acétylneuraminique
- Neu5Ac: Acide N-acétylneuraminique
- Neu5Gc: Acide N-glycolylneuraminique
- NOD/SCID: Non-obsese diabetic / Severe Combined Immunodeficiency
- PARP1: Poly-(ADP-ribose)-polymérase
- **PBS**: Phosphate Buffered Saline
- PDGFR: Platelet-Derived Growth Factor Receptor
- PDMP: D,L-thréo-1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholino-1-propanol
- PFGF: Fibroblast Growth Factor
- PGE2: prostaglandine E2
- PI3K: Phosphatidyl-Inositol 3-OH Kinase

PIP3: Phosphatidyllnositol (3,4,5)-triphosphates

PKA : Protéine kinase A

PKC: Protéine kinase C

PPMP: D,L-thréo-1-phényl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol

PR: Progesterone Receptor

PTEN: Phosphatase and TENsin homolog

Q-PCR: Quantitative PCR

RANKL: Receptor Activator of NF-KB ligand

RB : Retinoblastoma protein

RI: Récepteur à l'insuline

RPLP0: Ribosomal Protein Large P0

RTKs: Récepteurs à activité tyrosine-kinase

SAPs: Sphingolipid activator proteins

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

Siglecs: Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins

sLe^a: Sialyl-lewis^a

sLe^x: Sialyl-lewis^x

ST3Gal V: G_{M3} synthase

ST8Sia I: G_{D3} synthase

ST8Sia V: G_{T3} synthase

sTn: Sialyl-Thomsen-nouvelle

T: Thomsen-Friedenreich

TAM: Tamoxifène

TFF1: Trefoil Factor 1

TGF- β : Transforming Growth Factor β

Tn: Thomsen-nouvelle

 $TNF\alpha$: Tumor Necrosis Factor

TNM: Tumor Node Metastasis

TSS: Transcription start site

UDP-GIc: Uridine diphosphate - glucose

UGCG: UDP-Glc: céramide glucosyl-transférase

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor 2

WT1: Wilms tumor protein 1

INTRODUCTION

I- LES GANGLIOSIDES

A- Les glycosphingolipides

Les glycosphingolipides (GSLs) sont un type de glycolipide retrouvé dans la membrane plasmique des eucaryotes et de quelques bactéries. Chez les vertébrés, les GSLs représentent de 5% à 20% des lipides membranaires totaux en fonction du type cellulaire. Ils sont particulièrement présents dans le cerveau des vertébrés, où ils représentent plus de 80% des glycoconjugués totaux. Les GSLs sont composés d'une partie hydrophobe, le céramide, ancrée à la membrane plasmique et d'une partie oligosaccharidique hydrophile, exposée à la surface cellulaire (Degroote et al., 2004; Varki et al., 2009).

La partie céramide consiste en une base sphingoïde liée par une liaison amide à un acide gras (**Figure 1**). Parmi les 3 types chimiques de base sphingoïde (sphingosine, sphinganine et phytosphingosine), la sphingosine est la plus fréquemment retrouvée dans les céramides des mammifères. Le type d'acide gras varie également en fonction de la longueur de la chaîne et du degré d'insaturation, même si l'acide palmitique (C16:0) et l'acide stéarique (C18:0) sont les acides gras les plus communément retrouvés. Ainsi, les structures des céramides varient en longueur, hydroxylation ou saturation à la fois au niveau de la sphingosine et de l'acide gras, entraînant une importante diversité structurale. La signification biologique de ces variations reste encore mal connue. Il semblerait toutefois que la partie lipidique puisse influencer la localisation et les fonctions des GSLs au sein de la membrane plasmique.



Figure 1 : Structure d'un céramide couramment retrouvé chez les mammifères. Cet exemple de céramide consiste en une sphingosine à 18 carbone (d18:1) liée par une liaison amide à un acide palmitique (C16:0). Tiré de Varki et al., 2009.

Bien que les céramides participent à la diversité structurale des GSLs, les classifications structurales et fonctionnelles majeures des GSLs sont basées sur la partie glycannique. Les GSLs peuvent être divisés en deux classes principales, en fonction du premier monosaccharide lié au céramide : le galactose (Gal) ou le glucose (Glc) formant le galactosylcéramide (GalCer) ou le glucosylcéramide (GlcCer), respectivement. A noter que ces GSLs monohexosiques sont des cérébrosides (i.e. céramide lié par une liaison éther à un ose neutre). Le GalCer et son analogue sulfaté sont les GSLs majeurs dans le cerveau où ils ont des rôles essentiels à la structure et la fonction de la myéline. Le GalCer sialylé (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-O-Cer, G_{M4}) est également retrouvé au niveau de la myéline. Ces galactolipides sont rarement rallongés par d'autres monosaccharides. La plupart des autres membres de la famille des GSLs chez les vertébrés sont construits sur le GlcCer.

Au contraire du GalCer, le GlcCer est présent dans la plupart des cellules eucaryotes et chez quelques bactéries, et sert de précurseur au GSLs complexes. Il est typiquement substitué par un résidu de galactose lié en anomérie β sur l'hydroxyle en C4 du glucose pour donner le lacto-sylcéramide (Gal β 1-4Glc β 1-*O*-Cer, LacCer). Des extensions de ce glycanne génèrent des structures « core » qui servent de base à la nomenclature des glycosphingolipides (**Tableau 1**). Ainsi, les GSLs de la série ganglio- sont basées sur la structure <u>Gal β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-*O*-Cer, la série néolacto- sur la structure <u>Gal β 1-4Glc β 1-*O*-Cer, la série lacto-sur le <u>Gal β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-*O*-Cer, la série isoglobo- sur le <u>Gal α 1-3</u>Gal β 1-4Glc β 1-*O*-Cer, et la série isoglobo- sur le <u>Gal α 1-3</u>Gal β 1-4Glc β 1-*O*-Cer (les différences clef au sein des structures « core » sont surlignées). Ces sous-familles de glycosphingolipides sont exprimées de façon tissu-spécifique. Par exemple, chez les mammifères, les GSLs de la série ganglio- prédominent dans le cerveau alors que les GSLs de la série néolacto- sont proéminents dans les organes sécréteurs et ceux de la série globo- sont les plus abondants dans les érythrocytes.</u></u></u>

Séries	Structure	Abréviation
Conglia	<u>GalNAcβ1-4</u> Galβ1-4Glcβ1-O-Cer	Gg₃Cer
Gangno	<u>Galβ1-3GalNAcβ1-4</u> Galβ1-4Glcβ1-O-Cer	Gg₄Cer
Néclasta	<u>Galβ1-4GlcNAcβ1-3</u> Galβ1-4Glcβ1-O-Cer	nLc₄Cer
Neolacio	Galβ1-4GlcNAcβ1- <u>3Galβ1-4GlcNAcβ1-3</u> Galβ1-4Glcβ1-O-Cer	nLc ₆ Cer
Lasta	<u>GlcNAcβ1-3</u> Galβ1-4Glcβ1-O-Cer	Lc ₃ Cer
Lacto	<u>Galβ1-3GlcNAcβ1-3</u> Galβ1-4Glcβ1-O-Cer	Lc₄Cer
Olaha	<u>Galα1-4</u> Galβ1-4Glcβ1-O-Cer	Gb ₃ Cer
GIODO	GalNAcβ1-3 <u>Galα1-4</u> Galβ1-4Glcβ1-O-Cer	Gb₄Cer
le e el e le e	<u>Galα1-3</u> Galβ1-4Glcβ1-O-Cer	lso-Gb₃Cer
ISOGIODO	GalNAcβ1-3 <u>Galα1-3</u> Galβ1-4Glcβ1-O-Cer	Iso-Gb ₄ Cer

<u>**Tableau 1</u>** : **Structures « core » majeures des principaux glycosphingolipides des vertébrés.** Le lactosylcéramide, structure commune à chaque série, est représenté en bleu. Les signatures structurales clef définissant chaque famille sont surlignées. Adapté de Varki et al., 2009.</u>

De façon plus simple, les GSLs peuvent également être classés selon 3 grandes catégories :

- Les GSLs neutres qui ne contiennent pas de résidus chargés mais uniquement des monosaccharides neutres tels que le glucosylcéramide (GlcCer), le galactosylcéramide (Gal-Cer), le lactosylcéramide (LacCer) ou encore les GSLs des séries globo- et isoglobo-.
- Les sulfatides comprenant notamment le galactosylcéramide-3-sulfate (HSO₃-3GalCer) et le lactosylcéramide-3-sulfate (HSO₃-3LacCer)
- Les GSLs sialylés ou gangliosides contenant un ou plusieurs résidus d'acide sialique. Le nom de gangliosides provient de la découverte en 1942 de nouveaux lipides isolés de cellules ganglionnaires du cerveau. Les gangliosides appartiennent à la série ganglio-, mais peuvent également être retrouvés au niveau des GSLs des séries lacto- et globo-. Par souci de clarté, dans la suite de ce manuscrit, le terme « ganglioside » définit les GSLs de la série ganglio-.

B- Les gangliosides

1) Nomenclature

Dans la nomenclature officielle, le monosaccharide de la structure « core » qui porte le substituant est indiqué par un chiffre romain (sachant que le sucre le plus proche du céramide correspond à « I ») alors que l'hydroxyl du monosaccharide qui est modifié est indiqué par un exposant. Par exemple, cet abondant ganglioside Gal β 1-3GalNAc β 1-4(Neu5Aca2-3)Gal β 1-4Glc β 1-O-Cer devient II³NeuAc-Gg₄Cer. Cela signifie que le galactose le plus proche du céramide (II) porte un acide sialique en position C3 (II³) et Gg₄ désigne le « core » tétrasaccharidique de la série ganglio-. Cette nomenclature est aujourd'hui nettement trop complexe et est généralement remplacée par celle de Svennerholm (Svennerholm, 1964), pour laquelle la structure ci-dessus est simplement désignée G_{M1a}. Dans cette nomenclature, G correspond à « ganglioside », la deuxième lettre correspond au nombre de résidu d'acide sialique (mono, di, tri, etc.) et le chiffre (1, 2, 3, etc.) correspond à l'ordre de migration du ganglioside en chromatographie sur couche mince (e.g., G_{M3} > G_{M2} > G_{M1}).

2) Structure

Les gangliosides sont des GSLs dont le céramide est substitué par un core glycannique porteur d'un ou plusieurs résidus d'acide sialique (**Figure 3**). Les acides sialiques sont une large famille de monosaccharides à 9 carbones retrouvés chez les vertébrés et certains microorganismes. Chez l'homme, l'acide sialique le plus courant des gangliosides est l'acide 5-N-acétylneuraminique (Neu5Ac) même si l'acide 5-N-glycolylneuraminique (Neu5Gc) peut également être détecté en condition pathologique. Des dérivés O-acétylés peuvent également être retrouvés (Kohla et Schauer, 2005, **Figure 2**).



Figure 2 : Structure des acides sialiques retrouvés dans les gangliosides : l'acide neuraminique (Neu5Ac), l'acide N-glycolylneuraminique (Neu5Gc) et l'acide N-acétyl-9-O-acétylneuraminique (Neu5,9Ac₂). Le Neu5Ac est l'acide sialique le plus courant chez l'homme alors que le Neu5Gc apparaît uniquement lors de pathologies. Tiré de Schauer, 2009.



Figure 3: Représentation schématique de gangliosides complexes disialylés : le G_{D3} , le G_{D2} et le G_{D1b} . La chaîne glycannique des gangliosides, qui constitue la partie hydrophile, est reliée par une liais son O-glycosidique à la fonction alcool primaire de la sphingosine du céramide. Le motif lactosylcéramide est l'élément précurseur pour la synthèse des chaînes sialylées des gangliosides.

3) Distribution subcellulaire

Les GSLs sont principalement localisés au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique. Leurs propriétés biophysiques leur confèrent une tendance à se regrouper et à former des clusters. Par ailleurs, le cholestérol, un lipide plat et rigide, interagit préférentiellement avec les sphingolipides *via* des interactions de Van-der-Waals. Ces propriétés sont à l'origine de l'enrichissement des GSLs au sein de micro-domaines de la membrane plasmique, les radeaux lipidiques (Degroote et al., 2004; Gupta et Surolia, 2010).

Ces micro-domaines lipidiques, enrichis en cholestérol et en sphingolipides, sont plus ordonnés et plus compacts que la bicouche environnante. Ils se caractérisent par leur faible densité (flottabilité dans la membrane) et par leur insolubilité dans les détergents doux tels que le triton X-100. Il s'agit de zones privilégiées pour l'activité de molécules de signalisation qui y sont intégrées. Les radeaux lipidiques sont également enrichis en protéines telles que la cavéoline, la flottiline, les kinases de la famille Src, les protéines à ancre GPI (glycophosphatidylinositol) ou encore certains récepteurs aux facteurs de croissance (**Figure 4**).

L'équipe d'Hakomori a introduit le concept de « membranes glycosynaptiques », distinctes des radeaux lipidiques au niveau fonctionnel. Les «glycosynapses » présentent une membrane dont la composition est similaire à celle des radeaux lipidiques bien que hautement enrichie en tétraspanines ou en protéines protéo-lipidiques. A la différence des radeaux lipidiques, ces domaines sont impliqués dans l'adhésion, la croissance et la motilité cellulaire par un mécanisme dépendant de la glycosylation (Hakomori, 2002; Hakomori, 2004). En particulier, les gangliosides, concentrés dans les glycosynapses, sont capables de moduler l'adhésion à la matrice extracellulaire et la signalisation cellulaire par interaction avec des protéines telles que les intégrines ou les tétraspanines (Degroote et al., 2004; Todeschini et al., 2008a). Par ailleurs, en modifiant l'organisation des glycosynapses, les glycannes portés par les gangliosides peuvent affecter le phénotype cellulaire et influencer la malignité des cellules tumorales (Todeschini et al., 2008a). Les fonctions des gangliosides au sein de ces micro-domaines en conditions physiologiques et pathologiques seront développées dans le chapitre III.



Figure 4 : Représentation schématique d'un radeau lipidique de la membrane plasmique. Les cylindres marron représentent les molécules de cholestérol qui permettent la formation de clusters de gly-cosphingolipides (GSL, en rose) au sein des micro-domaines lipidiques. Ces clusters servent d'échafaudages pour l'assemblage des molécules de signalisation telles que les protéines à ancre glyco-phosphatidylinositol (en gris), les protéines cytosoliques (cyt) en vert et les protéines transmembranaires (TM) en jaune. Tiré de Gupta et Surolia, 2010.

Dans le cadre du processus métabolique, les gangliosides sont également 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 et dégradés. De façon surprenante, le ganglioside G_{D3} a été détecté au niveau des mitochondries, par un mécanisme d'adressage encore inconnu. L'accumulation de G_{D3} contribue à la perméabilité de la membrane mitochondriale et au relargage dans le cytosol de facteurs pro-apoptotiques, conduisant à la mort programmée de la cellule (Malisan et Testi, 2002).

4) Biosynthèse

La biosynthèse des GSLs a lieu de façon séquentielle (**Figure 5**) : un premier monosaccharide est d'abord ajouté sur le céramide puis d'autres monosaccharides sont ensuite transférés par l'action de glycosyltransférases à partir de donneurs spécifiques de type glycosyl-nucléotides (UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-GlcNAc, UDP-GalNAc et CMP-Neu5Ac).

Le céramide est synthétisé au niveau de la face cytosolique du réticulum endoplasmique puis est transféré vers le cis-Golgi. Le céramide peut ensuite être transformé en GalCer ou en GlcCer. Il est intéressant de noter que la synthèse du GalCer et de son dérivé sulfatide, a lieu uniquement dans des cellules spécialisées qui élaborent la myéline alors que les gangliosides (dont le précurseur est le GlcCer) sont synthétisés dans toutes les cellules, avec une expression variable des différentes formes en fonction du type cellulaire (Varki et al., 2009).

Ainsi, la biosynthèse des gangliosides débute par le transfert d'un résidu de glucose sur le céramide par l'action de l'UDP-Glc : céramide glucosyl-transférase (UGCG ou GlcCer synthétase) pour former le glucosylcéramide (GlcCer). La GlcCer synthétase est hautement spécifique du céramide et peut être spécifiquement inhibé par le D,L-thréo-1-phényl-2-palmitoylamino-3morpholino-1-propanol (PPMP) ou le D,L-thréo-1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholino-1propanol (PDMP), bloquant la synthèse des GSLs (Abe et al., 1992). Le GlcCer tourne alors, par l'action d'une flippase encore indéterminée, vers la face luminale de l'appareil de Golgi où les futures étapes de glycosylation vont avoir lieu. La première étape est catalysée par la lactosylcéramide synthétase qui ajoute un résidu de galactose en β 1-4 sur le glucose pour former le lactosylcéramide (LacCer ou Gal
^β1-4Glc^β1-Cer), motif précurseur de la synthèse des gangliosides (Figure 5). Le LacCer est converti en G_{M3}, le G_{M3} en G_{D3} et le G_{D3} en G_{T3} par l'action de 3 sialyltransférases (ST3Gal V, ST8Sia I et ST8Sia V, correspondant respectivement à la G_{M3} synthétase, la G_{D3} synthétase et la G_{T3} synthétase). Les structures sialylées G_{M3}, G_{D3}, et G_{T3} sont les points de départ des séries a-, b- et c- des gangliosides, respectivement. Une autre série de GSLs (la série O-) peut également émerger à partir du LacCer, conduisant à la formation d'asialo-gangliosides (asialo-G_{M2} et asialo-G_{M1}). De chaque série découle l'action coordonnée et successive de différentes glycosyltransférases (la N-acétylgalactosaminyltransférase β4GalNAc T1 ou G_{M2}/G_{D2} synthétase, la galactosyltransférase β 3Gal T4 et les sialyltransférases ST3Gal II ou III et ST8Sia V), introduisant dans la séquence un résidu de N-acétylgalactosamine, de galactose et d'acides sialiques, respectivement (Degroote et al., 2004; Tettamanti, 2004; Varki et al., 2009, Figure 5).



Figure 5 : Les voies de biosynthèse des gangliosides. Les gangliosides sont synthétisés par l'addition séquentielle de monosaccharides sur le céramide (Cer). L'action successive des sialyltransférases ST3Gal V (G_{M3} synthétase), ST8Sia I (G_{D3} synthétase) et ST8SIA V (G_{T3} synthétase) catalyse la synthèse des précurseurs G_{M3} , G_{D3} et G_{T3} des séries a-, b- et c-, respectivement. La série O- est directement synthétisée à partir du lactosylcéramide (G_{A3}). L'élongation de chaque série s'effectue par l'action séquentielle de la N-acétyl-galactosaminyltransférase (β 4GalNAc T1), la galactosyltransférase (β 3Gal T4) et des sialyltransférases (ST3Gal II ou III et ST8Sia V). Les gangliosides a dérivent de l'action de ST6GalNAc III, V ou VI sur le G_{M1b} , le G_{D1a} ou le G_{T1b} . Les gangliosides sont nommés selon la nomenclature de Svennerholm (Svennerholm, 1964). Tiré de Bobowski et al., 2011.

Nom du gène	Nom commun	Substrats
Glucosyltransférase		
UGCG	GlcCer synthétase	Cer
Galactosyltransférases		
β4GALT6	LacCer synthétase	GlcCer
β3GALT4	G _{M1a} /G _{D1b} /G _{T1c} synthétase	$G_{A2},G_{M2},G_{D2},G_{T2}$
N-acétyl-galactosaminyltransféra	se	
β4GALNACT1	G_{M2}, G_{D2}, G_{T2} synthétase	$G_{A3},G_{M3},G_{D3},G_{T3}$
Sialyltransférases		
ST3GAL2	ST3Gal II	G _{A1} , G _{M1a} , G _{D1b} , G _{T1c}
ST3GAL3	ST3Gal III	$G_{A1,}G_{M1a},G_{D1b},G_{T1c}$
ST3GAL5	ST3Gal V, G _{M3} synthétase	LacCer
ST6GALNAC5	ST6GalNAc V	G _{M1b} , G _{D1a} , G _{T1b} , G _{Q1c}
ST8SIA1	ST8Sia I, G _{D3} synthétase	G _{M3}
ST8SIA5	ST8Sia V, G_{T3} synthétase	G _{D3} , G _{M1b} , G _{D1a} , G _{T1b} , G _{Q1c}

Les sialyltransférases impliquées dans la biosynthèse des gangliosides présentent des spécificités de substrat différentes (**Tableau 2**). ST3Gal II, III et ST3Gal V catalysent la formation d'une liaison en α 2,3 sur un résidu de galactose alors que ST8Sia I et ST8Sia V participent à la synthèse de structures di- ou tri- sialylées en formant des liaisons α 2,8 sur un autre résidu d'acide sialique (Tettamanti, 2004). Les α 2,6-sialyltransférases ST6GalNAc III, V et VI (Okajima et al., 2000) peuvent également transférer un résidu d'acide sialique sur la N-acétylgalactosamine du G_{M1b}, du G_{D1a} et du G_{T1b} pour former respectivement le G_{D1a}, le G_{T1aa} et le G_{Q1ba} Les gangliosides de la série α représente un groupe mineur et peu décrit même si plusieurs études suggèrent leur rôle potentiel dans le système nerveux et les métastases cérébrales (Irie et al., 1994; Yang et al., 1996; Nakamura et al., 2000, Bos et al., 2009)

Enfin, on peut définir deux grandes classes de GSLs : les gangliosides simples des séries O- 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 grand nombre de résidu Neu5Ac.

5) Catabolisme

Afin d'être dégradés, les gangliosides exprimés au niveau de la membrane plasmique, sont internalisés par un mécanisme d'endocytose, acheminés jusqu'aux vésicules d'endosomes qui vont alors fusionner avec les lysosomes (**Figure 6**). Au sein de la membrane vésiculaire, les gangliosides exposés au niveau de la lumière lysosomale sont disponibles à l'action de glycosylhydrolases solubles (**Tableau 3**). Toutes les étapes enzymatiques nécessitent un pH acide à l'intérieur de cet organite (Tettamanti, 2004). Le catabolisme des gangliosides consiste en la suppression séquentielle des résidus de monosaccharides. Dans un premier temps, les gangliosides polysialylés sont transformés, par l'action de la sialidase Neu1 (neuraminidase 1), en monosialo-gangliosides G_{M1a} et G_{M2} , ou en LacCer (à partir du G_{M3}). Le G_{M1} et le G_{M2} sont résistants à l'action de Neu1. Leur catabolisme nécessite l'action d'une galactosidase et d'une β -N-acétylhexosaminidase permettant la transformation du G_{M1a} et du G_{M2} en G_{M3} . Le G_{M3} peut alors être désialylé par Neu1 pour former le LacCer, qui est ensuite dégradé par l'action séquentielle d'une β -galactosidase et d'une β -glucosidase pour former le céramide.

In vivo, la dégradation intra-lysosomale des gangliosides nécessite l'action de protéines activatrices comprenant la « GM2-activator protein » (GM2-AP) et d'autres « sphingolipid activator proteins » (SAPs ou saposines), qui permettent de faciliter l'accès des glycannes aux enzymes protéolytiques (Wilkening et al., 2000).

Un défaut dans ce processus de dégradation engendre l'accumulation de gangliosides dans les lysosomes et l'apparition de pathologies neurodégénératives rares (**Tableau 3**). Par exemple, un défaut dans les gènes *HEXA* ou *HEXB*, codant pour la β -hexosaminidase ou dans le gène *GM2A* codant le cofacteur GM2-AP, conduit à l'accumulation excessive de G_{M2} dans les lysosomes et se traduit par une dégénérescence du système nerveux central. Cette pathologie, la gangliosidose G_{M2}, comprend 3 maladies: la maladie de Tay-Sachs, la maladie de Sandhoff et la déficience GM2A, selon si la mutation touche le gène *HEXA*, *HEXB* ou *GM2A*, respectivement (Sandhoff, 2001).

Nom du gène	Nom commun	Substrats	Pathologies as- sociées
Sialidase			
NEU1	Neuraminidase 1	$G_{M1b}, G_{D1a}, etc.$	Sialidose
Hexosaminidases			
HEXA HEXB	β-hexosaminidase (sous-unité α) β-hexosaminidase (sous-unité β)	$\begin{array}{l} G_{A2},G_{M2},etc.\\ G_{A2},G_{M2},etc. \end{array}$	Tays-Sachs Sandhoff
Galactosidases			
GLB1 GALC	β-galactosidase 1 GalCer-β-galactosidase	G _{A1} , G _{M1a} , etc. LacCer	Gangliosidose
Glucosidases			
GBA	GlcCer- β-glucosidase	GlcCer	Gaucher
Céramidase			
ASAH1	Céramidase acide	Cer	Farber



<u>Figure 6 :</u> Différentes voies métaboliques déterminent la composition en gangliosides à la surface cellulaire. Les flèches vertes correspondent à la voie de biosynthèse de gangliosides. Les flèches rouges représentent la voie de dégradation des gangliosides. Les événements métaboliques à la surface cellulaire sont illustrés par des flèches violettes. Les flèches orange correspondent aux différentes alternatives à la voie de dégradation (Recyclage, glycosylation directe ou voie de sauvetage).

II- MECANISMES DE REGULATION DE L'EXPRESSION DES GANGLIOSIDES MEMBRANAIRES

Les gangliosides jouent de nombreux rôles dans les processus physiologiques dont la différenciation, la prolifération, l'adhésion ou encore la migration cellulaire. Leur expression varie fortement au cours du développement embryonnaire et en fonction du type tissulaire. Par ailleurs, une dérégulation de l'expression des gangliosides est observée dans de nombreuses pathologies (voir chapitre III-). Ainsi, tout changement de la composition en GSLs influence le comportement cellulaire. C'est pourquoi, dans cette partie, nous nous attacherons à détailler les mécanismes responsables de la régulation de ces glycolipides. L'équilibre entre biosynthèse et catabolisme des gangliosides est principalement contrôlé par la disponibilité des substrats donneur et accepteur, par la dégradation enzymatique ainsi que par la présence et l'activité des glycosyltransférases qui participent à leur biosynthèse (Daniotti et Iglesias-Bartolomé, 2011). Il a également été démontré que la régulation de l'expression des gangliosides peut s'effectuer au sein même de la membrane plasmique (**Figure 6**).

A- Evénements de régulation à la membrane

1) Evénements métaboliques

Plusieurs études ont montré que des enzymes membranaires sont capables de glycosyler/déglycosyler les GSLs directement au niveau de la membrane plasmique (Tettamanti, 2004; Prinetti et al., 2009; Gupta et Surolia, 2010). En particulier, la sialidase membranaire Neu3, enrichie dans les radeaux lipidiques, est capable de convertir, au niveau de la membrane plasmique, les GSLs polysialylés en mono-sialogangliosides G_{M1} et G_{M2} ; et le G_{M3} en LacCer, modulant la différenciation neuronale et l'apoptose (Miyagi et al., 2008; Sonnino et al., 2010). Neu3 agit essentiellement par des interactions en « trans », en hydrolysant les substrats à la surface de cellules adjacentes (Papini et al., 2004). D'autres glycosylhydrolases associées à la membrane ont été décrites. Notamment, l'association à Neu3 de β -galactosidase et β -glucosidase membranaires (dérivant probablement des lysosomes), participent à la production de céramide à partir du G_{M3} à la surface cellulaire de fibroblastes humains (Valaperta et al., 2006). Dans ce modèle, les auteurs ont montré que l'augmentation de l'expression de Neu3 conduit à la mort cellulaire, due à l'augmentation du céramide. La présence de β -hexosaminidases associées à la membrane a également été observée même si son activité *in vivo* reste à démontrer (Sonnino et al., 2010)

Des données sont également disponibles sur la sialylation des gangliosides à l'extérieur du compartiment golgien par l'action de sialyltransférases associées à la membrane plasmique. En particulier, il a été montré que l'expression ectopique de la sialyltransférase ST8Sia I permet la conversion du G_{M3} en G_{D3} à la fois par une interaction en « cis » mais également en « trans », en

Introduction

agissant sur le G_{M3} de cellules voisines, à partir de donneur de substrat CMP-Neu5Ac exogène ou endogène (Vilcaes et al., 2011).

Les mécanismes de glycosylation/déglycosylation à la membrane semblent être particulièrement importants pour un changement rapide et transitoire de la composition en gangliosides et ces événements métaboliques locaux pourraient représenter un mécanisme général du contrôle de la composition en GSLs (Prinetti et al., 2009).

Une autre possibilité permettant de modifier les gangliosides de la membrane consiste en la lactonisation des acides sialiques des gangliosides. En particulier, il a été montré que le G_{D1b} peut être converti en G_{D1b}-lactone, en présence de protons. Cette modification chimique affecte fortement les propriétés biologiques du G_{D1b.} l'empêchant de moduler l'activité des protéines kinases (Sonnino et al., 2010). In vivo, la lactonisation du G_{D1b} a lieu dans les neurones par un mécanisme qui suggère la présence d'une enzyme spécifique associée à la membrane plasmique (Bassi et al., 1994).

2) Evénements non métaboliques : Internalisation et externalisation des gangliosides membranaires

L'internalisation des gangliosides a lieu par endocytose, indépendamment des vésicules de clathrines, principalement via les cavéoles où la cavéoline joue un rôle important dans l'endocytose (Daniotti et Iglesias-Bartolomé, 2011). Une fois que les gangliosides ont atteint le compartiment endosomal, ils peuvent suivre plusieurs voies (Figure 6) :

- Recyclage direct à la membrane 0
- o Transport dans l'appareil de Golgi, où ils subissent une reglycosylation pour former des gangliosides plus complexes.
- o Suivi de la voie lysosomale, où sont formés des produits de dégradation finaux (monosaccharides, bases, acide gras) ou intermédiaires (LacCer, GlcCer, Cer). Ces produits de dégradation peuvent alors quitter les lysosomes pour entrer dans le cytosol, où ils peuvent être soit recyclés soit totalement dégradés.

Des études réalisées sur des cellules en culture ont également montré que les gangliosides peuvent être libérés vers le milieu extracellulaire sous forme de monomères ou de vésicules de « shedding ». Ces vésicules semblent être issues de zones membranaires riches en cavéoline et en GSLs. Même si la contribution de cet événement dans la détermination de la composition en lipides reste mal compris, l'externalisation des gangliosides pourrait réguler la composition lipidique de la cellule ou d'une cellule voisine qui les réintégrerait (Sonnino et al., 2010)

Pour résumer, la biosynthèse de novo, les événements métaboliques à la membrane, les différentes voies de l'endocytose ainsi que le « shedding » déterminent le turnover des gangliosides. Cependant, l'impact respectif de ces différents événements est difficile à évaluer. Tout changement de l'état fonctionnel de la cellule, du taux de renouvellement membranaire, de la présence de ligand ou des conditions qui stimulent l'endocytose ont une forte influence sur ce turnover.

En parallèle, ces événements très orchestrés dépendent fortement de la disponibilité des enzymes impliquées dans le métabolisme des gangliosides.

B- Régulation des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des gangliosides

Il est bien établi que les activités des glycosyltransférases sont essentielles pour la détermination de la composition générale en gangliosides. Les glycosyltransférases résidentes du Golgi sont des protéines transmembranaires de type II, comprenant une région cytosolique N-terminale, un seul domaine transmembranaire hydrophobe et un long domaine catalytique C-terminal, séquestré dans la lumière de l'appareil de Golgi (**Figure 7**). La régulation des glycosyltransférases s'effectue au niveau transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel ainsi que par leur localisation golgienne (Daniotti et Iglesias-Bartolomé, 2011). Il est important de noter que du fait de leur mécanisme de biosynthèse (**Figure 5**), le niveau d'expression d'un ganglioside particulier dépend à la fois de sa synthétase mais aussi des glycosyltransférases agissant en amont et en aval dans sa voie de biosynthèse.



<u>Figure 7</u> : Schéma de l'organisation protéique générale d'une glycosyltransférase golgienne de type II. A une courte région cytoplasmique N-terminale succède une unique région transmembranaire dans la membrane de l'appareil de Golgi. La région tige d'une taille variable précède, dans la lumière golgienne, la région catalytique C-terminale.

1) Régulation transcriptionnelle

Une approche pluridisciplinaire, combinant Q-PCR, analyses en micro-array, tests enzymatiques, Northern Blot et hybridation *in situ* a révélé une corrélation entre le niveau des ARNm des enzymes impliquées dans glycosylation et l'activité enzymatique, suggérant que les structures glycanniques dépendent principalement de la régulation transcriptionnelle (Nairn et al., 2008)

Ainsi, le niveau d'expression et la diversité des gangliosides peuvent être en partie expliqués par le niveau d'expression des glycosyltransférases, impliquant une régulation au niveau de la transcription des gènes codant les GTs (Ruan et al., 1999). Hormis *UGCG* (GlcCer synthétase) et β 3GalT4 (G_{M1}/G_{D1b} synthétase) pour lesquels la régulation transcriptionnelle reste à élucider chez l'Homme, le clonage des gènes humains codant les gly-cosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des gangliosides ainsi que l'isolement de leur promoteur ont permis une meilleure compréhension de leur régulation.

Pour cela, les auteurs ont d'abord analysé la région 5' non traduite (5'-UTR) du gène, notamment par la technique de 5'-RACE, dévoilant les sites d'initiation de la transcription ainsi que la présence d'une ou plusieurs isoformes de transcrits (**Tableau** 4). Ensuite, le clonage des régions génomiques en 5' dans un vecteur rapporteur suivi de tests fonctionnels ont mis en évidence les séquences promotrices nécessaires à la transcription de ces gènes. Les promoteurs de ces glycosyltransférases ont pour caractéristiques communes de ne pas contenir de boîtes TATA ni CCATT mais plusieurs sites de liaison pour le facteur SP1, à proximité du site d'initiation de la transcription. Bien que l'absence de TATA box soit caractéristique des « gènes de ménage », des modes de régulation hautement tissu-spécifique ont été décrits pour ce type de promoteur (Yu et al., 2004).

L'analyse bioinformatique des séquences promotrices de ces gènes a permis de révéler des sites consensus putatifs pour la fixation de facteurs de transcription (**Tableau 4**). La régulation des glycosyltransférases par ces facteurs de transcription a parfois été confirmée par des expériences de mutagenèse dirigée, de retard sur gel ou d'immunoprécipitation de la chromatine. C'est le cas notamment du facteur CREB (cAMP response element-binding) qui a été décrit comme un régulateur positif de l'expression du gène *ST3GAL5* au cours de la différenciation des cellules K562 en mégacaryocytes (Choi et al., 2004).

Très peu de données sont disponibles sur la régulation épigénétique des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des gangliosides. De façon intéressante, une étude a montré que la méthylation n'affecte pas l'expression des gènes β 4galnactt1 (G_{M2}/G_{D2} synthétase) et *st8sia1* (G_{D3} synthétase) au cours du développement embryonnaire de la souris (Suzuki et al., 2011). Par contre, ces auteurs ont montré que l'acétylation des histones au niveau de ces gènes modifie le niveau d'expression des ARNm des glycosyltransférases.

Le **<u>Tableau</u>** 4 présente les caractéristiques des promoteurs des principaux gènes impliqués dans la biosynthèse des gangliosides. La régulation transcriptionnelle de la G_{D3} synthétase sera détaillée dans le chapitre V.

Gène	Taille gé- nomique	Nombre d'exons	Lignée cellulaire étudiée	Nombre de transcrits	Promoteur proximal ^a	Particularité du promoteur	Facteurs de transcription
β4GALNACT1	8 kb	,	Mélanome ; SKMEL-3 ¹	ę	< 700 pb	3 promoteurs alternatifsRégions enhancer et silencer	HNF-5, SP1, AP-2
ST8SIA1	47 kb	ъ	Mélanome; SKMEL28, SKMEL2 ^{2,3} Neuroblastome ;SK-N-BE(2)C ⁴ Glioblastome ; U-87MG, T98G ⁵	~	<700 pb	Séquence répétée GT-CG (silencer) Sous-régulé par le triptolide	<u>NFkB, ELK1,</u> <u>AREB6</u> , SP1
ST3GAL5	44 Kb	Q	Cerveau fœtal et adulte ⁶ Leucémie ; K562, HL-607 ⁸ Rétine; ARPE-19 ⁹ Neuroblastome ; SK-N-BE(2)C ¹⁰	ю Л	<300 pb	Splicing alternatif en 5' Inductible par l'acide valproïque	CREB
β3GALT4	2 kb			Inconn	-		
NGCG	32 kb	J		Inconn	r	Transcription augmentée par SP1 ¹¹	
β4GALT6	40 kb	ى ك	Oligodendrogliome HOG ^{12, 13}	-	<350 pb	GC-box	<u>SP1</u> , <u>pCREB1</u> , ETS
^a La localisation d ¹ Furukawa et al., al. 2011 : ¹⁰ Kwon	es promoteurs p 1996 ; ² Furukaw et al., 2008 : ¹¹ 1	iroximaux est r /a et al., 2003 ; Jchida et al., 2/	eprésentée par rapport au codon d'initi 3 ³ Kang et al., 2007 ; ⁴ Kwon et al., 2009 004 : ¹² Tencomnao et al., 2001 ; ¹³ Tenc	iation de la tradu 9, ⁵ Dae et al., 20 comnao et al., 2	lction 09 ; ⁶ Kim et al., ∩∩4	2001; ⁷ Choi et al., 2004; ⁸ Choi et al., 2003	; ⁹ Song et

Tableau 4 : Organisation génomique, nombre de transcrits et promoteurs des gènes humains codant les glycosyltransférases impliquées dans la

2) Régulation post-traductionnelle

a- Phosphorylation

Plusieurs études ont démontré l'influence du processus dynamique de phosphorylation/déphosphorylation sur la régulation de certaines GTs. En effet, l'activation de protéines kinases PKC et PKA dans les cellules de neuroblastome induit une activité accrue de la G_{M2}/G_{D2} synthétase alors que les activités des sialyltransférases ST3Gal V et ST3Gal I/II (G_{M3} et G_{D1a}/G_{T1b} synthétases) seraient diminuées (Gu et al., 1995; Bieberich et al., 1998; Yu and 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 d'enzymes solubles purifiées de cerveau de rat. En effet, l'incubation d'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) avec des microsomes engendre un doublement de l'activité de la G_{M2}/G_{D2} synthétase (Scheideler et Dawson, 1986) alors que la phosphorylation de résidus sérine et thréonine des G_{M3} et G_{D1a}/G_{T1b} synthétases entraînent une diminution de l'activité de ces enzymes (Gu et al., 1995). La pertinence de cette régulation reste cependant à démontrer *in vivo*.

b- N-Glycosylation

Les GTs impliquées dans la biosynthèse des gangliosides sont des protéines membranaires de type II contenant 3 ou 4 sites de N-glycosylation (Yu et al., 2004). Des travaux ont permis de mettre en avant l'importance de cette modification covalente sur la demi-vie, l'activité et la localisation intracellulaire de ces enzymes. Il a ainsi 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). Par ailleurs, 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) alors que la localisation et l'activité de la G_{M1}/G_{D1b} synthétase est affectée suite à l'inhibition du processus de N-glycosylation (Martina et al., 2000). Enfin, il a récemment été montré une activité variable de deux isoformes de ST3Gal V, portant des N-glycannes différents (Zava et al., 2010).

3) Régulation dépendante de l'organisation supramoléculaire des glycosyltransférases (GTs)

Les précurseurs LacCer, G_{M3} et G_{D3} semblent être formés dans le Golgi proximal et distal, alors que les gangliosides plus complexes (G_{A2} , G_{M2} , G_{D2} , G_{M1} , G_{D1b}) se limiteraient au niveau du réseau trans-golgien en raison de l'organisation et de la localisation des GTs impliquées dans leur biosynthèse. Plusieurs études ont montré que ces GTs forment des complexes multienzymatiques qui peuvent modifier l'activité ou la localisation sub-cellulaire des enzymes appartenant à ce complexe (Maccioni et al., 2011). L'équipe de Maccioni a pu montrer par des expériences de co-immunoprécipitation dans les cellules CHO-K1, que la β 4GalNAcT1 (G_{M2}/G_{D2} synthétase) et
Introduction

la β3GalT4 (G_{M1a}/G_{D1b} synthétase) s'associaient physiquement, conduisant à la synthèse directe de G_{M1} à partir de G_{M3} (Giraudo et al., 2001). Le domaine N-terminal de ces transférases participe à cette interaction comme le montre des expériences de FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). De la même manière, ces auteurs ont montré l'existence d'un complexe Lac-Cer synthétase / ST3Gal V / ST8Sia I, qui agit successivement sur le GlcCer pour former le G_{D3} (Giraudo et Maccioni, 2003). Cette organisation multienzymatique pourrait être variable selon le type cellulaire puisque d'autres auteurs ont montré une interaction entre ST8Sia I et la G_{M2}/G_{D2} synthétase mais pas avec ST3Gal V dans la lignée de neuroblastome F-11A (Bieberich et al., 2002). Dans ce modèle, la co-expression de ST8Sia I et de la G_{M2}/G_{D2} synthétase induit l'activation réciproque de ces enzymes.

Il est en effet établi que ces complexes régulent positivement l'activité des glycosyltransférases. Par exemple, il a été montré que l'activité de la LacCer synthétase, de ST8Sia I, et de ST3Gal V est augmentée dans les cellules CHO-K1 transfectées par *ST8SIA1* (codant la G_{D3} synthétase), par rapport aux cellules wild-type qui n'expriment pas la G_{D3} synthétase (Uliana et al., 2006; Spessott et al., 2012). De façon intéressante, il a également été montré que le complexe LacCer synthétase / ST3Gal V / ST8Sia I était localisé dans une partie plus distale de l'appareil de Golgi que le complexe LacCer synthétase / ST3Gal V (Uliana et al., 2006). Ainsi, la localisation subcellulaire des GTs serait modulée en fonction du niveau d'expression relatif de chaque enzyme.

En modifiant la localisation et l'activité des GTs, ces complexes multienzymatiques participent donc à la régulation du profil d'expression des gangliosides à la surface cellulaire.

4) Autres facteurs de régulation des glycosyltransférases

Un rétrocontrôle négatif de la biosynthèse des gangliosides par les produits finaux de la réaction a pu être mis en évidence *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 acides sialiques, tels que le G_{D1a} . De même, l'activité de la G_{D3} synthétase est inhibée par le G_{Q1b} , le G_{T1b} et le G_{D1a} (Yusuf et al., 1987).

Il a également été suggéré que les gangliosides pourraient réguler leur propre biosynthèse en se liant aux GTs pour les assister dans leur maturation, leur conformation et leur transport (Yu et al., 2004). En particulier, le G_{M3} est capable de se lier étroitement à la G_{D3} synthétase et l'incubation de cellules F-11 avec du G_{M3} à haute concentration conduit à une relocalisation partielle de la G_{D3} synthétase dans le RE (Bieberich et al., 2002).

Enfin, il a été montré que la surexpression d'une enzyme intervenant dans le métabolisme de l'acide N-acétylneuraminique, l'UDP-N-acétylglucosamine-2-épimérase/N-acétylmannosamine6-kinase ou GNE, entraîne une augmentation de la transcription des gènes *ST3GAL5* et *ST8SIA1* et de la synthèse des gangliosides correspondants G_{M3} et G_{D3} (Wang et al., 2006).

III- ROLES DES GANGLIOSIDES EN CONDITIONS PHYSIOLO-GIQUES

A- A l'échelle de l'organisme

1) Rôle des gangliosides au cours de l'embryogenèse et dans le système nerveux central

Les gangliosides sont majoritairement exprimés dans le système nerveux central et durant l'embryogenèse. De part leur capacité à réguler la prolifération, l'adhésion, la différenciation ou encore la migration cellulaire, ils jouent un rôle clef dans le développement embryonnaire et les processus neuronaux.

L'invalidation chez la souris du gène *UGCG* codant la glucosylcéramide synthétase, conduit à l'inhibition de la principale voie de biosynthèse des GSLs (Yamashita et al., 1999). Les embryons de souris *UGCG-/-*, déficients en gangliosides, s'implantent correctement dans l'utérus et apparaissent normaux aux premiers stages du développement embryonnaire ; la gastrulation ayant lieu avec une nette différenciation en mésoderme, ectoderme et endoderme. Cependant, leur capacité à former des tissus bien différenciés est altérée. Par ailleurs, ces embryons meurent au 7^{éme} jour après fécondation, démontrant que les gangliosides sont vitaux pour le développement embryonnaire et la différenciation de certains tissus.



Développement

Figure 8 : Changement de la composition en gangliosides dans le cerveau lors du développement Plusieurs études ont montré un changement drastique du niveau d'expression et de la diversité des gangliosides durant le développement embryonnaire (Ngamukote et al., 2007; Kwak et al., 2011; Yu et al., 2012) mais également des glycosyltransférases qui participent à leur biosynthèse (Ishii et al., 2007). Les premiers stades du développement sont généralement caractérisés par l'abondance des gangliosides G_{M3} et G_{D3} alors que les gangliosides plus complexes tels que le G_{M1} , le G_{D1a} , le G_{D1b} et le G_{T1b} sont majoritaires dans les stades tardifs (**Figure 8**). Concomitamment, une forte expression de la G_{M3} synthétase et la G_{D3} synthétase a été détectée dans les premiers stades de l'embryogenèse alors que l'expression G_{M2}/G_{D2} synthétase augmente graduellement dans les stades tardifs (Bouvier et Seyfried, 1989; Yamamoto et al., 1996).

Gène(s) inter- rompu(s)	Gangliosides exprimés	Phénotype	Références
ST3GAL5	0-séries	Viable o Perte complète de l'ouïe o Comportement hyperactif	Yoshikawa et al., 2009; Niimi et al., 2011
ST8SIA1	G _{M1} , G _{D1a} , G _{M3}	Viable o empêche la régénération ner- veuse	Okada et al., 2002; Ohmi et al., 2012
β4GALNACT1	G_{M3}, G_{D3}	Viable o Diminution de la myélinisation o Dégénération axonale	Takamiya et al., 1996; Chiavegatto et al., 2000
ST3GAL5/ β4GALNACT1	Déficience en gangliosides	Viable (mort rapide après sevrage) o Dégénération axonale et per- turbation des interactions cel- lules gliales/axones	Yamashita et al., 2005
ST8IA1/ β4GALNACT1	G _{M3}	 Viable (espérance de vie courte) Neurodégénération suite au disfonctionnement du complément et de l'inflammation Désorganisation des radeaux lipidiques Problèmes moteurs, de mémoire et d'apprentissage 	Tajima et al., 2009; Ohmi et al., 2011, 2012

Tableau 5 : Phénotype des souris KO pour les gangliosides synthétases

2) Importance des gangliosides dans les cellules souches

Les cellules souches sont définies comme des cellules indifférenciées, ayant une haute capacité de prolifération et de renouvellement. Ce sont des réservoirs cellulaires pour la formation des tissus et des organes durant le développement et pour le turnover des cellules chez l'adulte. La mise en évidence de marqueurs spécifiques des cellules souches a fait l'objet de nombreuses études pour leur utilisation en thérapie cellulaire. Certains gangliosides ont été décrits comme de très bons marqueurs de cellules souches (Yanagisawa et al., 2011). En particulier, le G_{D3} est fortement exprimé dans les cellules souches embryonnaires post-natales et neurales chez l'adulte (Nakatani et al., 2010) alors que le G_{D2} a été détecté uniquement dans les cellules souches neurales. De manière intéressante, les gangliosides des séries a-, dont les gangliosides majeurs du cerveau G_{M1} et G_{D1a} ne sont pas exprimés dans les cellules souches neurales mais réapparaissent après la différenciation, alors que l'expression du G_{D3} est diminuée lors de la différenciation. Il a ainsi été suggéré que l'expression des gangliosides dans les cellules souches neurales au cours de la différenciation reflète le changement de la composition en gangliosides observé durant le développement cérébral (Yanagisawa et al., 2011)

Même si le rôle des gangliosides dans les cellules souches reste à explorer, quelques études ont rapporté des informations fonctionnelles. En particulier, l'inhibition de la synthèse des GSLs dans des cellules souches neurales de souris, à l'aide de l'inhibiteur PPMP ou d'ARN interférence sur la GlcCer synthétase, inhibe l'activation de la voie Ras/MAPK et de la prolifération cellulaire (Yanagisawa et al., 2005; Jung et al., 2009). De même la suppression de G_{D2} dans des cellules souches mésenchymateuses humaines inhibe la différenciation neuronale (Jin et al., 2010).

Enfin, les gangliosides des séries c-, révélés par l'anticorps A2B5 (Tchoghandjian et al., 2010), et le G_{D2} (Battula et al., 2012) ont été récemment décrits comme des marqueurs fonctionnels des cellules souches de cancer du cerveau et du sein, respectivement, où ils jouent un rôle essentiel dans l'initiation tumorale (Regina Todeschini et Hakomori, 2008).

B- A l'échelle cellulaire et moléculaire

Les fonctions des gangliosides, décrites précédemment dans les différents tissus, sont dues à leur capacité d'interaction à la surface cellulaire à des protéines telles que les intégrines, les récepteurs aux facteurs de croissance et les protéines kinases cytoplasmiques pour former des domaines glycosynaptiques contrôlant l'adhésion, la motilité et la croissance cellulaire (Regina Todeschini et Hakomori, 2008)

1) La reconnaissance cellulaire dépendante des gangliosides

a- Rôles dans les interactions avec des pathogènes

De part leur présence à surface cellulaire, les gangliosides peuvent servir de points d'ancrage pour les virus, bactéries ou toxines. Il a par exemple été montré que le G_{M3} interagit avec le virus HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus type 1* ou virus du SIDA, Hammache et al., 1998). Une

étude récente a démontré l'importance de ce ganglioside dans l'attachement et l'incorporation du virus HIV au niveau des cellules dendritiques, qui constitue un des premiers événements contribuant à la dissémination virale (Puryear et al., 2012).

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 celleci dans la paroi intestinale (**Figure 9**). La reconnaissance par le G_{M1a} et l'intégration de la toxine cholérique dans les cellules engendrent une activation continue de la protéine kinase A (PKA) et des canaux ioniques, conduisant à la sécrétion de sels et d'eau dans la lumière intestinale. D'autres toxines bactériennes peuvent se fixer aux gangliosides, telles que la toxine tétanique (sur le G_{D1b} et G_{T1b}) et la toxine botulique (sur le G_{T1b} , G_{Q1b} et G_{D1b}) (Eidels et al., 1983).



Figure 9 : Effet de la reconnaissance de la toxine cholérique par le ganglioside GM1 sur une cellule intestinale humaine. La sous-unité B de la toxine cholérique interagit spécifiquement avec le GM1 au niveau des villosités intestinales. Ceci induit un changement de conformation de la toxine et l'entrée de sa sous-unité A dans la cellule intestinale. Cette sous-unité va entraîner l'activation de la protéine Gsa, l'augmentation d'AMPc suivi de l'activation de la protéine kinase A (PKA), induisant une activation des canaux ioniques (Cazet, thèse 2010).

b- Rôles dans les interactions myéline-axone

Les Siglecs (*Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins*) constituent une famille de lectines ayant la particularité de se lier aux acides sialiques des chaînes oligosaccharidiques. La protéine MAG (*Myelin-Associated Glycoprotein*) ou Siglec 4 fait partie de cette famille. Cette lectine a la particularité de s'associer avec une forte affinité à la séquence glycannique terminale Neu5Aca2-3Gal β 1-3GalNAc, présente dans le G_{D1a} et le G_{T1b}. Ces gangliosides, majoritaires dans le cerveau humain, sont ainsi impliquées dans les interactions entre la myéline et les axones, par l'intermédiaire de la protéine MAG (**Figure 10**). Des souris KO pour le gène codant la G_{M2}/G_{D2} synthétase n'expriment plus les gangliosides majoritaires du cerveau mais accumulent du G_{M3} et du G_{D3}. Ces souris présentent une dégénérescence axonale, une démyélinisation des systèmes nerveux central et périphérique ainsi que des déficits moteurs. La suppression du gène *mag* montre un phénotype similaire suggérant un rôle essentiel de l'interaction MAG/G_{D1a}-G_{T1b} dans la stabilité des axones (Pan et al., 2005).



<u>Figure 10</u>: Représentation schématique de l'interaction entre la protéine MAG (Myelin Associated Glycoprotein) et les gangliosides GD1a et GT1b. Les interactions spécifiques entre le récepteur MAG, exprimé par la myéline, et les gangliosides GD1a et GT1b des axones sont essentielles pour maintenir l'intégrité du système nerveux central. Les voies de signalisation intracellulaire, qui découlent de cette interaction restent encore mal connue (Tirée de Schnaar, 2010)

c- Rôles dans les interactions avec la matrice extracellulaire

Plusieurs études ont montré le rôle des gangliosides dans l'interaction avec les protéines matricielles, telles que le collagène, la fibronectine ou la laminine (Nakano et al., 1999; Kazarian et al., 2003; Blum et al., 2005; Ichikawa et al., 2009a), par un mécanisme généralement dépendant des intégrines.

En particulier, l'inhibition de la synthèse des gangliosides à l'aide de PDMP réduit considérablement l'adhésion des cellules de neuroblastome LA-N1 au collagène. Ce phénomène est réversé par l'incubation de ces cellules avec le ganglioside G_{D2} (Kazarian et al., 2003). Blum et ses collaborateurs ont également montré l'association du ganglioside G_{M1} à la fibronectine dans les lymphocytes T (Blum et al., 2005). Par ailleurs, le cluster de G_{M1} dans les radeaux lipidiques entraîne une augmentation de l'adhésion des cellules T à la matrice extracellulaire, suite à un changement de l'état d'affinité des intégrines β 1 (Mitchell et al., 2009). Le G_{M1} a également été décrit comme le ganglioside présentant la plus grande affinité pour la laminine 1 (Ichikawa et al., 2009b) et cette interaction joue un rôle clef dans le recrutement d'un complexe de molécules de signalisation induisant la croissance neuronale (**Figure 11**).



Figure 11: Rôle de l'interaction entre la laminine et le ganglioside GM1 au sein des radeaux lipidiques. La laminine 1 se lie directement au GM1 et induit son agrégation, augmentant ainsi la concentration de TrkA dans les radeaux lipidiques et l'activation de molécules répondant au NGF (Nerve Growth Factor) telles que Lyn. Le « clustering » de GM1 et de laminine induit également un enrichissement en intégrine β -1. Ce microdomaine lipidique enrichi en GM1, TrkA, intégrine et molécules de signalisation constitue une plateforme fonctionnelle pour les voies de signalisation qui déclenchent la croissance des neurites (Adapté de Ichikawa et al., 2009b)

2) Rôles des gangliosides dans la modulation de l'activité de molécules de signalisation

a- Les intégrines

Les glycosynapses de type 3, définies par Hakomori, sont des microdomaines lipidiques fonctionnels, caractérisés par la présence de tétraspanines, telles que CD9, CD81 et CD82 (Regina Todeschini et Hakomori, 2008). Les tétraspanines sont des molécules membranaires hydrophobes, interagissant à la fois avec les GSLs et les intégrines. La formation d'un complexe G_{M3}/CD9/intégrine inhibe la motilité cellulaire, suite à l'inactivation de c-Src par la protéine Csk (**Figure 12**, Prinetti et al., 2009). La fonction biologique des glycosynapses dans la régulation de la motilité cellulaire dépendante des intégrines nécessite la présence de chaînes oligosaccharidiques spécifiques portées par le ganglioside. Par exemple, seule l'addition exogène de G_{M3} (pas de G_{M1}) est capable d'augmenter l'association tétraspanines/intégrines (Mitsuzuka et al., 2005).



Figure 12 : Importance du GM3 dans la signalisation par les intégrines. La formation d'un complexe GM3/intégrine/CD9 (tétraspanine) au sein des glycosynapses induit le recrutement de la protéine Csk. Csk phosphoryle et inhibe la protéine G c-Src, réduisant ainsi la motilité cellulaire.

b- Les récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (RTKs)

Les effets des gangliosides sur les RTKs ont été étudiés par diverses méthodes : ajout exogène de gangliosides dans le milieu, synthèse endogène par expression de glycosyltransférases ou encore utilisation d'inhibiteurs pharmocologiques de la biosynthèse des gangliosides. L'ensemble de ces études ont montré que les gangliosides sont capables d'activer ou d'inhiber la signalisation de certains récepteurs aux facteurs de croissance, bien que les résultats soient parfois controversés selon le type cellulaire et la méthode utilisée (**Figure 13**, Miljan et Bremer, 2002; Kaucic et al., 2006).



Figure 13 : Régulation de l'activité de récepteurs à activité tyrosine kinase par les gangliosides. De nombreuses études ont décrit l'effet activateur (en vert) ou inhibiteur (en rouge) des gangliosides sur les RTKs. Ces modulations gangliosides-spécifiques sont parfois controversées selon le type cellulaire la méthode utilisée.

On peut distinguer 3 mécanismes permettant aux gangliosides de moduler l'activité des RTKs :

- Un mécanisme dépendant de l'interaction du ligand avec un ganglioside. Par exemple, le G_{M1} est capable de se lier directement au FGF (Fibroblast Growth Factor) et agit comme un co-récepteur capable d'activer la signalisation du récepteur au FGF (Rusnati et al., 2002)
- Une régulation de la dimérisation du récepteur, comme c'est le cas du ganglioside G_{M3} et de l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Zhou et al., 1994), des gangliosides G_{M1}, G_{M2}, G_{D1a}, G_{D1b}, G_{D3} et G_{T1b} capables d'inhiber la dimérisation du PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor) (Van Brocklyn et al., 1993) ou encore de l'interaction G_{M1}/TrkA (Mutoh et al., 1995)
- Modulation de l'état d'activation du récepteur et de sa localisation subcellulaire. Par exemple, il a été montré que le G_{M1} induit la dispersion du PDGFR hors des radeaux lipidiques, conduisant à la suppression des signaux de croissance cellulaire (Mitsuda et al., 2002). Les cas du récepteur EGFR et du récepteur de l'insuline, qui suivent également ce mécanisme, sont détaillés ci-après.

Exemple de la modulation de l'activité du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor) par le *G*_{M3}

Le récepteur à l'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire comprenant un domaine tyrosine kinase intracellulaire. Il est exprimé dans les cellules épithéliales, où il participe à la prolifération et à la différenciation de la surface épithéliale. Plusieurs études ont montré que le ganglioside G_{M3} est capable de se lier spécifiquement au domaine extracellulaire de l'EGFR, inhibant sa dimérisation et son autophosphorylation, sans affecter la liaison à son ligand (**Figure 14**, Bremer et al., 1986; Miljan et al., 2002; Coskun et al., 2011). Par ailleurs, il a récemment été démontré que 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). Enfin, l'interaction G_{M3} /EGFR est facilitée par l'enrichissement de l'EGFR au sein des radeaux lipidiques non cavéolaires (Roepstorff et al., 2002). Dans une lignée cellulaire de kératinocytes, la surexpression du G_{M3} induit un shift de la cavéoline-1 au niveau des domaines non cavéolaires riches en EGFR, induisant l'inhibition de la dimérisation et la phosphorylation du récepteur (Wang et al., 2002). Le complexe G_{M3} /cavéoline-1/EGFR au sein des radeaux lipidiques est ainsi essentiel à la suppression de la signalisation de l'EGFR par le G_{M3} (Wang, Yan, et al., 2007).



Figure 14 : Mécanisme d'inhibition de la dimérisation du récepteur à l'EGF par le GM3. En présence d'une forte concentration en GM3, la dimérisation et l'autophosphorylation de l'EGFR est inhibée, sans influencer la fixation du ligand. La suppression de signalisation fait suite à l'interaction du GM3 avec les résidus GlcNAc terminaux des N-glycannes des récepteurs. Le GM3 délocalise la cavéoline-1 au sein des radeaux lipidiques non-cavéolaires, favorisant cette inhibition.

c- Le récepteur de l'insuline

Les récepteurs à l'insuline (RI) sont des RTKs, présents dans les membranes résistantes aux détergents des adipocytes dont la signalisation est dépendante des gangliosides. Des expériences de co-immunoprécipitation, de cross-linking et d'imagerie cellulaire ont en effet montré que le récepteur à l'insuline a la capacité de former des complexes distincts avec la cavéoline-1 et le ganglioside G_{M3} au sein des microdomaines lipidiques (Kabayama et al., 2007). L'interaction directe et spécifique RI/G_{M3} inhibe la signalisation de l'insuline. Il a en effet été montré que l'induction de la résistance à l'insuline par traitement d'adipocytes au TNF (Tumor Necrosis Factor) s'accompagne d'une augmentation de l'expression de la G_{M3} synthétase, et de G_{M3} dans les radeaux lipidiques (Tagami et al., 2002). L'association RI/G_{M3} est alors augmentée alors que l'association RI/cavéoline-1 est diminuée, provoquant un déplacement des récepteurs à l'insuline hors des régions cavéolaires des radeaux lipidiques. L'association RI/cavéoline-1 étant essentielle à la signalisation de l'insuline dans les cavéoles, la relocalisation du RI dans les régions mobiles des rafts, suite à sa liaison au G_{M3}, empêche la signalisation de l'insuline et le transport de glucose. Le PDMP réverse ce phénotype, confirmant le rôle clef des gangliosides dans la résistance à l'insuline (Sekimoto et al., 2012). Ce mécanisme, proposé par l'équipe d'Inokuchi, est représenté dans la Figure 15.



Figure 15 : Mécanisme de résistance à l'insuline dépendant du ganglioside G_{M3} dans les adipocytes. Les radeaux lipidiques comprennent une partie cavéolaire riche en cavéoline-1 et une partie noncavéolaire, nommée GEM pour Glycosphingolipids Enriched Microdomain. La liaison du récepteur à l'insuline (RI) et de la cavéoline-1 est nécessaire pour la signalisation de l'insuline induisant notamment la translocation de GLUT4 (Glucose Transporter 4) et l'influx de glucose. La résistance à l'insuline induite par le TNFa dans les adipocytes provoque le changement de localisation du RI en dehors des cavéoles, suite à l'augmentation de ganglioside G_{M3} endogène. Le complexe G_{M3}/RI est alors mobile dans les GEM et la signalisation de l'insuline est bloquée. Adapté de Kabayama et al., 2007

IV- DEREGULATION DE L'EXPRESSION DES GANGLIOSIDES DANS LES PATHOLOGIES

Une dérégulation de l'expression des gangliosides a été observée dans diverses pathologies humaines telles que l'athérosclérose (Wen et al., 1999), les maladies neurodégénératives (sclérose en plaque (Marconi et al., 2006), maladie de Creutzfeldt-Jacob (Ohtani et al., 1996), maladie d'Alzheimer (Yanagisawa, 2007) et dans certains cancers (Furukawa et al., 2006). Nous développerons succinctement les aspects concernant la maladie d'Alzheimer, puis nous nous focaliserons sur les gangliosides complexes des séries b- et c-, en tant que marqueurs oncofoetaux de certaines tumeurs d'origine neuro-ectodermique.

A- Rôles des gangliosides dans la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est principalement caractérisée par la présence de plaques séniles extracellulaires néfastes pour les neurones, dont le constituant majeur est la protéine amyloïde β (A β). A β résulte du clivage anormal de la protéine APP (Amyloid Precursor Protein). Il a été montré que la concentration et la composition en gangliosides sont altérées dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Kracun et al., 1991; Molander-Melin et al., 2005) et de nombreuses études ont mis en évidence leur implication dans la liaison à la protéine A β et son agrégation (Yanagisawa, 2007). En particulier, la concentration en G_{M1}, un composant de la membrane neuronale, est plus élevée dans le fluide cérébrospinal de patients atteints de la maladie d'Alzheimer comparés aux sujets contrôles du même âge, dû à la sécrétion extracellulaire de ce ganglioside par les neurones endommagés (Blennow et al., 1991). Il a été montré que le G_{M1} est capable d'augmenter la production de protéine A β (Zha et al., 2004), de se lier à A β et d'entraîner la formation de fibrilles amyloïdes cytotoxiques (Okada et al., 2007). Dans ce contexte, la nature et le rôle d'une forme unique de la protéine A β liée aux gangliosides (GA β) fait l'objet de nombreuses recherches et pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer (Yanagisawa, 2007, 2011a).

Enfin, il a récemment été suggéré un contrôle de l'homéostasie des gangliosides par la protéine amyloïde β (Grimm et al., 2012). En effet, la liaison $G_{M3}/A\beta$ diminue l'activité de la G_{D3} synthétase et le domaine intracellulaire de l'APP (produit de clivage de l'APP) régule négativement la transcription de la G_{D3} synthétase. Par voie de conséquence, le G_{D3} décroit alors que l'expression du G_{M3} et des gangliosides de la série-a augmente. La question de savoir si les gangliosides sont une cause ou une conséquence de la maladie d'Alzheimer reste à élucider.

B- Rôles des gangliosides complexes des séries b- et c- dans la progression des tumeurs d'origine neuroectodermique

Le rôle des gangliosides complexes dans la progression cancéreuse a fait l'objet d'une publication en 2011, sous forme de chapitre publiée dans *Carbohydrate Chemistry* (Pilar Rauter et al., 2011). Dans cette revue (Bobowski et al., 2011), présentée en annexe, nous avons détaillé le rôle des gangliosides dans les tumeurs neuro-ectodermiques ainsi que dans la modulation des récepteurs à activité tyrosine kinase.

Alors que les gangliosides des séries 0- et a- sont généralement exprimés dans les tissus sains, les gangliosides complexes des séries b- et c- sont majoritairement exprimés au cours de l'embryogenèse mais leur expression est limitée dans les tissus adultes sains à l'exception du système nerveux central. Par ailleurs, ces gangliosides complexes peuvent être surexprimés dans certaines tumeurs d'origine neuro-ectodermique (mélanome, tumeurs cérébrales, cancer du poumon à petites cellules, cancer du sein) où ils jouent un rôle clef dans la croissance tumo-rale et les métastases (Bobowski et al. 2011, **Tableau 6**). A ce titre, le G_{D3} et le G_{D2} sont considérés comme des marqueurs oncofoetaux dans le mélanome et le neuroblastome.

De part leur néo-expression spécifique à la surface des cellules tumorales et leur implication dans la tumorigenèse, les gangliosides constituent des cibles d'intérêt dans la thérapie anticancéreuse (Rabu et al., 2012). 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 les patients atteints de mélanome ou de neuroblastome (Bobowski et al., 2011, **Tableau 6**).

Tissu Gangliosides et glycosyltransfe. Roles Stratégles thérapeutiques Réferences rases sur-exprimés rases sur-exprimés Portuokalian et al., 1993 Portuokalian et al., 1993 Mélanome $G_{0,1}$, $G_{0,0}$ synthélases ⁶ Le $G_{0,0}$ induit la proliferation, l'imvasion et al., 2012 Portuokalian et al., 2012 Mélanome $G_{0,1}^{*}$, $G_{0,0}$ synthélases ⁶ Le $G_{0,0}$ induit la proliferation, l'imvasion et al., 2012 Portuokalian et al., 2012 Mélanome $G_{0,1}^{*}$, $G_{0,0}$ synthélases ⁶ Le $G_{0,0}$ induit la proliferation finassion et al., 2012 Portuokalian et al., 2012 Mélanome $G_{0,1}^{*}$, $G_{0,0}$, $G_{0,0}^{*}$, $G_{0,0}^{*$					
Image Pertoukatian et al., 1979 The appropriate al., 1989 "Pertoukatian et al., 1989 Melanome G_{0v}^{1}, G_{0v} synthétase ² Le G _{0v} induit la prolifération, l'invasion et l'astase ³ Anti-G ₁₀₀ : R24 ⁴ et KM871 ⁴ "Pertoukatian et al., 1981 Mélanome G_{0v}^{1}, G_{0v} synthétase ² Le G _{0v} induit la prolifération, l'invasion et G _{0v} ¹ , 9-O acétyl-G _{0v} , 9-O acétyl-G _{0v} , 19.0. Pertoukatian et al., 2012 "Printingues de la prologente et al., 2012 G _{0v} ¹ , G _{0v} synthétase ² Le G _{0v} induit la prolifération, l'invasion et dans les radeaux lipidques ⁵ Ratio-G _{0v} , 9-O acétyl-G _{0v} ,	Tissu	Gangliosides et glycosyltransfé- rases sur-exprimés	Rôles	Stratégies thérapeutiques	Références
Image: Second et al., 1997Masi et al., 1997Turmeurs céré- brates (glioune, méningione,"Saito et al., 1997Turmeurs céré- brates (glioune, méningione, G_{20}^{10} , G_{20}^{11} , G_{20}^{20} synthétase ¹² Mati G_{20}^{20} , G_{20}^{11} , G_{20}^{20} synthétase ¹² Turmeurs céré- brates (glioune, méningione, méningione, méningione, G_{20}^{10} , G_{20}^{11} , G_{20}^{20} synthétase ¹² Croissance turnorale, anglogenèse ¹³ Anti- G_{20} , G_{20}^{11} , G_{20}^{20} synthétase ¹² Prolifération, migration, invasion ¹⁴ Anti- G_{20} , 3F8 combiné au GM-CSF et al lacide rétinoique (phase III) ¹⁵ "Cadisch et al., 1997Descrite al., 2000 méningione, méningione, méningione,Croissance cellulaire et invasion ¹⁴ Anti- G_{20} , 3F8 combiné au GM-CSF et 	Mélanome	G _{D3} ¹ , G _{D3} synthétase ² G _{D2} ⁶ , 9-O-acétyl-G _{D3} , 9-O-acétyl-G _{D2} ⁷	Croissance tumorale, mélanogénèse ³ , mé- tastase ⁴ Le G _{D3} induit la prolifération, l'invasion et l'adhésion de cellules SKMel-28, suite à l'activation des protéines FAK, p130 Cas,	Anti-G _{D3} : R24 ⁸ et KM871 ⁹ Elaboration de lymphocytes T chimé- riques spécifiques du G _{D2} ⁶	¹ Portoukalian et al., 1979 ² Thampoe et al., 1989 ³ Birklé et al., 2000 ⁴ Ravindranath et al., 1991 ⁵ Furukawa et al., 2012 ⁶ Yvon et al., 2009 ⁷ Kohla et al., 2002
Tumeurs céré- brales (gliome, méningiome, méningiome, merunblastome)"Interdisch et al., 1985 anti-G _{D2} 3F8 combiné au GM-CSF et al l'acide rétinorque (phase III) 15 al l'acide rétinorque et al. 2001 al l'acide rétinorque et al. 2005 al l'acide rétinorque et al. 2006 al l'acide rétinordue et al. 2008 al l'acide rétinordue et al. 2008 al l'acide rétinordue et al. 2008 al l'acide rétinordue et al. 2008 			dans les radeaux lipidiques ⁵		⁸ Nasi et al., 1997 ⁹ Scott et al., 2005
méningiome, neuroblastome) O_{D2} : O_{D3} :	Tumeurs céré- brales (gliome,	$ \mathbb{C}^{10} \mathbb{C}^{-11} \mathbb{C}^{-2000} $	Croissance tumorale, angiogenèse ¹³	Anti-G _{D2} 3F8 combiné au GM-CSF et	¹⁰ Saito et al., 1985 ¹¹ Ladisch et al., 1997 ¹² Oblinger et al., 2006
Cancer du pou- mon à petitesCroissance cellulaire et invasion ¹⁷ I6 Yoshida et al., 2001mon à petites $G_{D2}, G_{D1b}, G_{T1b}^{16}$ Augmente la prolifération et induit l'apoptoseAnti- G_{D2} 3F8 ¹⁹ I6 Yoshida et al., 2006mon à petites $G_{D2}, G_{D1b}, G_{T1b}^{16}$ Augmente la prolifération et induit l'apoptoseAnti- G_{D2} 3F8 ¹⁹ I6 Yoshida et al., 2006mon à petites $G_{D2}, G_{D1b}, G_{T1b}^{16}$ Augmente la prolifération et al voieI8 Anti- G_{D2} 3F8 ¹⁹ I8 Anti- G_{D2} 3F8 ¹⁹ par un mécanisme dépendant de la voiepar un mécanisme dépendant de la voieI8 Anti- G_{D2} 3F8 ¹⁹ I8 Anti- G_{D2} 3F8 ¹⁹ cellules9-0-acétyl- $G_{D3}, 9-0-acétyl-G_{T3}^{19}$ Augmente la migration et la prolifération de G_{D3} synthétase ²⁰ I9 Marquina et al., 1996)doz cellules souches) ²¹ G_{D2} (cellules souches) ²¹ Eccepteur c-Met ²² 2009)doz (cellules souches) ²¹ récepteur c-Met ²² 2012)2009)	méningiome, neuroblastome)		Prolifération, migration, invasion ¹⁴	à l'acide rétinoïque (phase III) ¹⁵	¹³ Zeng et al., 2000 ¹⁴ Sottocornola et al., 1998 ¹⁵ Cheung et al., 2012
$\begin{array}{c} \mbox{T}^{19}\mbox{Marquina et al., 1996)} \\ \mbox{G}_{D3}, 9-0-acétyl-G_{D3}, 9-0-acétyl-G_{T3}^{19}, \mbox{Augmente la migration et la prolifération de} \\ \mbox{G}_{D3} \mbox{synthétase}^{20} & \mbox{Cancer du sein} & \mbox{G}_{D3} \mbox{synthétase}^{20} & \mbox{cellules MDA-MB-231 suite à l'activation du} & \mbox{2009)} \\ \mbox{G}_{D2} \mbox{ (cellules souches)}^{21} & \mbox{récepteur c-Met}^{22} & \mbox{recepteur c-Met}^{22} & \mbox{concherver}^{22} & \mbo$	Cancer du pou- mon à petites cellules	G _{D2} , G _{D1b} , G _{T1b} ¹⁶	Croissance cellulaire et invasion ¹⁷ Augmente la prolifération et induit l'apoptose par un mécanisme dépendant de la voie ERK/MAPK ^{16,18}	Anti-G _{D2} 3F8 ¹⁹	¹⁶ Yoshida et al., 2001 ¹⁷ Ko et al., 2006 ¹⁸ Aixinjueluo et al., 2005 ¹⁹ Grant et al., 1996
	Cancer du sein	G _{D3} , 9-0-acétyl-G _{D3} , 9-0-acétyl-G _{T3} ¹⁹ , G _{D3} synthétase ²⁰ G _{D2} (cellules souches) ²¹	Augmente la migration et la prolifération de cellules MDA-MB-231 suite à l'activation du récepteur c-Met ²²		¹⁹ Marquina et al., 1996) ²⁰ (Ruckhäberle et al., 2008, 2009) ²¹ (Battula et al., 2012) ²² (Cazet et al., 2010)

<u>Tableau 6</u> : Rôles des gangliosides complexes dans la progression des tumeurs d'origine neuroectodermique</u>

V- LA G_{D3} SYNTHETASE, UNE ENZYME « CLEF » DE LA BIO-SYNTHESE DES GANGLIOSIDES COMPLEXES DES SE-RIES B ET C

A- Activité catalytique

La G_{D3} synthétase (GD3S) ou ST8Sia I est la seule sialyltransférase capable de catalyser le transfert d'un résidu d'acide sialique de type Neu5Ac par une liaison $\alpha 2,8$ sur le G_{M3} pour former le ganglioside G_{D3} : α -Neu5Ac-(2 \rightarrow 8)- α -Neu5Ac-(2 \rightarrow 3)- β -Gal-(1 \rightarrow 4)- β -GlcCer. Bien que ST8Sia I synthétise principalement du G_{D3}, des travaux ont montré sa capacité à synthétiser d'autres types de gangliosides. D'une part, selon Nakayama et ses collaborateurs, la G_{D3} synthétase peut également avoir la fonction de G_{T3} synthétase, transférant un autre résidu d'acide sialique en $\alpha 2,8$ sur le G_{D3} pour former le G_{T3} (Nakayama et al., 1996). D'autre part, l'analyse de l'activité enzymatique de la GD3S a révélé que cette enzyme utilise la structure glycannique terminale Neu5Ac $\alpha 2$ -3Gal des gangliosides, ce qui inclut les substrats accepteurs G_{M3}, G_{M1b}, G_{D1a} et G_{T1b}. ST8SIA I ne catalyse donc pas seulement la formation de G_{D3} mais aussi de G_{D1c}, G_{T1a} et G_{Q1b} *in vitro*. Les paramètres cinétiques indiquent que le G_{M3} reste néanmoins le substrat le plus efficace de cette enzyme (Nara et al., 1996). Ainsi, une autre $\alpha 2,8$ -sialyltransférase, ST8SIA V est principalement responsable de la synthèse des gangliosides G_{T3}, G_{D1c}, G_{T1a} et G_{Q1b} (Kim et al., 1997). Aucune activité de ST8SIA V envers le G_{M3} n'a été détectée.

ST8Sia I est donc la seule enzyme connue capable de synthétiser le G_{D3}. Son activité catalytique est déterminante pour la conversion des gangliosides de la série a- en gangliosides des séries b- et c-.

B- Expression tissulaire et fonction

Par la technique de Northern Blot à partir de différents tissus humains, les transcrits de la GD3S ont été retrouvés dans les cerveaux fœtal et adulte. Parmi les différentes parties du cerveau humain analysées, le niveau d'expression transcriptionnelle de *ST8SIA1* semble invariable. Les ARNm de *ST8SIA1* ont également été détectés dans le foie fœtal et très faiblement dans le foie adulte (Nakayama et al., 1996). Lors du développement embryonnaire de la souris, il a été montré que le G_{M3} et le G_{D3} sont les gangliosides prédominants dans le cerveau 14 jours après fécondation (E14), en accord avec une activité élevée de la G_{D3} synthétase. Cependant, à partir du 18^{eme} jour de l'embryogenèse (E18), l'activité de cette enzyme diminue rapidement jusqu'à la naissance. Au contraire, l'activité de la β4GalNacT1 (G_{M2}/G_{D2} synthétase) augmente entre E14 et E18 puis reste stable jusqu'à la naissance (Yu et al., 1988; Yamamoto et al., 1996). Même si la présence de la GD3S et des gangliosides de la série b- ne semble pas nécessaire à la différenciation neuronale de cellules souches embryonnaires (Kawai et al., 1998), l'expression de la GD3S et des gangliosides complexes des séries b- et c- jouent un rôle important dans la croissance cellulaire, l'adhésion et les interactions cellules. Des souris mutantes KO pour la

GD3S montrent une morphologie quasi-normale du tissu nerveux mais leur capacité de régénération nerveuse est nettement diminuée, indiquant que les gangliosides de la série b- contenant des acides sialiques en α 2,8 sont plus importants pour la réparation nerveuse que pour la différenciation du système nerveux (Okada et al., 2002). Un autre de modèle de souris double KO (GD3S-/GD2S-) créé par la même équipe, exprimant uniquement le ganglioside G_{M3}, se caractérise par une neurodégénération neuronale sévère aux premiers stades de la vie, suggérant que les gangliosides complexes sont essentiels au maintien du système nerveux tout au long de la vie (Tajima et al., 2009). Alors que l'expression de la G_{D3} synthétase est limitée dans les tissus adultes sains, une surexpression de cette enzyme est détectée dans certaines tumeurs d'origine neuro-ectodermique, jouant un rôle clef dans la croissance tumorale et les métastases (Furukawa et al., 2006, voir chapitre IV)

C- Organisation génomique de ST8SIA1

La séquence d'ADN complémentaire de la GD3S humaine a été simultanément isolée et clonée par 3 groupes de recherche (Haraguchi et al., 1994; Nara et al., 1994; Sasaki et al., 1994). Le gène *ST8SIA1* est localisé sur le chromosome 12 et comprend 5 exons codants répartis sur environ 135 Kb d'ADN génomique (**Figure 16 A**; Furukawa et al., 2003). La région 5' non traduite (5'-UTR) de ce gène a été étudiée dans différents modèles cellulaires (mélanome, glioblastome, neuroblastome, cellules Jurkat T) montrant des sites d'initiation de la transcription sur l'exon E1 compris entre -650 et 400 pb en amont du codon d'initiation de la traduction.

Deux codons d'initiation de la traduction ont été décrits sur l'exon E1, conduisant à 2 isoformes protéiques de 356 et 341 acides aminés (Figure 16 B, Sasaki et al., 1994; Nakayama et al., 1996). La séquence nucléotidique autour du deuxième AUG (acide aminé 16) semble être plus favorable à l'initiation de la traduction selon les règles de Kosak (Kozak, 1989). De plus, Sasaki et ses collaborateurs ont montré par des expériences de transfection, que la séquence codante de la G_{D3} synthétase sans le premier codon d'initiation montre le même niveau d'expression que pour la séquence possédant les 2 ATGs (Sasaki et al., 1994). Ces données suggèrent que cette forme courte de 341 résidus d'acides aminés pourrait être préférentiellement exprimée in vivo. La protéine correspondante possède une queue cytoplasmique de 12 acides aminés, un domaine transmembranaire d'environ 20 acides aminés et un domaine catalytique golgien qui contient les sialylmotifs. Ces motifs sont des courtes séquences protéiques consensus conservées au cours de l'évolution et caractéristiques de la famille des sialyltransférases. Le sialylmotif L est impliqué dans la liaison au substrat donneur CMP-Neu5Ac alors que le sialylmotif S semble être impliqué à la fois dans la liaison des substrats donneur et accepteur (Harduin-Lepers et al., 2001). Pour la suite du manuscrit, le deuxième ATG (acide aminé 16) est considéré comme le site d'initiation de la traduction (+1).



Figure 16 : Organisation des séquences génomiques et protéiques de la GD3 synthétase humaine. A : Organisation génomique du gène humain de la GD3 synthétase. La région codante (carrés bleu foncé) s'étend sur environ 135 kb et contient 5 exons (E1 à E5). Les carrés bleu ciel indiquent les régions non codantes. La distance des introns en kb est indiquée. Adapté de Furukawa et al 2003. B : Représentation schématique de deux produits de traduction de la GD3S en fonction de l'utilisation du premier ou du deuxième codon d'initiation, avec un début de traduction au niveau de l'acide aminé 1 ou l'acide aminé 16, respectivement. La queue cytoplasmique (Cyt), le domaine transmembranaire, la région tige (Stem) et le domaine catalytique sont présentés. Les sialylmotifs L (résidus 137-182) et S (résidus 273-295) sont indiqués. Adapté de Nakayama et al., 1996

D- Mécanisme de régulation transcriptionnelle

Chez les eucaryotes, l'ADN des gènes codants est transcrit en ARN grâce à une machine moléculaire complexe : l'ARN polymérase II. Le contrôle de l'activité de l'ARN polymérase II est très variable selon les gènes mais également selon les tissus. Cette régulation spécifique, essentielle pour l'homéostasie cellulaire et le développement des organismes, est dictée par l'interaction de facteurs de transcription entre eux et avec des séquences d'ADN spécifiques de chaque gène. Ces facteurs, qui sont pour la plupart de nature protéique, permettent à l'ARN polymérase II d'accéder au promoteur du gène, d'initier la synthèse d'ARN au niveau site d'initiation de la transcription (TSS) et de générer un complexe d'élongation de manière à synthétiser un ARN messager. Le niveau d'expression des gènes à un moment donné et un type cellulaire donné est dicté par la séquence d'ADN au sein et autour du promoteur. De manière générale, ce code contient 3 parties (**Figure 17**) : le promoteur « core », sur lequel se lie le complexe de pré-initiation composé des facteurs de transcription généraux ; la région promotrice proximale et les séquences enhancer plus distantes qui participent toutes deux à la liaison de facteurs de transcription spécifiques, activateurs ou répresseurs. Cette machinerie fait également intervenir des corégulateurs qui peuvent soit interagir directement avec l'ARN polymérase II et les facteurs de transcription généraux, soit participer à la réorganisation des nucléosomes ou à la modification de la chromatine (Fuda et al., 2009).



Figure 17: Les interactions dans les mécanismes de régulation transcriptionnelle. Les facteurs de transcription généraux (GTFs) se lient à des éléments de séquence spécifiques sur le promoteur. Ces éléments ("B recognition element" (BRE), "TATA box" (TATA) « initiator » (Inr), « motif ten element » (MTE) et « downstream promoter element » (DPE)) et leur localisation approximative par rapport au site d'initiation de la transcription (flèche noire) sont représentés. Les régulateurs transcriptionnels (ovale orange et diamant jaune), activateurs ou répresseurs se lient à des séquences d'ADN spécifiques localisés au niveau du promoteur core du gène ou au niveau de régions distantes, dites « enhancer ». Les régulateurs peuvent interagir (flèches vertes) avec les GTFs, tel que TFIID (rectangle bleu) ou la "TATA box protein" (TBP, fer à cheval bleu) et le complexe PoIII (fusée rouge) pour augmenter ou réprimer la transcription. Ils peuvent aussi interagir (flèches vertes) avec des co-régulateurs (hexagone vert) qui peuvent interagir (flèches bleues) avec la machinerie générale de transcription ou les facteurs de modificateurs peuvent aussi se lier aux nucléosomes (vert) avec différentes modifications d'histone, stabilisant la liaison du co-régulateur au gène. Les activateurs peuvent recruter, stabiliser ou stimuler ces facteurs alors que les répresseurs peuvent enlever ou inhiber ces facteurs. Tiré de Fuda et al., 2009.

Dans le cas du gène *ST8SIA1*, la région 5'non traduite (5'UTR) a été analysée dans les cellules de mélanome, de glioblastome et de neuroblastome montrant des sites d'initiation de la transcription tous situés sur l'exon E1 à environ 700 à 450 paires de base en amont de l'ATG (Furukawa et al., 2003 ; Kang et al., 2007 ; Dae et al., 2009 ; Kwon et al, 2009, **Figure 18**).

1) Dans les cellules de mélanome

Dans les cellules de mélanome SKMEL-28, Furukawa et ses collaborateurs ont mis en évidence, à l'aide de deux méthodes différentes de 5'-RACE, des sites d'initiation de la transcription (TSS) de *ST8SIA1* situés entre 523 et 456 pb en amont du site d'initiation de la traduction (+1).

L'analyse de la région en 5' montre l'absence de boîte TATA ou CCAAT dans la région promotrice mais différents sites putatifs pour la fixation de facteurs de transcription sont présents. L'absence de boîtes TATA ou CCAAT parallèlement à de multiples TSS sont des phénomènes courants pour les gènes de glycosyltransférases, probablement parce qu'il s'agit de promoteurs faibles.

Lors de tests luciférase, cette étude a montré que la région génomique comprise entre -833 et -519 en amont de l'ATG a une activité promotrice essentielle à la transcription de *ST8SIA1*. De plus, des régions de régulation négative (silencer) ont été mises en évidence entre -2306 et -1022. En particulier, il est intéressant de noter que des répétitions de séquences GT/CG entre -1200 et -1100 ont été retrouvées dans les régions de régulation négative dans le génome de trois espèces différentes : l'homme, le rat et la souris. Ce type de répétition est caractéristique de la formation d'ADN Z, une des plusieurs possibilités de structure en double hélice de l'ADN dont le rôle n'a pas encore été clairement démontré. Cependant, les segments d'ADN Z peuvent faire partie d'unités de CpG et pourraient ainsi constituer des sites de méthylation de la cytosine, associés à l'inactivation de gène (Furukawa et al., 2003).

La régulation transcriptionnelle de *ST8SIA1* a également été étudiée par un autre groupe dans une autre lignée de mélanome, la lignée SKMEL-2. Ces auteurs ont mis en évidence d'une part, des sites d'initiation de la transcription à -690 pb en amont de l'ATG et un maximum d'activité transcriptionnelle pour la séquence génomique comprise entre -1190 et -690. D'autre part, des expériences de mutagenèse dirigée et d'EMSA ont montré que le facteur NFkB se liait au niveau d'un site consensus situé à -774 pb en amont de l'ATG, conduisant à une augmentation de l'activité transcriptionnelle (Kang et al., 2007).

2) Dans les cellules de glioblastome

L'étude de la régulation transcriptionnelle de *ST8SIA1* réalisée dans les lignées de glioblastome T98G et U-87MG a montré la présence d'un site d'initiation de la transcription à -692 pb ainsi que la présence d'un promoteur core essentiel à la transcription entre -682 et -542. Cependant, contrairement aux deux études précédentes, la région entre -542 et +1, qui correspond à la séquence exonique E1 ne semble pas avoir d'effet répressif sur l'activité promotrice. Ces auteurs ont également montré, par mutagenèse dirigée, l'importance des facteurs ELK1 (-1267) et AREB6 (-1217) dans l'activation de l'activité promotrice de *ST8SIA1* (Dae et al., 2009).

3) Dans les cellules de neuroblastome

Dans les cellules de neuroblastome SK-N-BE, il a été montré que l'activité promotrice de *ST8SIA1* était fortement augmentée suite à une stimulation par l'acide valproïque (Kwon et al., 2009). L'acide valproïque est un acide gras à chaîne ramifiée, utilisé pour le traitement de l'épilepsie, qui peut également avoir des propriétés anti-tumorales. Les auteurs ont montré que la séquence entre – 1190 et -690 en amont de l'ATG était essentielle à l'activité promotrice de *ST8SIA1* induite par l'acide valproïque. Le rôle de NFkB dans cette induction a également été mis en évidence, et ceci par le biais de la voie de signalisation PKC/JNK (Kwon et al., 2009).

Pour résumer, l'analyse de la régulation transcriptionnelle de *ST8SIA1* effectuée dans différents modèles cellulaires par deux équipes différentes suggère un mode de régulation relativement simple de ce gène. En effet, dans chaque tissu étudié, la transcription débute au niveau d'un site unique sur l'exon E1 autour de 500 pb en amont du site d'initiation de la traduction. Aucune utilisation d'exon alternatif tissu-spécifique n'a été décrit, comme c'est le cas pour de nombreuses glycosyltransférases. Cependant, selon les tissus, des différences subsistent au niveau de la séquence génomique impliquée dans l'activité promotrice de *ST8SIA1* ainsi qu'au niveau des facteurs de transcription gouvernant la régulation de ce gène.



Figure 18 : Représentation schématique du promoteur du gène *ST8SIA1* décrit dans les lignées cellulaires de mélanome, glioblastome et neuroblastome. Les régions codantes sont représentées en bleu foncé alors que les régions non-codantes sont de couleur bleu clair. Les positions sur la séquence sont indiquées en pb par rapport au codon d'initiation de la traduction (ATG en gras). Les sites d'initiation de la transcription (TSS) allant de -690 à -450 en amont de l'ATG sont représentatifs de toutes les lignées cellulaires étudiées. Les positions des promoteurs core essentiels à la transcription de *ST8SIA1* sont représentées pour les cellules de mélanome (en vert et bleu), de neuroblastome (en bleu) et de glioblastome (en jaune). Pour chaque lignée, les positions des facteurs de transcription qui ont été décrits comme des régulateurs de l'expression de *ST8SIA1* dans les cellules de glioblastome (ELK1 et AREB6) et dans les cellules de mélanome et de neuroblastome (NFκB) sont représentées par un cercle de couleur. (Furukawa et al., 2003 ; Kang et al., 2007 ; Dae et al., 2009 ; Kwon et al, 2009)

VI- LE CANCER DU SEIN

Avec 53.000 nouveaux cas et 11.500 décès en France en 2011, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et le plus meurtrier chez la femme (données de l'institut national de veille sanitaire). Différents facteurs de risque sont associés à cette maladie : l'âge, les facteurs environnementaux (habitude alimentaire, alcool), âge de la première grossesse ou encore la composante héréditaire (7 à 10 % des cas, principalement dus à l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs *BRCA1* et *BRCA2* (*Breast Cancer Suceptibility 1 et 2*)). Le taux de mortalité diminue depuis 15 ans grâce au dépistage de masse et l'amélioration des traitements, notamment systémique (chimiothérapie, hormonothérapie, thérapies ciblées). Malgré ces progrès, l'évolution de cette maladie reste fatale chez 15 à 20 % des patientes. Dans ce contexte, un des enjeux majeurs de la recherche actuel vise à développer des molécules spécifiques, ciblant une altération moléculaire clef de la tumeur. Dans cette partie, nous présenterons dans un premier temps la classification histologique et moléculaire du cancer du sein et les traitements qui y sont associés. Nous décrirons ensuite les étapes du développerment du cancer du sein en insistant sur la formation de métastases, qui est la plus grande cause de décès par cancer. Enfin, nous nous focaliseront sur les antigènes glucidiques associés aux tumeurs de sein (AGAT).

A- Classification des tumeurs mammaires

Il existe plusieurs types de classification, basés sur différents critères (histologiques ou moléculaires). Le but est de décrire chaque cas individuel de cancer du sein afin de proposer un traitement adapté de façon à obtenir les meilleures chances de résultats, avec une bonne efficacité et une faible toxicité.

1) Classification histologique

a- Les différents types de cancer du sein

Cette classification est basée sur l'observation de biopsies au microscope. Les adénocarcinomes mammaires se développent soit à partir de cellules des canaux (**carcinome canalaire**), soit à partir des cellules des lobules (**carcinome lobulaire**) (Figure 19). Par ailleurs, on distingue les **carcinomes in situ** (non invasifs), pour lesquels la prolifération maligne des cellules épithéliales s'effectue dans la lumière du canal galactophore ou au niveau des acinis des lobules, sans envahir le tissu conjonctif, des **carcinomes infiltrants** (invasifs), qui ont la propriété d'envahir les tissus adjacents, évoluant localement et métastasant. Ainsi, les 3 types histologiques les plus courants, représentant environ 75% des cancers du sein, sont (Eheman et al., 2009) :

- o Carcinome canalaire infiltrant (55%)
- o Carcinome canalaire in situ (13%)
- Carcinome lobulaire infiltrant (5%)

D'autres formes plus rares de carcinomes mammaires sont répertoriées par l'organisation mondiale de la santé, tels que les carcinomes médullaires, tubuleux, mucineux, sécrétant ou encore métaplasiques.



Figure 19 : Les carcinomes canalaires et les carcinomes lobulaires. A : Structure de la glande mammaire. B et C : Représentations schématiques des structures canalaire (B) et lobulaire (C) dans les lesquelles la majeure partie des tumeurs de sein se développent.

b- Les grades du cancer du sein

Le grade du cancer du sein compare l'observation microscopique de cellules cancéreuses à celles de tissu sain et classifie le cancer du sein en 3 grades :

- Bien différenciées (grade 1)
- Moyennement différenciées (grade 2)
- Faiblement différenciées (grade 3 et 4)

En pratique, la détermination du grade se fait par l'évaluation de l'apparence cellulaire de la tumeur. Plus elle apparaît proche des cellules normales, plus leur croissance est normale et meilleur est le pronostic. Lorsque les cellules sont faiblement différenciées, elles apparaissent immatures, prolifèrent rapidement et tendent à s'étendre.

L'ajout de 3 autres critères de grade est recommandé par le système de graduation d'Elston et Ellis :

- La formation de tubules évalue le pourcentage de la tumeur qui forme des structures canalaires normales.
- Le pléomorphisme nucléaire évalue si les noyaux cellulaires sont uniformes (comme dans les cellules épithéliales normales) ou plus grands et irréguliers (pléomorphisme). Ces changements sont le signe d'une réplication cellulaire anormale, où les mécanismes qui contrôlent gènes et chromosomes sont altérés.

• **Le comptage mitotique** évalue le nombre de mitoses que le pathologiste voit dans 10 champs microscopiques. Plus ce nombre est élevé, moins le pronostic du cancer est bon.

1, 2 ou 3 points sont donnés pour chaque critère en fonction du grade et l'addition de ces points donne un score final et les grades correspondants :

- o 3-5 : Tumeur de grade 1 (bien différenciée), de bon pronostic.
- o 6-7 : Tumeur de grade 2 (moyennement différenciée), de moyen pronostic.
- o 8-9 : Tumeur de grade 3 (faiblement différenciée), de mauvais pronostic.

c- Les stades du cancer du sein

Ce type de classification décrit l'extension et la sévérité d'un cancer donné. Il est exprimé sur une échelle de 0 à IV :

- **Stade 0** : Cancer *in situ* (non invasif).
- Stade I : Taille de la tumeur ≤ à 2 cm, absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional.
- **Stade II** : Taille de la tumeur comprise entre 2 et 5 cm et/ou atteinte ganglionnaire satellite mineure.
- **Stade III** : Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure, absence de métastases.
- Stade IV : Tumeur avancée localement et métastases à distance.

La classification TNM (Tumor Node Metastasis) est un autre système de classification par stades, couramment utilisé par les cliniciens, qui fournit plus de détails sur l'apparence et le comportement du cancer. Ce système est basé sur 3 caractéristiques :

- La taille de la tumeur (T), de T0 à T4.
- Si le cancer a atteint ou non les ganglions lymphatiques (N), de N0 à N3.
- Si des métastases distantes sont présentes ou non (M), M0 ou M1.

Par exemple, un cancer du sein de type T1 N0 M0 signifie que la tumeur fait moins de 2 cm, (T1), ne présente pas d'invasion dans les ganglions lymphatiques (N0) ni de métastases (M0). Cette tumeur serait de stade I, rejoignant ainsi la classification décrite ci-dessus.

Le taux de survie globale à 5 ans mesuré chez 50.000 patientes depuis 1989 montre une diminution de la survie, passant de 92% pour un stade 0 à 13% pour un stade IV (Kumar, 2007). Ces données historiques ne montrent pas l'influence d'autres facteurs très importants, tels que le statut des récepteurs ER (Estrogen receptor) et HER2/neu.

2) Classification moléculaire

a- Description

En plus des paramètres cliniques (âge, statut ganglionnaire, taille de la tumeur, grade histologique, etc.), l'hétérogénéité du cancer du sein se reflète par la présence de marqueurs pathologiques tels que le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR) et le récepteur aux facteurs de croissance épidermiques humains (HER2). La présence ou non de ces récepteurs est couramment utilisée en clinique pour évaluer le pronostic des patientes et sélectionner les traitements adaptés.

Des études basées sur l'expression globale des gènes ont amené un autre aperçu de la complexité de cette hétérogénéité. Depuis une dizaine d'années, au moins 5 sous-types moléculaires de cancer du sein (*Luminal A*, *Luminal B*; *HER2-enriched*, *Basal-like* and *Normal-like*), présentant des profils d'expression géniques caractéristiques ont été décrits et intensément étudiés (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001; Prat et Perou, 2011). Ces groupes de tumeurs présentent des différences importantes en termes d'incidence (Millikan et al., 2008), de survie (Sørlie et al., 2001), et de réponse au traitement (Parker et al., 2009). De façon importante, les informations fournies par ces signatures moléculaires sont complémentaires à celles apportées par les marqueurs clinico-pathologiques classiques. De plus, ces signatures géniques semblent maintenues au cours du processus métastatique (Weigelt et al., 2005), indiquant que ces sous-types sont basés sur des propriétés biologiques stables des tumeurs. Les principales caractéristiques issues des études citées précédemment sont présentées ci-dessous :

- Luminal A : ER+, HER2-, de faible grade, le plus représenté (19 à 39 % des cancers du sein) avec une forte incidence chez les femmes de type caucasien non ménopausées. Il s'agit du sous-type moléculaire au pronostic le plus favorable.
- Luminal B : ER+, HER2+, de grade élevé (10 à 23 % des cancers du sein). Ce groupe présente une forte expression des gènes de prolifération cellulaire et anti-apoptotique par rapport au sous-type luminal A, expliquant son pronostic moins favorable.
- HER2-enriched : HER2+; ER- (4 à 10% des cancers du sein). Ces tumeurs surexpriment le gène ERBB2. Il s'agit de tumeurs à mauvais pronostique, dans lesquelles la protéine p53 est mutée dans 71% des cas.
- Basal-like: ER-, HER2-, PR-, CK5/6 + (15-20%). Ces tumeurs sont caractérisées par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux aux oestrogènes et à la progestérone, ainsi que du récepteur HER2. Elles présentent une forte expression des gènes de prolifération cellulaire, tels que le récepteur aux facteurs de croissance épidermique EGFR, et des cytokératines 5/6 (CK5/6). De plus, les gènes *p53* et *BRCA1* sont mutés dans la plupart des cas. Avec les tumeurs *HER2-enriched*, les tumeurs de type *basal-like* présentent le temps de survie le plus court chez les patientes atteintes de cancer du sein.
- Normal-like ou « non-classifié » (10%) : Ces tumeurs, pouvant être ER+ ou ER- présentent des caractéristiques communes avec le tissu mammaire normal mais aussi avec les cellules non-épithéliales du microenvironnement. Elles restent à ce jour encore mal définies.

Un nouveau-sous type intrinsèque de tumeurs mammaires (*Claudin-low*) a récemment été décrit (Prat et Perou, 2011). Il partage des caractéristiques communes avec le sous-type *basal-like* (ER-, PR-, HER2-) mais est aussi caractérisé par une faible expression de gènes impliqués dans les jonctions serrées et l'adhésion cellules-cellules, incluant 3 gènes *Claudin*.

b- Implication thérapeutique

Comme nous l'avons évoqué, ces sous-types moléculaires influencent la réponse au traitement. Par exemple, plusieurs études ont montré que la réponse à différents types de chimiothérapie néo-adjuvantes (taxol, anthracycline) est meilleure pour les tumeurs triple-négatives (ER-, PR-, HER2-) et *HER2-enriched* que pour les tumeurs de type ER positive (Rouzier et al., 2005; Carey et al., 2007; Parker et al., 2009). Cependant, en dépit de leur taux de réponse élevé à la chimio-thérapie, les tumeurs triple-négatives sont de mauvais pronostic et leur traitement demeure difficile.

Alors que les tumeurs mammaires hormono-dépendantes ou exprimant le récepteur HER2 peuvent être traitées spécifiquement par thérapie hormonale (tamoxifène, inhibiteur d'aromatase) ou par l'herceptine (anticorps dirigé contre HER2), l'absence de facteurs oncogéniques importants dans les tumeurs triple-négatives rendent difficiles leur traitement. A ce jour, aucune thérapie ciblée n'est disponible pour ce type de tumeurs, qui représente 15 à 20 % des cancers du sein. Néanmoins, plusieurs molécules ciblant des altérations moléculaires sont en cours d'essai clinique et certaines ont montré des résultats prometteurs (Bertucci et al., 2012, **Figure 20**).



Figure 20 : Stratégies thérapeutiques adaptées à chaque sous-type moléculaire de cancer du sein

En particulier, certaines stratégies thérapeutiques visent à inhiber les mécanismes de réparation de l'ADN afin de ralentir le processus de multiplication anarchique des cellules tumorales, comme c'est le cas des inhibiteurs de poly-(ADP-ribose)-polymérase (PARP1). Cette enzyme participe à la réparation de cassures de l'ADN simple brin. En son absence, les cassures simple brin deviennent double brin et ces dernières ne sont pas réparées si une déficience en BRCA1 est présente, entraînant un arrêt de la réplication (Bertucci et al., 2012). Plusieurs inhibiteurs de PARP-1 (Olaparib, Iniparib et Veliparib), administrés seuls ou en combinaison à la chimiothérapie, sont en cours d'essais cliniques chez des patientes atteintes de cancer du sein triple-négatif ou BRCA1-déficient. Par exemple, l'Olaparib a montré des effets anti-tumoraux significatifs en phase I d'essai clinique, avec des effets secondaires faibles par rapport à la chimiothérapie classique. En phase II, 40 % des patientes présentant une mutation de BRCA1 ont une réponse favorable à ce médicament (Lord et Ashworth, 2012). Parallèlement, l'Iniparib combiné à la chimiothérapie induit une réponse significative chez les patientes atteintes de cancer du sein triplenégatif en phase II d'essai clinique alors qu'en phase III, aucun effet bénéfique de ce traitement sur la survie globale n'a été observé. Pour conclure, la compréhension du fonctionnement des inhibiteurs de PARP dans chaque type tumoral et des études cliniques à plus grande échelle seront nécessaires pour conduire à la mise sur le marché de ce médicament (Lord et Ashworth, 2012).

B- Mécanismes de la tumorigenèse mammaire

La carcinogenèse mammaire est le résultat d'une succession d'étapes contribuant à la transformation d'une cellule saine en 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 (**Figure 21**). 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 les métastases ou tumeurs secondaires. Dans cette partie, nous discuterons des changements génétiques et épigénétiques associés aux différentes étapes de la carcinogenèse mammaire. Nous évoquerons également le concept de cellules souches.



Figure 21 : Evénements moléculaire, cellulaire et pathologique au cours de la carcinogénèse mammaire.

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

Depuis des années, il est bien établi que l'initiation et la progression du cancer du sein sont la conséquence de l'accumulation de mutations génétiques, qui conduisent à des fonctions cellulaires aberrantes. Ces mutations, héréditaires ou sporadiques, peuvent conduire à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou à l'activation d'oncogène. Plus récemment, il a été montré que des altérations réversibles des histones et de l'ADN (altérations épigénétiques) peuvent aussi participer à la tumorigenèse.

a- Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeur peuvent être divisés en 3 groupes : les garants de la stabilité du génome (*TP53*, *BRCA1/2*), les inhibiteurs de la croissance cellulaire (*RB*, *PTEN*) et les modulateurs du microenvironnement tumoral (*CDH1*). A la différence des oncogènes, l'effet des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs nécessite généralement que les deux allèles soient affectés.

Les gènes les plus fréquemment mutés dans le cancer du sein sont les suivants :

o **TP53**

La protéine p53 joue de nombreux rôles dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation des lésions moléculaires ou encore l'induction de l'apoptose. 25% des tumeurs mammaires présentent une mutation du gène *TP53*, associée à un mauvais pronostic de survie, notamment dans les tumeurs de type ER-, PR- (Olivier et al., 2006). L'inactivation de p53 induit une augmentation de la prolifération et de la probabilité de transformation maligne des cellules mammaires en raison d'une déficience dans le processus apoptotique. De plus, il semblerait que les mutations *TP53* soient associées à une résistance à la chimiothérapie dans le cancer du sein (Knappskog et Lønning, 2012).

• **RB**

La protéine Rb (*Retinoblastoma protein*) intervient dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire. Une expression aberrante de *RB* a été démontrée dans 20 à 35% des cancers du sein. La perte de fonction de cette protéine compromet les points clefs du cycle cellulaire, contribuant ainsi à une prolifération cellulaire anarchique. Par ailleurs, il a été montré que les tumeurs présentant une déficience en Rb sont associées à une récidive rapide de la maladie après traitement par le tamoxifène (Bosco et al., 2007).

• **PTEN**

La protéine PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*) participe à la régulation du cycle de division cellulaire en déphosphorylant les phosphatidylinositol triphosphates (PIP3). L'action de cette phosphatase est antagoniste à celle de la protéine kinase PI3K (Phosphatidyl-inositol-3-OH kinase), 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, impliquant une prolifération et une survie cellulaire incontrôlées.

o BRCA1/BRCA2

Les protéines BRCA (*Breast Cancer type 1 susceptibility protein*) sont directement impliquées dans la réparation des cassures de l'ADN, le maintien de la stabilité du génome ou encore l'activité transcriptionnelle d'autres gènes suppresseurs de tumeurs. La mutation des gènes *BRCA1* et *BRCA2* sont à eux seuls responsables de la moitié des cancers du sein à prédisposition génétique (2,5 à 5% des cancers du sein). Par ailleurs, la majorité des cancers du sein présentant une mutation germinale de *BRCA1* présente un phénotype triple-négatif. Bien que la majorité des cancers triple-négatifs soit sporadique sans mutation de *BRCA1*, des analyses phénotypiques et des études mécanistiques ont montré des similarités entre les tumeurs triple-négatives et les tumeurs présentant une mutation de *BRCA1*. Ainsi, tel que nous l'avons évoqué précédemment, des médicaments bloquant la réparation simple brin de l'ADN (comme PARP-1) pourraient être sélectivement létaux pour les cellules tumorales déficientes en BRCA1 (Metzger-Filho et al., 2012).

b- Activation d'oncogène

Les protéines codées par les oncogènes stimulent à la fois la prolifération, la survie, l'invasion et la migration des cellules cancéreuses. Il peut s'agir de facteurs de croissance (HGF/SF), de récepteurs au facteur de croissance (EGFR, c-Met), de protéines des voies de signalisation (Ras, Src), d'acteurs de la survie cellulaire (Bcl-2), de régulateurs du cycle cellulaire (cycline D1, cdk) ou encore de facteurs de transcription (c-Myb, 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.

Quelques exemples d'oncogènes sont détaillés ci-après :

• **MYC**

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 est plus élevée dans les tumeurs de type *basal* et les tumeurs BRCA1-déficientes (Xu et al., 2010).

• **CCDN1**

Ce gène 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 mais on le retrouve surexprimé dans 50% des cancers du sein, dû à d'autres mécanismes de régulation transcriptionnelle et traductionnelle anormaux. Il a été montré que le gène *CCDN1* est positivement régulé par l'œstradiol. A la différence de *MYC* qui possède des éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) sur son promoteur, la régulation de *CCDN1* par l'œstradiol semble se faire indépendamment des récepteurs aux œstrogènes (Roy et Thompson, 2006).

o **C-ERBB2**

Il s'agit du 3^{ème} 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. L'activation des voies de signalisation qui en découle (notamment Ras/MAPK et PI3K/Akt) conduit à une prolifération accrue et au développement de la tumeur. Avant l'arrivée de l'Herceptine, les tumeurs avec amplification d'*ERBB2* étaient de mauvais pronostic. L'Herbertine (ou Trastuzumab) est un anticorps monoclonal anti-HER2 recommandé pour le traitement des tumeurs métastatiques HER2+, qu'il soit utilisé seul ou en combinaison avec une thérapie endocrine ou une chimiothérapie. Même si ce traitement a permis d'améliorer significativement la survie de ces patientes, l'utilisation de ce type de thérapie ciblée est souvent limitée par le développement de résistance au traitement et de problèmes de tolérance. Afin d'améliorer les traitements, de nouveaux agents sont en cours d'essais cliniques. En particulier, les « petites molécules » Neratinib et Afatinib, inhibiteurs spécifiques de l'activité tyrosine kinase d'HER2 ont montré des résultats prometteurs (Awada et al., 2012).

c- Altérations épigénétiques

Les deux principales altérations épigénétiques couramment observées dans les cancers sont les suivantes (Connolly et Stearns, 2012) :

- l'hypoacétylation d'histone due à une forte expression de l'histone déacétylase HDAC, conduisant à la répression transcriptionnelle de gènes
- la méthylation anormale de l'ADN au niveau de promoteurs de gènes importants dans la réparation de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire ou encore l'apoptose.

Au cours de la carcinogenèse mammaire, une réduction de l'acétylation des histones et une expression aberrante d'HDAC1 a été observée (Suzuki et al., 2009; Connolly et Stearns, 2012). Il a été démontré que le Vorinostat, un inhibiteur d'HDAC diminue la prolifération de lignées cellulaires de cancer du sein et possède une activité anti-tumorale chez des patientes atteintes de cancer du sein avancé (Kelly et al., 2005). D'autre part, le traitement de lignée de cancer du sein ER- au Vorinostat induit une réactivation d'*ESR1*, suggérant que le Vorinostat pourrait restaurer la réponse au Tamoxifène des patientes. Une étude clinique a en effet montré que la combinaison de Vorinostat et de Tamoxifène administrée chez des patientes résistantes au traitement hormonal améliore le bénéfice clinique (Munster et al., 2011).

L'hypométhylation globale de l'ADN est beaucoup plus importante dans le cancer du sein (plus de 50% des cas) que dans les autres types de cancer, associée à un faible pronostic. Néanmoins, il est courant que des gènes associés au cancer du sein, tels qu'*ESR1*, *BRCA1* ou *PTEN* soient hyperméthylés et donc éteints par rapport au tissu normal. En particulier, le gène *ESR1* codant pour le récepteur α aux œstrogènes (ERα), possèdent des îlots CpG au sein de son promoteur. Alors que ces îlots ne sont pas méthylés dans les tissus normaux et faiblement dans les tumeurs ER+/PR+ (35%), il a été montré que 100% des tumeurs ER-/PR- et environ 70% des tumeurs ER+/PR+ sont méthylés au niveau du promoteur *ESR1* (Lapidus et al., 1998). Ces résultats suggèrent que la réversion de la méthylation du promoteur de *ESR1* pourrait rendre sensible les tumeurs au traitement hormonal. Dans ce contexte, l'inhibiteur de méthyltransférase 5azacitidine, utilisé en tant qu'inducteur de l'expression des gènes *ESR1* et *PR*, est en cours d'essai clinique chez des patientes atteintes de cancer du sein triple-négatif en attente d'une opération chirurgicale (Connolly et Stearns, 2012). Des études précliniques combinant inhibiteur de méthyltransférase et inhibiteur d'HDAC montrent des résultats encourageants et constituent une nouvelle piste thérapeutique pour le traitement du cancer du sein.

2) Invasion et métastases

Presque tous les décès causés par des tumeurs solides sont le résultat de métastases, suite à la colonisation de cellules tumorales primaires au niveau d'autres organes. Dans le cancer du sein, les métastases peuvent se manifester des dizaines d'années après le traitement de la tumeur primaire, par rapport à d'autres cancers comme le cancer du poumon, pour lequel le temps de colonisation est souvent très rapide. Les principaux organes touchés par les métastases prove-

nant d'un cancer du sein sont l'os, le poumon, le foie et le cerveau. Il est intéressant de noter que des sites métastatiques préférentiels ont été observés selon la signature moléculaire de la tumeur. Par exemple, les tumeurs de type *basal* tendent à former des métastases au foie et au poumon alors que leur fréquence de métastases à l'os est faible. Au contraire, pour les tumeurs *luminal* hormono-dépendantes, une rechute au niveau de l'os est couramment observée (Sihto et al., 2011).

a- Le processus métastatique (Figure 22)

La métastase est un processus complexe qui consiste en une série d'interactions dynamiques entre les cellules tumorales et les cellules hôtes, qui permettent aux cellules tumorales de quitter le site primaire pour établir une lésion distante (Eckhardt et al., 2012).

A partir d'une tumeur primaire, les principales étapes impliquées dans la cascade métastatique des cellules cancéreuses sont les suivantes :

- Rupture de la membrane basale permettant la migration et l'invasion à travers des mécanismes moléculaires semblables à la transition épithélium-mésenchyme (EMT : Epithelial mesenchymal transition). Les fibroblastes associés au cancer et les cellules immunitaires participent à ce processus à travers la modification de l'immunogénicité et en fournissant des facteurs de croissance solubles.
- Intravasation dans le système circulatoire : les cellules tumorales entrent entre les vaisseaux sanguins ou lymphatiques.
- Attachement au niveau des cellules endothéliales vasculaires et extravasation depuis le vaisseau jusqu'au tissu. Ce tissu distant constitue un environnement étranger et la plupart des cellules meurent du fait d'incompatibilité d'adhésion moléculaire et d'interaction de croissance. Cependant, la longue latence entre la thérapie initiale et la métastase (caractéristique des tumeurs ER+) montrent que les cellules tumorales peuvent rester dormantes pendant de nombreuses années.
- Prolifération d'une petite fraction des cellules tumorales. Pour établir la croissance au niveau du site secondaire, il a été proposé que les cellules tumorales subissent une transition reversée de cellules mésenchymateuses à cellules épithéliales (MET : Mesenchymalto-epithelial-transition). Comment et quand les cellules dormantes réacquièrent leur potentiel de croissance reste encore mal défini.

• Apparition de métastases

Α SITE PRIMAIRE Cellule Cellule myoépithéliale tumorale Cellule endothéliale 0 0 C Angiogenèse 0 0 0 0 Invasion/migration EMT Intravasation C 0 0 Fibroblastes 0 OX Facteurs de 0 Circulation systémique croissance 0 Rupture de la Cellule membrane basale immunitaire. inflammation В SITE SECONDAIRE **Chimio-attraction** Attachement 00000 0 0 0 0 0 Circulation 0 000 0 Plaquettes (aident à l'attachement) systémique 1 000 \bigcirc 0 OY OY OY 0 Extravasation MET Site secondaire (os, poumon, cerveau) Etablissement des Ré-initiation de cellules cancéreuses la prolifération Métastase déclarée

Figure 22 : Les différentes étapes du processus métastatique. Les cellules tumorales au niveau du site primaire (A) sont influencées par le « crosstalk » avec le stroma, qui mène à la rupture de la matrice extracellulaire et permet la migration et l'invasion au travers de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT : *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*). L'intravasation des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques est la première étape de la dissémination à distance. Au niveau du site secondaire (B), les cellules tumorales circulantes adhérent aux cellules vasculaires et subissent leur extravasation des vaisseaux vers le tissu cible (généralement l'os, le poumon ou le cerveau, dans le cas du cancer du sein). Seule une petite portion des cellules tumorales se développeront en métastases. Afin d'établir leur croissance au niveau du site secondaire, il est proposé que les cellules tumorales subissent une transition réverse mesenchymo-épithéliale (MET : Mesenchymal-to-Epithelial Transition) avant de réinitier leur mécanisme prolifératif. Adapté de Eckhardt et al., 2012.

b- Les altérations génétiques contribuant au processus métastatique

De manière intéressante, les métastases partagent en grande p*a*rtie les mêmes mutations que la tumeur primaire (Ding et al., 2010). De nouveaux gènes sont également impliqués dans le processus métastatique, pouvant être regroupés en 3 catégories : 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 23**).



Figure 23 : Gènes impliqués dans le processus métastatique. En plus des gènes initiateurs de la tumeur primaire, des classes distinctes de gènes participent à l'initiation, la progression et la virulence du processus métastatique. Ces fonctions peuvent être dues à des altérations génétiques ou épigénétiques et pourraient doter les cellules circulantes d'une capacité à infiltrer, survivre en latence et coloniser des organes distants. Adapté de Nguyen et al., 2009.

Quelques exemples de gènes impliqués dans les métastases du cancer du sein sont décrits ciaprès :

o TWIST1

Ce gène code pour le facteur de transcription Twist1. Une fois activé, ce répresseur induit la répression transcriptionnelle de l'E-cadhérine, par recrutement d'histones déacétylases au niveau du promoteur de l'E-cadhérine. Sa surexpression dans les carcinomes mammaires métastatiques conduit à une perte d'adhésion cellule-cellule reliée à E-cadhérine, une activation de marqueurs mésenchymateux et une induction de la motilité cellulaire, indiquant sa contribution à l'EMT au cours du processus métastatique (Yang et al., 2004).

• **COX2**

Ce gène code pour la cyclooygénase-2, qui permet la production de prostaglandine E2 (PGE2) à partir d'acide arachidonique. PGE2 est une petite molécule diffusible, ayant la

capacité de modifier le microenvironnement, notamment dans un contexte tumoral. L'équipe de Lucci a montré que la surexpression de *COX2* dans les cellules tumorales de sein induit la migration et l'invasion cellulaire. Par ailleurs, l'inhibition de cette enzyme dans un modèle de souris résulte en l'inhibition de l'apparition de métastases vers l'os à partir d'un carcinome mammaire. Enfin, l'expression de *COX2* dans des tumeurs primaires de sein est fortement corrélée à un tropisme métastatique vers la moelle osseuse. Cox-2 pourrait ainsi constituer une cible thérapeutique d'intérêt pour l'éradication de micrométastases avant que la métastase clinique ne soit déclarée (Singh et al., 2007; Lucci et al., 2009).

o ST6GALNAC5

Ce gène code pour la sialyltransférase ST6GalNAc V, exprimée uniquement au niveau du cerveau, où elle est impliquée dans la biosynthèse des gangliosides de la série α (**Figure 5**). L'équipe de Massagué a montré que la néo-expression de ST6GalNAc V par les cellules mammaires cancéreuses favorise l'adhérence de ces cellules au niveau des cellules endothéliales cérébrales et leur passage au travers la membrane hémato-encéphalique (Bos et al., 2009). Les métastases cérébrales affectent environ 10 à 15 % des patientes atteintes de cancer du sein métastatique. En raison de la structure particulière de la barrière hémato-encéphalique, l'extravasation de cellules tumorales circulantes et la colonisation du tissu cérébral nécessitent l'acquisition de fonctions particulières par les cellules mammaires. Ainsi, l'exemple de cette sialyltransferase cérébrale, qui oriente la métastase du cancer du sein vers le cerveau, met en avant le rôle de la glycosylation de surface dans les interactions métastatiques organe-spécifiques.

c- Les traitements pour le cancer du sein métastatique

Les cellules métastasées développent souvent des résistances aux chimiothérapies conventionnelles, contribuant au mauvais pronostic des patientes présentant un cancer disséminé. Pour contourner ce problème, des thérapies ciblées sont actuellement utilisées en clinique (anti-ER, anti-HER2 ou aromatase) ou sont en cours de développement (Eckhardt et al., 2012). Certaines de ces cibles sont impliquées dans l'invasion et l'extravasion au niveau du site primaire. Par exemple, des médicaments anti-inflammatoires non-stéroïdiens ciblant spécifiquement Cox-2 permettent de diminuer le risque de métastases vers l'os. Cependant, les essais cliniques ont révélé que les inhibiteurs de Cox-2 présentent d'importants effets secondaires (Reader et al., 2011). D'autres cibles, principalement stromales, sont présentes au niveau du site secondaire. Pour les métastases à l'os, une première option thérapeutique consiste à administrer des biphosphanates, afin d'empêcher la libération de facteurs de croissance par la dégradation du stroma osseux. D'autres thérapies ciblées visant le stroma, telles que le Denosumab, un anticorps monoclonal ciblant RANKL (Receptor Activator of NF-κB ligand) ou l'Avastine, un anticorps monoclonal anti-angiogenèse (anti-VEGF) peuvent également être utilisées en clinique.

3) Les cellules souches de cancer du sein

Depuis quelques années, un concept définit une nouvelle classe de cellules tumorales possédant un fort potentiel tumorigène : les cellules initiatrices de tumeur ou cellules souches de cancer. Ces cellules possèdent des caractéristiques communes avec les cellules souches adultes normales. Elles sont capables de se renouveller de façon illimitée et de se différencier en diverses cellules qui constituent la tumeur. De plus, ces cellules sont souvent résistantes aux thérapies tumorales conventionnelles (radiothérapie, chimiothérapie).

Les cellules souches de cancer du sein (BCSC : Breast Cancer Stem Cells) sont caractérisés par la présence des phénotypes CD44⁺/CD24^{-/low} (antigènes de surface) et ALDH⁺ (Aldéhyde déhydrogénase). L'isolement des BCSC a permis l'analyse des voies de signalisation impliquées dans leur auto-renouvellement et leur résistance au traitement telles que Notch, Hedgehog et Wnt. Par ailleurs, des expériences de KO ou de transgenèse chez l'animal ont identifié l'implication des facteurs de transcription NF- κ B, c-Jun ou encore Dach1 dans l'expansion et le sort des BCSC (Velasco-Velázquez et al., 2011). Enfin, plusieurs études ont suggéré l'implication des BCSC dans le processus métastatique. En particulier, l'isolement dans 33 lignées cellulaires mammaires de BCSC grâce à leur activité ALDH a révélé que ces cellules possèdent une signature moléculaire propre et sont capables d'induire le processus métastatique (Charafe-Jauffret et al., 2009). Plusieurs auteurs ont proposé un modèle dans leguel les cellules souches de cancer sont une source active de l'épanchement métastatique. Cependant, de nombreux points restent à éclaircir, notamment s'il existe une catégorie de BCSC avec des propriétés uniques, quel est le phénotype spécifique, et si ces caractéristiques sont constantes d'un sous-type moléculaire à l'autre. Enfin, des analyses cliniques indiquent qu'il existe une corrélation entre la proportion de BCSC et un mauvais pronostic (Marcato et al., 2011; Velasco-Velázquez et al., 2012). L'ensemble de ces données montre que les BCSC constituent de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but d'inhiber la tumorigenèse mammaire.

C- Les antigènes glucidiques associés aux tumeurs de sein

Les glycoconjugués (glycoprotéines ou glycolipides) à la surface cellulaire jouent des rôles importants dans diverses fonctions biologiques telles que les interactions cellules-cellules et cellule-substrat, l'adhésion bactérienne, l'organisation de la membrane, l'immunogénicité ou encore le ciblage protéique (e.g. la liaison sialyl-lewis^X/sélectine). La modification de la glycosylation cellulaire est un changement phénotypique courant dans les cellules cancéreuses, conduisant à l'expression d'antigènes glucidiques associés aux tumeurs (AGAT). Dans cette partie, nous décrirons les principaux AGAT dans le cancer du sein et les conséquences de ces changements de glycosylation dans le développement et l'agressivité de la maladie (Cazet et al., 2010). Tableau 7 : Principaux antigènes glucidiques associés aux carcinomes mammaires. Adapté de Cazet et al., 2010.

AGAT		DCIS	IDC	Commentaires				
Antigènes de type mucine								
Structure de type core 2				Exprimée dans les cellules normales				
Thomsen-Friedenreich (T)	Ο ^{/μ−3} R	ND	Elevé					
Thomsen-nouvelle (Tn)	□ ^α R	Elevé	Elevé	Exprimé dans presque 90% des cancers du sein				
Sialyl-Thomsen-nouvelle (Sialyl-Tn)	€2-3 R €2-6 R	ND	Elevé					
Lewis Antigens								
Sialyl-Lewis ^x	♣	Faible	Elevé	Expression élevée dans les cancers métastatiques				
Sialyl-Lewis ^a	₽ <i>1-3</i>	Faible	Elevé					
Lewis ^Y	B1-4	Bas	Elevé	Sur-exprimé dans 60 à 90% des cancers du sein				
Gangliosides								
G _{M3}	Cer-	ND	Augmenté	2.8 fois plus par rap- port au tissu normal				
G _{D3}	Cer-0 <i>β1-4</i>	ND	Augmenté	1.7 fois plus par rap- port au tissu normal				
9-O-acétyl-G _{D3}	Cer-Ac <i>B1-4</i>	ND	Néo- expression					

.


AGAT : Antigène Glucidique Associé aux tumeurs, DCIS (Ductal Carcinoma In Situ) : Carcinome canalaire in situ, IDC (Invasive Ductal Carcinoma) : Carcinome canalaire infiltrant

1) Les O-glycannes de type mucine

La O-glycosylation de type mucine est une modification post-traductionnelle qui consiste en la liaison d'un glycanne par l'intermédiaire d'un résidu de GalNAc sur les résidus de serine ou de thréonine d'une protéine. Les mucines étant des glycoprotéines membranaires ou sécrétées, riches en sérine et en thréonine, fortement O-glycosylées, elles ont donné leur nom à ce type de glycosylation. Dans les cellules épithéliales mammaires normales, ces O-glycannes sont principalement des structures de type core 2, étendues par une chaîne polylactosaminique (Tableau 7), qui peut être fucosylée ou sialylée (Hanisch et al., 1989; Croce et al., 2007). Au contraire, les cellules cancéreuses mammaires expriment des O-glycannes tronqués, avec des chaînes glycanniques plus courtes et une tendance à former des antigènes de type T (Thomsen-Friedenreich), Tn (Thomsen-nouvelle) et sTn (sialyl-Thomsen-nouvelle) (Springer, 1984; Schmitt et al., 1995, Tableau 7). L'apparition de ces structures raccourcies dans les cellules cancéreuses est principalement due à la répression ou à la mutation de gènes codant les glycosyltransférases permettant l'extension des O-glycannes (C1 β 3GalT, Core 2 β 6-GlcNAcT1). En parallèle, la surexpression de sialyltransférases, telles que ST3Gal I et ST6GalNAc I peuvent entrer en compétition avec les enzymes impliquées dans l'extension normale et générer des structures tronquées sialylées (Cazet, Julien, et al., 2010). De nombreuses études ont suggéré l'implication de ces structures dans la carcinogenèse mammaire. En particulier, l'induction de l'expression du sTn dans d'une lignée de cancer du sein par transfection avec le cDNA codant ST6GalNAc I diminue l'adhésion des cellules aux protéines matricielles et augmente la mobilité et la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe (Julien et al., 2005, 2006). Il a également été montré que le Theratope, un vaccin composé de sTn synthétique couplé à l'hématocyanine induit une protection tumorale dans un modèle de souris (Julien et al., 2009).

2) Les antigènes Lewis

Les antigènes Lewis sont retrouvés dans la plupart des tissus épithéliaux chez l'homme, où ils sont exprimés au niveau de la partie terminale des chaînes glycanniques des glycolipides ou des glycoprotéines. Ces antigènes dérivent de la substitution des disaccharides de type 1 (Galβ1-3GlcNAc) ou de type 2 (Galβ1-4GlcNAc) par des résidus de fucose ou d'acide sialique. Le sein normal exprime couramment le Lewis^X (Le^x) alors que l'expression du sialyl-lewis^a (sLe^a) et du sialyl-lewis^x (sLe^x) sont retrouvés dans les tissus cancéreux mammaires (Renkonen et al., 1997, Tableau 7). Ces changements impliquent la dérégulation des fucosyltransférases et sialyltransférases impliquées dans la biosynthèse des antigènes Lewis. L'expression des antigènes sLe^a et sLe^x est faible dans les carcinomes in situ, modérée dans les carcinomes invasifs et élevée dans les carcinomes primaires présentant des métastases ganglionnaires (Jeschke et al., 2005). Le sLe^x des leucocytes contribue à la réponse inflammatoire de part son interaction avec l'E-sélectine au niveau des cellules épithéliales. En exposant le sLe^x à la surface cellulaire, les cellules malignes pourraient utiliser une stratégie similaire pour leur extravasation de la circulation sanguine jusqu'au site secondaire. En ce sens, il a été montré qu'une expression élevée de la sialyltransférase ST3Gal III (impliquée dans la synthèse de sLe^x) et une forte concentration sérique d'E-sélectine étaient associées à un mauvais pronostic, considérant la survie sans récidive et la survie globale de patientes atteintes de cancer du sein (Hebbar et al., 2003).

3) Les gangliosides

Tel qu'il l'a été décrit dans le paragraphe IV-b, la néo-expression des gangliosides a été démontrée dans divers cancers d'origine neuroectodermique, dans lesquels ils jouent un rôle clef dans la progression tumorale. Dans le cancer du sein, Marquina et ses collaborateurs ont montré que les gangliosides G_{M3}, G_{D3} et ses dérivé 9-O-acétyl-G_{M3} et 9-O-acétyl-G_{T3}, dont l'expression est très limitée dans les tissus mammaires sains, sont surexprimés dans environ 50% des carcinomes canalaires infiltrants (Marquina et al., 1996, **Tableau 7**). Le N-glycolyl-G_{M3}, comportant un acide sialique de type Neu5Gc, a également été détecté dans des tumeurs primaires de stade II (Oliva et al., 2006). Chez l'homme, le gène CMAH codant la CMP-Neu5Ac hydroxylase est irréversiblement inactivé. L'absence de cette enzyme, responsable de la conversion de CMP-Neu5Ac en CMP-Neu5Gc, résulte en l'absence totale de Neu5Gc chez l'adulte sain. Cependant, il a été montré que le Neu5Gc pouvait être exprimé au niveau de glycoprotéines et de gangliosides dans différents types de cancer, tels que le mélanome et le cancer du sein. Ainsi, le Nglycolyl-G_{M3} constitue une cible d'intérêt dans le cadre de la thérapie vaccinale du cancer (anti-N-glycolyl-G_{M3} 1E10, Fernandez et al., 2010). Par ailleurs, de façon surprenante, il a été montré que les gangliosides présents dans les lignées de cancer du sein BT-20 et MDA-MB-436 sont capables de se lier à l'E-sélectine, indépendamment de la présence d'épitopes sLe (Shirure et al., 2011).

Enfin, l'équipe d'Andreeff a récemment montré, dans des lignées de cancer du sein et des échantillons de patients, la présence de G_{D2} dans une petite fraction de cellules. Ces cellules G_{D2} + sont capables de former des mammosphères et d'initier la tumeur et sont principalement CD44⁺/CD24^{-/low}. Ces auteurs ont ainsi identifié le G_{D2} comme un nouveau marqueur spécifique des BCSC, critique pour l'initiation tumorale (Battula et al., 2012).

Les glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des gangliosides peuvent être altérée dans le cancer du sein. En particulier, il a été montré que les sialyltransférases G_{M3} synthétase (ST3Gal V), G_{D3} synthétase (ST8Sia I) et ST6GalNAc V jouent un rôle clef dans l'invasion et les métastases du cancer du sein (Gu et al., 2008; Bos et al., 2009; Cazet, Lefebvre, et al., 2010). De plus, d'après les résultats de Battula et ses collaborateurs, la G_{D3} synthétase est fortement exprimée dans les BCSC, où elle est responsable de la synthèse de G_{D2} (même si la plus proche enzyme convertissant le G_{D3} en G_{D2} est la G_{M2}/G_{D2} synthétase, **Figure 5**). L'inhibition de la G_{D3} synthétase par sh-RNA réduit la population de BCSC et abolit la formation de la tumeur *in vivo* (Battula et al., 2012), montrant l'importance de cette enzyme dans la tumorigenèse mammaire.

VII- LA G_{D3} SYNTHETASE DANS LE CANCER DU SEIN

A- Profil d'expression

Deux études cliniques ont 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, corrélée à un grade histologique élevé des patientes (Ruckhäberle et al., 2008, 2009, **Figure 24**). A l'inverse, chez les patientes présentant une tumeur ER positive, une expression élevée de *ST8SIA1* serait associée à une augmentation de la survie sans récidive.



Figure 24 : Analyse par microarray de l'expression du gène *ST8SIA1* en fonction du statut ER dans 6 bases de données différentes. Les valeurs de significativité (p-value) calculée selon le test de Mann-Whitney apparaissent en dessous de chaque graphique. Tiré de Ruckhäberle et al., 2008

En parallèle, des cellules dérivées de la lignée de cancer du sein MDA-MB-231, qui métastasent spécifiquement au niveau de l'os (MDA-MET) ont été isolées dans un modèle de souris (Carcel-Trullols et al., 2006). Par une analyse en microarray, ces auteurs ont montré que les cellules MDA-MET surexpriment le gène *ST8SIA1* par rapport aux cellules MDA-MB-231 initiales, suggérant le rôle potentiel de la G_{D3} synthétase dans les métastases osseuses.

B- Rôle de la G_{D3} synthétase dans la carcinogenèse mammaire, le modèle MDA-MB-231 GD3S+

Au cours de la thèse d'Aurélie Cazet effectuée entre 2007 et 2010, les travaux effectués au laboratoire visaient à comprendre le rôle de la G_{D3} synthétase et des gangliosides complexes dans le développement du cancer du sein. Les lignées de cancer du sein utilisées en routine n'exprimant peu ou pas les gangliosides complexes, la stratégie expérimentale a consisté à créer un modèle cellulaire dérivé de cellules MDA-MB-231 (de type basal-like), transfectées stablement par l'ADNc codant ST8SIA1 (Cazet et al., 2009). Ces cellules MDA-MB-231 GD3S+, exprimant principalement les gangliosides G_{D3}, G_{D2} et G_{T3} prolifèrent en l'absence de facteurs de croissance et migrent davantage que les cellules contrôles, qui n'expriment pas de gangliosides complexes. Des expériences de phospho-array et de Western-blotting ont par ailleurs révélé que les cellules MDA-MB-231 GD3S+ présentaient une auto-activation constitutive du récepteur au facteur de croissance c-Met, en l'absence de son ligand HGF; ainsi qu'une activation des voies de signalisation intracellulaires MEK/ERK et PI3K/Akt (Cazet et al., 2009; Cazet, Lefebvre, et al., 2010). Par ailleurs, une surexpression de la protéine de survie Bcl2 a été observée dans les clones MDA-MB-231 GD3S+, permettant à ces cellules de résister à l'apoptose en l'absence de facteurs de croissance. Enfin, il a été montré que l'expression de la G_{D3} synthétase augmente la croissance tumorale in vivo.

VIII- PROBLEMATIQUES ET OBJECTIFS DE LA THESE

A- Quels gangliosides sont impliqués dans l'auto-activation de c-Met et le phénotype prolifératif dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+?

Comme nous l'avons évoqué, il a été montré que les capacités prolifératives des cellules MDA-MB-231 GD3S+ créées au laboratoire proviennent directement de l'activation constitutive du récepteur c-Met et des voies de signalisation MEK/ERK et PI3K/Akt (Cazet et al., 2009; Cazet, Lefebvre, et al., 2010). Le premier objectif de ma thèse a été de déterminer les mécanismes responsables de l'auto-phosphorylation de c-Met dans ces cellules. Pour cela, nous avons d'abord analysé, par spectrométrie de masse, la composition précise en gangliosides dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ par rapport aux cellules MDA-MB-231 contrôles. Les résultats montrent que les gangliosides G_{D3} et G_{D2} sont majoritaires dans les cellules GD3S+ alors que les cellules contrôles accumulent principalement du G_{M3} et du G_{M2}. Le traitement des cellules MDA-MB-231 GD3S+ à l'aide d'anticorps spécifiques anti-G_{D3} et anti-G_{D2} nous ont ensuite permis de montrer que seul le G_{D2} était directement impliqué dans l'activation constitutive du récepteur c-Met, en l'absence de son ligand HGF/SF. Ces résultats sont présentés sous-forme d'article paru dans *Glycobiology* (Cazet, Bobowski, et al., 2012).

Lors d'un séjour de 3 mois dans le laboratoire du professeur Furukawa (Département de Biochimie moléculaire, Université de médecine de Nagoya, Japon), j'ai également isolé les radeaux lipidiques à partir des cellules MDA-MB-231 GD3S+, de manière à déterminer une colocalisation de c-Met et des gangliosides au niveau des microdomaines lipidiques. Les résultats préliminaires seront discutés à la fin du mémoire.

B- Quels sont les mécanismes moléculaires qui conduisent à la surexpression de la G_{D3} synthétase dans les cellules cancé-reuses mammaires?

De manière à déterminer les voies de signalisation impliquées dans la surexpression de la G_{D3} synthétase, l'objectif de cette deuxième partie de ma thèse a été dans un premier temps, d'analyser la région 5'-UTR du gène *ST8SIA1*, codant la G_{D3} synthétase. Par la méthode de 5'-RACE, nous avons déterminé les sites d'initiation de la transcription de *ST8SIA1* dans plusieurs échantillons de tumeurs mammaires de type ER négatif et dans la lignée cellulaire de cancer du sein Hs578T (de type *basal-like*). Nous avons décrit le principal transcrit exprimé et nous avons caractérisé, à l'aide de tests luciférase, le promoteur « core », essentiel à la transcription de *ST8SIA1* dans les cellules de cancer du sein.

Etant donné qu'il existe une corrélation inverse entre l'expression de *ST8SIA1* et le statut ER de la tumeur (Ruckhäberle et al., 2008), nous nous sommes ensuite demandés si l'œstradiol pouvait réguler l'expression de *ST8SIA1*. Des analyses de Q-PCR ont montré une réduction du ni-

veau d'expression transcriptionnelle de *ST8SIA1* dans deux lignées de cancer de sein traitées à l'œstradiol : la lignée MCF-7 (ER positive) et la lignée Hs578T (ER négative), préalablement transfectée avec un vecteur codant le récepteur ERα. De plus, nous avons montré que l'œstradiol diminue par deux l'activité du promoteur de *ST8SIA1* dans les cellules Hs578T transfectées par ERα. L'ensemble de ces résultats est présenté sous forme d'un article soumis pour publication dans le journal *Plos One* (Bobowski et al., 2012).

RESULTATS

ARTICLE 1:

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 ce premier article 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 $G_{M2/GD2}$ 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 l'activation de c-Met et 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.

Article 1

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

Aurélie Cazet^{2,3,4,†}, Marie Bobowski^{2,3,4,†}, Yoann Rombouts^{2,3,4}, Jonathan Lefebvre^{2,5}, Agata Steenackers^{2,3,4}, Iuliana Popa⁶, Yann Guérardel^{2,3,4}, Xuefen Le Bourhis^{2,7}, David Tulasne^{2,5}, and Philippe Delannoy^{1,2,3,4}

²Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France; ³USTL, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France; ⁴Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576, University of Sciences and Technologies of Lille, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France; ⁵CNRS, UMR 8161, Institut de Biologie de Lille - Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France; ⁶UMR CNRS 8612, Faculté de Pharmacie, Université Paris XI, F-92290 Chatenay-Malabry, France; and ⁷USTL, INSERM U908, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

Received on April 27, 2011; revised on January 27, 2012; accepted on January 28, 2012

We have recently established and characterized cellular clones deriving from MDA-MB-231 breast cancer cells that express the human G_{D3} synthase (GD3S), the enzyme that controls the biosynthesis of b- and c-series gangliosides. The GD3S positive clones show a proliferative phenotype in the absence of serum or growth factors and an increased tumor growth in severe immunodeficient mice. This phenotype results from the constitutive activation of the receptor tyrosine kinase c-Met in spite of the absence of ligand and subsequent activation of mitogenactivated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositide 3-kinase/Akt pathways. Here, we show by mass spectrometry analysis of total glycosphingolipids that G_{D3} and G_{D2} are the main gangliosides expressed by the GD3S positive clones. Moreover, GD2 colocalized with c-Met at the plasma membrane and small interfering RNA silencing of the G_{M2}/G_{D2} synthase efficiently reduced the expression of G_{D2} as well as c-Met phosphorylation and reversed the proliferative phenotype. Competition assays using anti-G_{D2} monoclonal antibodies also inhibit proliferation and c-Met phosphorylation of GD3S positive clones in serum-free conditions. Altogether, these results demonstrate the involvement of the disialoganglioside G_{D2} in MDA-MB-231 cell proliferation via the constitutive activation of c-Met. The accumulation of G_{D2}

¹To whom correspondence should be addressed: Tel: +33-320-43-69-23; Fax: +33-320-43-65-55; e-mail: philippe.delannoy@univ-lille1.fr

[†]The first two authors have equally participated to this work.

in c-Met expressing cells could therefore reinforce the tumorigenicity and aggressiveness of breast cancer tumors.

Keywords: breast cancer / c-Met / cell proliferation / G_{D2} ganglioside / G_{D3} synthase

Introduction

Gangliosides are glycosphingolipids (GSLs) 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 2008).

GSLs from ganglio-series are classified into four series according to the presence of 0-3 sialic acid residues linked to lactosylceramide (LacCer). The transfer of sialic acid is catalyzed in the Golgi apparatus by specific sialyltransferases [G_{M3} synthase (ST3Gal V), G_{D3} synthase (GD3S) and G_{T3} synthase (ST8Sia V), respectively] that show high specificity toward their glycolipid substrates (Zeng and Yu 2008). LacCer, G_{M3} , G_{D3} and G_{T3} are therefore the precursors for 0-, a-, b- and c-series gangliosides (Figure 1), and the biosynthesis of these compounds determines the relative proportion of gangliosides in each series (Figure 1). Afterwards, further monosaccharides, including N-acetylgalactosamine (GalNAc), galactose (Gal) and sialic acid (N-acetylneuraminic 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, ST8Sia I (GD3S), ST8Sia V or the β 4GalNAc T1 (G_{M2}/G_{D2} synthase).

Normal human tissues mainly express a-series gangliosides (Figure 1), whereas complex gangliosides from b- and c-series are essentially found in developing tissues, during embryogenesis, and mainly restricted to the nervous system in healthy adults (Yamashita et al. 1999). In mammals, the expression of b- and c-series gangliosides increases in pathological conditions including atherosclerosis, neurodegenerative disorders and cancer (Prokazova and Bergelson 1994; Birklé et al. 2003; Ariga et al. 2008). In this context, G_{D3} and G_{D2}



Fig. 1. Biosynthesis of gangliosides. The action of ST3Gal V (G_{M3} synthase), ST8Sia I (G_{D3} synthase) and ST8Sia V (G_{T3} synthase) leads to the biosynthesis of the precursors of a-, b- and c-series gangliosides, respectively. The 0-series gangliosides are directly synthesized from LacCer. Elongation is performed by the sequential action of *N*-acetylgalactosaminyltransferase (β 4GalNAc T1), galactosyltransferase (β 3Gal T4) and sialyltransferases (ST3Gal I, ST3Gal II and ST8Sia V). Cer, ceramide; blue circle, Glc; yellow circle, Gal; yellow square, GalNAc; pink diamond, Neu5Ac.

have been revealed as tumor-associated carbohydrate antigens in neuroectoderm-derived tumors such as melanoma, neuroblastoma and glioblastoma (Furukawa et al. 2006).

It has been 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 also 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, the molecular functions of individual gangliosides in tumor progression and aggressiveness remain elusive. One mechanism by which gangliosides may exert their effects on proliferation is through the modulation of tyrosine kinase receptor (RTK) activation. For example, GD3S expression in rat pheochromocytoma PC12 cells leads to the cell surface accumulation of G_{D1b} and G_{T1b} , resulting in continuous neurotrophin receptor TrkA activation, enhancing cell growth without nerve growth factor binding (Fukumoto et al. 2000). In A431 human epidermoid carcinoma cells, the activation of epithelial growth factor RTK (EGFR) is inhibited by G_{M3} through direct carbohydrate–carbohydrate interactions between G_{M3} and terminal GlcNAc residue on EGFR (Yoon et al. 2006; Kawashima et al. 2009).

In normal breast tissues, complex gangliosides are absent or expressed at 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). Clinical studies have also shown that *ST8SIA1*, the gene encoding the GD3S, 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 a 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 the absence of serum or exogenous growth factors (Cazet et al. 2009). The proliferative capacities of MDA-MB-231 GD3S⁺ clones in serum-free conditions directly proceed from the constitutive activation of the c-Met receptor (Peschard and Park 2007) and downstream mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular signalregulated kinase (ERK) and phosphoinositide-3 kinase (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 combined immunodeficiency mice. Finally, micro-array analysis has shown a higher expression of ST8SIA1 and MET in the basal-like subtype (Sorlie et al. 2003) of human breast tumors (Cazet et al. 2010).

In the present study, we show that G_{D3} and G_{D2} are the main gangliosides 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 the absence of the ligand hepatocyte growth factor (HGF)/scatter factor, probably through specific interaction between the c-Met receptor and the oligosaccharide moiety of G_{D2} .

Results

Ganglioside contents of GD3S⁺ MDA-MB-231 cells

To precisely establish the ganglioside profile of GD3S⁺ MDA-MB-231 cells, we analyzed the composition of GSL by MALDI-TOF mass spectrometry after permethylation (Figure 2, Table I). Two ceramide isoforms are commonly expressed in human tissues due to the substitution of the sphingosine moiety by palmitic acid C16:0 or lignoceric acid C24:0 (Figure 2, Table I). As expected, wild-type or empty vector-transfected MDA-MB-231 (control) cells only expressed a-series gangliosides, mainly G_{M3} and G_{M2} (Figure 2A and B). HPTLC analysis confirmed that wild-type MDA-MB-231 cells only expressed a-series gangliosides, mainly $G_{\rm M3}$ and $G_{\rm M2},~G_{\rm M1}$ being expressed at a low level (Figure 3, lanes A5 and B5). Glucosylceramide and LacCer were also detected, as well as globo-series GSLs Gb3 and Gb4. On the other hand, both $GD3S^+$ 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). G_{D3} and G_{D2} represent the most predominant complex gangliosides, whereas lower amount of G_{D1b}, G_{T3} and G_{T2} were detected (Figure 2C and D). These results fit well with the high expression of the β4GalNAc T1 in MDA-MB-231 cells, as previously shown by QPCR (Cazet et al. 2009). In parallel, G_{M3} and G_{M2} expression levels were reduced in MDA-MB-231 GD3S⁺ cells compared with control cells. Similarly, HPTLC analysis confirmed that both GD3S⁺ clones mainly expressed G_{D3} and G_{D2} (Figure 3, lanes A4 and B4). Moreover, immunostaining using the A2B5 mAb allows also to detect G_{T3} and G_{T2} in $GD3S^+$ clones, which cannot be distinguished from G_{D1b} and G_{T1b} on the resorcinol stained HPTLC plate (Figure 3, lane B6). The structures of individual GSLs were confirmed by mass spectrometry fragmentation analyses by MALDI-TOF/TOF (data not shown). Finally, we were able to show by immunocytochemistry and confocal microscopy the colocalization of G_{D2} and c-Met at the plasma membrane of $GD3S^+$ clones (Figure 4).

SiRNA inhibition of β 4GalNAc T1 expression strongly reduces c-Met activation and reverses the proliferative phenotype of GD3S⁺ cells

In order to determine the role of G_{D2} in the activation of c-Met and proliferative phenotype, the G_{M2}/G_{D2} synthase (β 4GalNAc T1) expression was inhibited in GD3S⁺ 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_{M2}/G_{D2} synthase resulted in 90, 87 and 90% decreases of relative β4GalNAc T1 mRNA expression in MDA-MB-231 control, clone 4 and clone 11, respectively (Figure 5A). In parallel, siRNA efficiently reduced the expression of G_{D2} in the both clones, whereas G_{D3} and G_{T3} expression were increased (Figure 5B). As shown in Figure 6A, silencing of G_{M2}/G_{D2} synthase decreased proliferation of both GD3S⁺ clones during the first 3 days of culture, demonstrating the involvement of GalNAc-substituted complex gangliosides, mainly G_{D2}, in GD3S⁺ cells proliferation in deprivation conditions. The phosphorylation status of 42 RTKs was simultaneously examined in MDA-MB-231 GD3S⁺ cells 24 h after transfection with corresponding siRNA using phospho-RTK arrays. As previously described (Cazet et al. 2010), GD3S⁺ MDA-MB-231 cells displayed a strong phosphorylation of the c-Met receptor (coordinates c3, c4) in control conditions (Figure 6B). The phosphorylation of EGFR (coordinates d1, d2) and of the receptor for angiopoietins Tie-2 (coordinates b1, b2) is also observed. In parallel, inhibition of G_{M2}/G_{D2} synthase expression strongly decreased the c-Met phosphorylation compared with MDA-MB-231 GD3S⁺ cells transfected with control siRNA. A similar decrease in Tie-2 (coordinates b1, b2) and a slight decrease in EGFR (coordinates d1, d2) phosphorylation were also observed (Figure 6B). Even if siRNA treatment strongly inhibited β4GalNAc T1 mRNA expression (Figure 5A), a slight activation of c-Met remained detectable on phospho-RTK arrays (Figure 6B). This could explain why the growth rate of siRNA GD3S⁺-treated cells is not completely reduced to the control level.



Fig. 2. MALDI-TOF analysis of permethylated GSLs isolated from MDA-MB-231 GD3S⁺ cells. Permethylated GSLs isolated from (**A**) wild-type MDA-MB-231, (**B**) control MDA-MB-231 transfected with empty vector, (**C**) GD3S⁺ MDA-MB-231 clone 4 and (**D**) clone 11 were analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry. Gangliosides from b- or c-series were not detected in wild-type and control cells, whereas complex gangliosides containing 2–3 sialic acid residues (i.e. G_{D3} , G_{D2} , G_{T3} , G_{T2}) were detected in MDA-MB-231 GD3S⁺ cells. Black circle, Glc; gray circle, Gal; gray square, GalNAc; dark gray diamond, Neu5Ac; ______, Ceramide either *N*-palmitoyl-sphingosine or *N*-lignoceryl-sphingosine.

Table I. Compositional assignments of	singly charged soc	liated molecular ions	$[M + Na]^+$, observ	ed in MALDI-TOF	mass spectrometry	spectra of pern	nethylated
glycolipids from MDA-MB-231 GD3S ⁺	cells						

Fatty acids	Glycolipids	Calculated mono-isotopic molecular masses	Wild type	Control	Clone 4	Clone 11
16:0	GlcCer	806.6487	806.3968	806.5892	806.6505	806.6308
24:0	GlcCer	918.7745	918.4902	918.7043	918.7890	918.7596
16:0	LacCer	1010.7485	1010.4339	1010.6812	1010.7537	1010.7374
24:0	LacCer	1122.8743	1122.5191	1122.8012	1122.8852	1122.8603
16:0	G _{b3}	1214.8483	1214.4646	1214.7607	1214.8531	1214.8289
24:0	G _{b3}	1326.9741	1326.5504	1326.8753	1326.9801	1326.9451
16:0	G _{M3}	1371.9222	1371.4816	1371.8200	1371.94.5	1371.9189
24:0	G _{M3}	1484.0480	1483.5651	1483.9274	1484.0325	1484.0151
16:0	G _{b4}	1459.9746	1459.5238	1459.8734	1459.9753	1459.9583
24:0	G _{b4}	1572.1004	1571.6016	1571.9842	1572.0918	1572.0716
16:0	G _{M2}	1617.0485	1616.5302	1616.9290	1617.0441	1617.0287
24:0	G _{M2}	1729.1743	1728.6238	1729.0503	1729.1538	1729.1384
16:0	G _{D3}	1733.0958			1733.0929	1733.0783
24:0	G _{D3}	1845.2216			1845.1859	1845.1750
16:0	G _{M1a/b}	1821.1483	1820.5616 (GM1a)	1821.0126 (GM1a)	1821.1569 (GM1b)	1821.1408 (GM1b)
24:0	G _{M1a/b}	1933.2741	1932.6440 (GM1a)	1933.1304 (GM1a)	1933.2096 (GM1b)	1933.2078 (GM1b)
16:0	G _{D2}	1978.2222			1978.2035	1978.1653
24:0	G _{D2}	2090.3480			2090.3065	2090.2845
16:0	G _{T3}	2094.2695			2294.2622	2294.2524
24:0	G _{T3}	2206.3953			2206.3362	2206.3191
16:0	G _{D1a/b}	2182.3219	2182.6238 (GD1a)	2183.1728 (GD1a)	2182.2870 (GD1b)	2182.2808 (GD1b)
24:0	G _{D1a/b}	2294.4477	2293.6881 (GD1a)	2294.2640 (GD1a)	2294.3905 (GD1b)	2294.3722 (GD1b)
16:0	G _{T2}	2339.3958			2340.3806	2340.3997
24:0	G _{T2}	2451.5216			2451.4548	2452.4352

Only masses corresponding to *N*-palmitoyl- (C16:0) or *N*-lignoceroyl- (C24:0) 2-amino-4-octadecene-1,3-diol (sphingosine) are indicated. Assignments were confirmed by mass spectrometry fragmentation of permethylated glycolipids by MALDI-TOF/TOF (data not shown). WT, non-transfected cells; control, cells transfected with empty vector; clones 4 and 11, cells transfected with human GD3S cDNA; LacCer, lactosylceramide; GlcCer, glucosylceramide; Gb, globoside.

74



Fig. 3. HPTLC analysis of gangliosides isolated from MDA-MB-231 GD3S⁺ cells. (A) HPTLC analysis of gangliosides from wild-type and GD3S⁺ MDA-MB-231 clone 4. Gangliosides were separated onto HPTLC glass plates in CHCl₃/CH₃OH/0.2% CaCl₂ (55:45:10, v/v/v) and visualized with a resorcinol/ HCl spray reagent 5 min at 150°C. Lane 1, G_{M3} and G_{D3} from human melanoma tumors; 2, total bovine brain gangliosides; 3, polysialoganglioside fraction from human melanoma tumors; 4, GD3S⁺ MDA-MB-231 clone 4; 5, wild-type MDA-MB-231 cells. (B) Immunostaining of GD3S⁺ MDA-MB-231 clone 11 with the A2B5 mAb. Left panel: visualization of gangliosides with a resorcinol/HCl spray reagent 5 min at 150°C. Right panel: visualization of gangliosides with the A2B5 mAb. Lane 1, G_{M3} and G_{D3} from human melanoma tumors; 2, total bovine brain ganglioside fraction from human melanoma tumors; 4 and 6, GD3S⁺ MDA-MB-231 clone 11; 5 and 7, wild-type MDA-MB-231 cells.



Fig. 4. Colocalization of G_{D2} and c-Met at the plasma membrane of $GD3S^+$ clones. Control and $GD3S^+$ MDA-MB-231 cells were incubated with goat AF276 anti-c-Met and mouse S220-51 anti- G_{D2} mAbs and revealed with red-fluorescent Alexa Fluor[®] 647 conjugated anti-goat IgG and green-fluorescent FITC-conjugated anti-mouse IgG. The nuclei are counterstained with Hoechst 33258. Slides were observed with a LSM 710 Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss), numerical aperture PLAN-APOCHROMAT 63× NA 1.4 with the ZEN acquisition software.

Inhibition of cell growth and c-Met activation by the anti- G_{D2} mAb

Effect of the anti- G_{D2} mAb on cell proliferation was then analyzed by adding affinity purified specific mAbs to the culture medium. The high proliferative capacity of the MDA-MB-231 GD3S⁺ was strongly decreased in the presence of the anti- G_{D2} 4G2 mAb, whereas the anti- G_{D3} 4F6 mAb has no significant effect on cell proliferation. The inhibition effect of anti- G_{D2} was dependent on the mAb concentration and became significant even at 15 µg/mL (Figure 7A). In parallel, no morphological change was observed in GD3S⁺ clones after anti- G_{D2} mAb treatment (data not shown) and the anti- G_{D2} mAb has no effect on the cellular level of G_{D2} (Supplementary data). Finally, as shown in Figure 7B, the anti- G_{D2} mAb also strongly decreased the phosphorylation of c-Met, whereas anti- G_{D3} had no effect.

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_{D2} . For example, G_{D2} 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_{D2} 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 the receptorassociated tyrosine kinase activity in glycosynaptic microdomains (Miljan and Bremer 2002; Kaucic et al. 2006). Studies



Fig. 5. SiRNA inhibition of β 4GalNAc T1 strongly reduces G_{D2} expression in GD3S⁺ cells. (A) SiRNA inhibition of β 4GalNAc T1. Control and GD3S⁺ clones were transfected with siRNA-targeting *B*4GALNACT1 or with a scramble sequence. Total RNA was reverse-transcribed and proceeded for QPCR. Relative quantification of *B*4GALNACT1 expression was performed by the method described by Livak and Schmittgen (2001) and normalized to *HPRT*. Grey bars, control siRNA; open bars, *B*4GALNACT1 siRNA. (**B**) Inhibition of G_{D2} expression. Control and GD3S⁺ clones were transfected with siRNA-targeting *B*4GALNACT1 or with a scramble sequence and incubated with anti-G_{D3} R24, anti-G_{D2} S220-51 or anti-G_{T3} A2B5 mAbs. Grey peaks, control siRNA; open peaks, *B*4GALNACT1 siRNA.

conducted over the past decade have demonstrated that a-series gangliosides inhibit c-Met signaling. G_{D1a} inhibits HGF-induced motility of cancer cells through suppression of tyrosine phosphorylation of c-Met (Hyuga et al. 2001). G_{M3} and G_{M2} can form heterodimers that specifically interact with tetraspanin family member CD82, and G_{M3}/G_{M2}/CD82 complexes inhibit c-Met activation and cross-talk with integrins, providing a basis for the control of cell proliferation and invasiveness (Todeschini et al. 2007, 2008). In parallel, we have demonstrated that the expression of GD3S and complex gangliosides in MDA-MB-231 cells lead 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). Moreover, the proliferative phenotype of GD3S⁺ cells was due to a HGF-independent activation of c-Met. Thus, c-Met is activated in the absence of HGF and 5D5 Fab, which inhibits HGF-Met association and ligand-dependent activation, does not affect Met activation (Cazet et al. 2010). The reduction in a-series ganglioside levels cannot therefore explained c-Met activation, indicating that the HGF-independent activation of c-Met in GD3S⁺ MDA-MB-231 cells is induced by b-series gangliosides. 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 and HPTLC analysis of total GSLs that G_{D2} is the main ganglioside expressed by MDA-MB-231 GD3S⁺ cells. SiRNAs silencing of the G_{M2}/G_{D2} synthase reversed the proliferative phenotype due to the strong decrease in c-Met phosphorylation. Accumulation of band c-series ganglioside precursors, 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 the c-Met axis, independently on HGF binding, leading to enhanced signaling, as observed in the basal-like subtype of breast cancer (Graveel et al. 2009; Ponzo et al. 2009).

Although the interactions between G_{D2} and c-Met remain to be demonstrated, the inhibition of cell proliferation by the anti-G_{D2} mAb clearly indicates the role of the oligosaccharide moiety of GD2 in c-Met activation. GD2-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 hand, 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 RTK activity (Todeschini et al. 2007, 2008; Park et al. 2009). Cross-communication between integrins and RTKs is thought to be required for maximal activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase (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_{D2} 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⁺ cells could be due to the formation of a tertiary complex consisting of G_{D2} , integrins and c-Met, which could contribute to the constitutive trans-phosphorylation of the receptor and reinforce the malignant properties of the cells. Eventual interactions between disialoganglioside G_{D2} and integrins should be clarified using



Fig. 6. SiRNA inhibition of β4GalNAc T1 strongly reduces c-Met activation and reverses the proliferative phenotype of GD3S⁺ cells. (**A**) Inhibition of G_{D2} expression reduces GD3S⁺ clones proliferation in serum-free conditions. One day after transfection, cells were seeded in 96-well plates and cultured during 5 days in serum-free medium as described in *Materials and Methods* section. Cell growth was analyzed by MTS assay. Counting was performed in 16 wells and data are the mean of three independent manipulations. ***P* < 0.01, GD3S⁺ vs. control. (**B**) Phospho-array analysis. Total cell lysates from control, GD3S⁺ clone 4 and clone 11, transfected with specific siRNA-targeting *B4GALNACT1* or with a 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: PDGFRα; c9, c10: PDGFRβ; c11, c12: SCFR; c13, c14: FIt-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: FGFR2α; d13, d14: FGFR3; d15, d16: FGFR4; d17, d18: Insulin R; d19, d20: IGF-I R; d21, d22: AxI; d23, d24: Dtk.

different approaches, such as co-immunoprecipitation, crosslinking and confocal microscopy, to further understand the mechanism of specific c-Met activation.

Interestingly, incubation with the anti- G_{D2} mAb seems to induce cell death of MDA-MB-231 GD3S⁺ cells after 4 days of culture in deprivation conditions (data not shown). Molecular mechanisms inducing the cell death of cancer cells by the anti- G_{D2} mAb were investigated previously. Treatment of M21 melanoma cells with the anti- G_{D2} mAb causes cell rounding and detachment from a fibronectin substrate (Cheresh and Klier 1986). Furthermore, G_{D2} -positive lung cancer cells treated with the anti- G_{D2} mAb undergo anoikis through the conformational changes of integrin molecules, subsequent FAK dephosphorylation and p38/MAPK activation (Aixinjueluo et al. 2005). The mechanism of cell death induction needs to be clarified in MDA-MB-231 GD3S⁺ cells but should provide new insights toward immunotherapy application in the drug-resistant breast cancer basal-like subtype. In conclusion, by using a cellular model that mimic the in vivo situation that could occur in the basal-like subtype of breast cancer tumors expressing the GD3S, we have demonstrated that the oligosaccharide moiety of G_{D2} specifically activates c-Met and subsequent transduction pathways, enhancing the oncogenic effect of the c-Met receptor. This underlies the need to develop such cellular models and sheds light on the effect of ganglioside expression on breast cancer cell signaling.

Material and methods

Antibodies and reagents

Anti- G_{D3} R24 monoclonal antibody (mAb; Pukel et al. 1982) was purchased from Abcam (Paris, France) and anti- G_{D2} S220-51 mAb from Seikagaku Corp. (Tokyo, Japan). Anti- G_{D3} 4F6, anti- G_{D2} 4G2 (Portoukalian et al. 1993) and anti- G_{T3} A2B5 (Dubois et al. 1990) mAbs were kindly provided by Prof. Jacques Portoukalian (Department of



Fig. 7. Inhibition of the cell growth and c-Met activation of MDA-MB-231 GD3S⁺ by the anti-G_{D2} mAb. (**A**) Cell proliferation of GD3S⁺ clones treated with 15 µg/mL of the anti-G_{D2} 4G2 mAb in serum-free conditions was determined by MTS assay after 4 days of culture. Each measure was performed in eight wells and data are the mean of three independent manipulations. **P* < 0.05. (**B**) Analysis of c-Met phosphorylation level after addition of the anti-G_{D2} mAb. MDA-MB-231 control and GD3S⁺ clones were treated for 6 h with 30 µg/mL of the 4G2 mAb and then used for an immunoblotting with a specific anti-phospho-Met or an anti-Met antibody as described in *Materials and methods* section. The anti-G_{D3} 4F6 mAb and an irrelevant mAb were used as a control.

Transplantation and Clinical Immunology, Claude Bernard University and Edouard Herriot Hospital, Lyon, France). The 4F6 and 4G2 mAbs were purified from conditioned culture media by affinity chromatography on protein G column (Sigma-Aldrich, Lyon, France), and protein concentration was determined by the Bio-Rad RC protein assay kit II (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Anti-β-actin, mouse mAb against the COOH-terminal region of human Met and rabbit polyclonal Ab against phosphorylated tyrosines 1234 and 1235 of the Met kinase domain were purchased from Cell Signaling Technology (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Goat anti-c-Met affinity purified polyclonal immunoglobulin G (IgG) AF276 was from R&D Systems Europe (Lille, France). Anti-rabbit and anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase, and fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated sheep anti-mouse IgG was purchased from GE Healthcare (Templemars, France). FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgM and Alexa Fluor® 647 chicken anti-goat IgG were purchased from Molecular Probes (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). FITC-conjugated goat anti-mouse IgG was from Sigma-Aldrich. Small interfering RNAs (siRNAs) were manufactured by Dharmacon (Thermo Scientific, Illkirch, France) and quantitative real-time

polymerase chain reaction (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). 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 U/mL of penicillin-streptomycin, at 37°C in 5% CO2. MDA-MB-231 control (empty vector transfected) and MDA-MB-231 GD3S⁺ clones 4 and 11 were obtained as previously described (Cazet et al. 2009) and cultured in the presence of 1 mg/mL of G418 (Invitrogen).

Extraction and preparation of glycolipids

Twenty dishes (10 cm diameter) of cultured cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and cells were scraped and homogenized. Cells were suspended in 200 µL of water and sonicated on ice. The resulting material was dried under vacuum and sequentially extracted by CHCl₃/ CH₃OH (2:1, v/v), CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) and CHCl₃/ CH₃OH/H₂O (1:2:0.8, v/v/v). Supernatants were pooled, dried and subjected to a mild saponification in 0.1 M NaOH in CHCl₃/CH₃OH (1:1) at 37°C for 2 h and then evaporated to drvness (Schnaar 1994). Samples were reconstituted in CH₃OH/H₂O (1:1, v/v) and applied to a C₁₈ Sep-Pak cartridge (Waters, Milford, MA) equilibrated in the same solvent system. After washing with five volumes of CH₃OH/H₂O (1:1, v/v), GSLs were eluted by two volumes of CH₃OH, two volumes of CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) and two volumes of CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v).

Mass spectrometry analysis of GSLs

Prior to mass spectrometry analysis, GSLs were permethylated according to Ciucanu and Kerek (1984). Briefly, compounds were incubated 2 h in a suspension of 200 mg/mL of NaOH in dry dimethyl sulfoxide (300 μ L) and ICH₃ (200 μ L). The methylated derivatives were extracted in CHCl₃ and washed several times with water. The reagents were evaporated and the sample was dissolved in CHCl₃ in the appropriate dilution. Mass spectrometry analysis of permethylated GSLs was performed by matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) time-of-flight (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 a tube 5 µL of diluted permethylated derivatives solution in CHCl₃ and 5 µL of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution [10 mg/mL dissolved in CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v)]. The mixtures (2 μ L) were then spotted on the target plate and air-dried.

Thin-layer chromatography analysis of gangliosides

Standard gangliosides were purified from human melanoma tumors (Portoukalian et al. 1979) and separated into two fractions, one with G_{M3} and G_{D3} and the second with the more

A Cazet et al.

complex gangliosides. Bovine brain gangliosides were from Sigma-Aldrich. The gangliosides were applied onto highperformance thin-layer chromatography (HPTLC) glass plates (WWR, Paris, France) and migrated in CHCl₃/CH₃OH/0.2% CaCl₂ (55:45:10, v/v/v). The gangliosides spots were visualized with the resorcinol/HCl spray reagent (Svennerholm 1963) 5 min at 150°C. Immunostaining was carried out using an A2B5 mAb to detect polysialogangliosides (Dubois et al. 1990). Standards and gangliosides of clone 11 were migrated on an aluminum-backed HPTLC plate in the same solvent system as above and processed as described (Portoukalian and Bouchon 1986).

Immunofluorescence staining

MDA-MB-231 cells were plated on glass coverslips in 6-well plates $(1.6 \times 10^4 \text{ cells/well})$. The next day, cells were washed and fixed 30 min in 4% paraformaldehyde at room temperature. After washing, cells were blocked in PBS/5% bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) for 1 h. Primary antibodies (goat anti-c-Met AF276, mouse anti-G_{D2} S220-51 or both) were incubated for 1 h. The cells were washed with PBS and incubated 1 h with a combination of secondary antibodies (red-fluorescent Alexa Fluor® 647-conjugated antigoat IgG and green-fluorescent FITC-conjugated anti-mouse IgG). Cells were then washed with PBS and the nuclei counterstained with Hoechst 33258. Coverslips were mounted with Glycergel mounting medium (Dako, Carpenteria, CA). Fluorescence was examined in oil immersion at 21°C. For confocal fluorescence microscopy, slides were observed in an LSM 710 Laser Scanning Microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY), numerical aperture PLAN-APOCHROMAT $63 \times$ NA 1.4 with the ZEN acquisition software.

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) 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 24 h later for QPCR, cell growth and phospho-array assays, and 48 h later for flow cytometry analysis.

Reverse transcription and QPCR

Total RNA was extracted using the Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) according to the protocol provided by the manufacturer. Total RNA (1 μ g) was reverse transcribed using first-strand cDNA synthesis kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). 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 described previously (Cazet et al. 2009). QPCRs (25 μ L) were performed using 2× SYBR® Green Universal QPCR Master Mix (Stratagene) with 2 μ L of 1:5 cDNA dilution and 300 nM final

concentration of each primer. QPCR conditions were as follows: 95°C for 30 s, 51°C for 45 s, 72°C for 30 s (40 cycles). Quantification was performed by the 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 *B4GALNACT1* transcripts were normalized to *HPRT* expression. Assays were performed in triplicate and QPCR amplification was repeated three 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 4 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in PBS and incubated for 1 h at 4°C with antigangliosides mAbs: anti- G_{D3} R24 (1:100), anti- G_{D2} S220-51 (1:75) and anti- G_{T3} A2B5 (1:10), diluted in PBS containing 0.5% BSA. 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 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] reagent (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's procedure. For RNA interference assay, 2×10^3 cells were seeded in 96-well plates (Thermo Fisher Scientifics, 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 to the wells 2 h before spectrophotometric reading (absorbance at 490 nm).

For cell growth inhibition assay, transfectant cells and control cells (2.5×10^3) were seeded in 96-well plates and grown in DMEM culture medium containing 0.1% FBS. After 12 h, the medium was replaced and cells were treated for 4 days with the anti-G_{D2} 4G2 mAb, anti-G_{D3} 4F6 mAb or with an irrelevant mAb diluted to the indicated concentrations.

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) 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 μ g 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).

Immunoblotting

Transfectant cells and control cells (3×10^5) were seeded in 6-well plates and grown in DMEM containing 0.1% FBS. The next day, the medium was replaced and cells were treated for 6 h with 30 μ g/mL of the anti-G_{D2} 4G2 mAb, anti-G_{D3} 4F6 mAb or with an irrelevant mAb as a control. Cells were harvested by scraping in PBS and subjected to centrifugation $(10,000 \times g, 10 \text{ min})$. The pellets were then resuspended in lysis buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, 15% glycerol, 0.1% Triton X-100, protease inhibitor tablet (Roche) and phosphatase inhibitor cocktails 2 and 3 (Sigma-Aldrich)]. The supernatants were assessed for protein concentration using the Bio-Rad RC protein assay kit II. For the phospho-Met and Met detection, 30 µg of total proteins from each cell lysate was subjected to sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto a polyvinylidene fluoride membrane (Millipore, Molsheim, France). 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. Analysis was done by chemiluminescence using the ECL-Plus western blotting detection reagent (GE Healthcare) with Kodak film.

Statistical analyses

Student's *t*-test was used for statistical analysis. P < 0.05 was considered as statistically significant.

Supplementary data

Supplementary data for this article is available online at http://glycob.oxfordjournals.org/.

Funding

This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer (7936 and 5023 to P.D. and 1137 to D.T.), la Ligue régionale contre le Cancer (P.D. and D.T.) and l'ANR—Young investigator program (D.T.).

Acknowledgements

We thank the BioImaging Center Lille Nord-de-France (BICeL) for access to instruments and technical advice (microscopy facilities).

Conflict of interest

None declared.

Abbreviations

 β 4GalNAc T1, G_{M2}/G_{D2} synthase; BSA, bovine serum albumin; c-Met, tyrosine kinase receptor for hepatocyte growth factor; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGFR, epithelial growth factor

tyrosine kinase receptor; ER, estrogen receptor; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FAK, focal adhesion kinase; FBS, fetal bovine serum; FITC, fluorescein isothiocyanate; Gal, galactose; GalNAc, N-acetylgalactosamine; GD3S, G_{D3} synthase; GSL, glycosphingolipid; HGF, hepatocyte growth factor; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyltransferase; HPTLC, highperformance thin-layer chromatography; IgG, immunoglobulin G; LacCer, lactosylceramide; mAb, monoclonal antibody; MALDI, matrix-assisted laser desorption-ionization; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, mitogen-activated protein kinase/ERK kinase; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; Neu5Ac, N-acetylneuraminic acid; PBS, phosphate-buffered saline; PI3K, phosphoinositide-3 kinase; PR, progesterone receptor; QPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; RTK, tyrosine kinase receptor; SCLC, small cell lung cancer; siRNA, small interfering RNA; ST3Gal V, G_{M3} synthase; ST8Sia I, G_{D3} synthase; ST8Sia V, G_{T3} synthase; TOF, time-of-flight.

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. 280:29828–29836.
- Ariga T, McDonald MP, Yu RK. 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 RK, Aubry J. 2003. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie*. 85:455–463.
- 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. GD3 synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation. *Mol Cancer Res.* 8:1526–1535.
- 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.
- 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.* 102:1887–1897.
- 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*. 102:688–696.
- Ciucanu I, Kerek F. 1984. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydr Res.* 131:209–217.
- 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. 265:2797–2803.
- 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, Hamamura K, Aixinjueluo W, Furukawa K. 2006. Biosignals modulated by tumor-associated carbohydrate antigens: Novel targets for cancer therapy. *Ann NY Acad Sci.* 1086:185–198.
- Graveel CR, DeGroot JD, Su Y, Koeman J, Dykema K, Leung S, Snider J, Davies SR, Swiatek PJ, Cottingham S, et al. 2009. Met induces diverse mammary carcinomas in mice and is associated with human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:12909–12914.
- Hakomori SI. 2002. Inaugural article: The glycosynapse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 99:225–232.

815

- 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.
- 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.
- 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.
- 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*. 25:402–408.
- Lo AS, Ma Q, Liu DL, Junghans RP. 2010. Anti-GD3 chimeric sFv-CD28/ T-cell receptor ζ designer T cells for treatment of metastatic melanoma and other neuroectodermal tumors. *Clin Cancer Res.* 16:2769–2780.
- 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.* 56:5165–5171.
- Miljan EA, Bremer EG. 2002. Regulation of growth factor receptors by gangliosides. Sci STKE. 160:re15.
- Navid F, Santana VM, Barfield RC. 2010. Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. *Curr Cancer Drug Targets*. 10:200–209.
- 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.* 344:1479–1486.
- Peschard P, Park M. 2007. From Tpr-Met to Met, tumorigenesis and tubes. Oncogene. 26:1276–1285.
- Ponzo MG, Lesurf R, Petkiewicz S, O'Malley FP, Pinnaduwage D, Andrulis IL, Bull SB, Chughtai N, Zuo D, Souleimanova M, et al. 2009. Met induces mammary tumors with diverse histologies and is associated with poor outcome and human basal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:12903–12908.
- Portoukalian J, Bouchon B. 1986. Hydrolysis of all gangliosides, including GM1 and GM2, on thin-layer plates by *Vibrio cholerae* neuraminidase. *J Chromatogr.* 380:386–392.
- Portoukalian J, David MJ, Gain P, Richard M. 1993. Shedding of GD2 ganglioside in patients with retinoblastoma. *Int J Cancer*. 53:948–951.
- 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.
- Prokazova NV, Bergelson LD. 1994. Gangliosides and atherosclerosis. *Lipids*. 29:1–5.
- Pukel CS, Lloyd KO, Travassos LR, Dippold WG, Oettgen HF, Old LJ. 1982. GD3, a prominent ganglioside of human melanoma. Detection and characterisation by mouse monoclonal antibody. J Exp Med. 155:1133–1147.
- 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.
- 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.

- Ruckhäberle E, Rody A, Engels K, Gaetje R, von Minckwitz G, Schiffmann 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.
- Schnaar RL. 1994. Isolation of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* 230:348–370.
- Scott AM, Liu Z, Murone C, Johns TG, MacGregor D, Smyth FE, Lee FT, Cebon J, Davis ID, Hopkins W, et al. 2005. Immunological effects of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immun*. 22:3–15.
- Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, et al. 2003. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:8418–8423.
- Svennerholm L. 1963. Chromatographic separation of brain gangliosides. *J Neurochem.* 10:613–623.
- Tettamanti G. 2004. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: New concepts. *Glycoconj J.* 20:301–317.
- 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.* 282:8123–8133.
- Todeschini AR, Dos Santos JN, Handa K, Hakomori SI. 2008. Ganglioside GM2/GM3 complex affixed on silica nanospheres strongly inhibits cell motility through CD82/cMet-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105:1925–1930.
- Todeschini AR, Hakomori SI. 2008. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. *Biochim Biophys Acta*. 1780:421–433.
- 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. 276:44504–44511.
- Wang XQ, Sun P, Paller AS. 2002. Ganglioside modulation regulates epithelial cell adhesion and spreading via ganglioside-specific effects on signaling. J Biol Chem. 277:40410–40419.
- 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 USA*. 96:9142–9147.
- 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 USA. 103:18987–18991.
- 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.
- Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, et al. 2010. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. N Engl J Med. 363:1324–1334.
- 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.
- Zeng G, Yu RK. 2008. Cloning and transcriptional regulation of genes responsible for synthesis of gangliosides. *Curr Drug Targets*. 9:317–324.

ARTICLE 2:

ESTRADIOL REPRESSES THE EXPRESSION OF THE G_{D3} SYNTHASE GENE ST8SIA1 IN BREAST CANCER

Ce deuxième article présente l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène *ST8SIA1* dans les cellules de cancer du sein. Nous avons d'abord identifié le transcrit principal exprimé dans les tumeurs de sein. Pour la première fois, nous avons caractérisé le promoteur core, essentiel à la transcription de *ST8SIA1* dans les cellules de cancer du sein Hs578T. Nous avons montré que l'activité du promoteur core est réprimée par l'œstradiol dans les cellules HS578T transfectées par ERa. De plus, l'œstradiol réprime l'expression endogène des ARNm de la GD3S dans les cellules de cancer du sein exprimant le récepteur ERa. Cependant, nous avons montré que deux éléments de réponse aux oestrogènes putatifs (ERE) détectés sur le promoteur core ne sont pas impliqués dans la répression de *ST8SIA1* par l'œstradiol, suggérant un mécanisme indirect, par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription.

Estradiol represses the expression of the G_{D3} synthase gene ST8SIA1 in breast cancer.

Marie Bobowski^{1,2,3}, Agata Steenackers^{1,2,3}, Florent Colomb^{1,2,3}, Sylvain Julien^{1,2,3} and Philippe Delannoy^{1,2,3*}

¹ Univ. Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

² USTL, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

³ CNRS, UMR 8576, 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: <u>philippe.delannoy@univ-lille1.fr</u>

Abstract

Recent data have underlined a possible role of G_{D3} synthase (GD3S) and complex gangliosides in Estrogen Receptor (ER) negative breast cancer progression. Here, we describe the main transcript of GD3S coding gene *ST8SIA1*, expressed in breast tumours. We characterized the corresponding core promoter in Hs578T breast cancer cells and showed that estradiol decreases *ST8SIA1* mRNA expression in ER-positive MCF-7 cells and ER α -transfected ER-negative Hs578T cells. The activity of the core promoter sequence of *ST8SIA1* is also repressed by estradiol. This core promoter contains two putative Estrogen Response Elements (ERE) that were not found to be involved in the promoter activity. Our results suggest an indirect effect of estradiol on *ST8SIA1* expression involving other signalling pathways.

Abbreviations

5'-RACE, 5' Rapid Amplification of cDNA Ends; c-Met, tyrosine kinase receptor for hepatocyte growth factor; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; ER, Estrogen Receptor; ERα, Estrogen Receptor alpha; ERE, Estrogen Response Element; GD3S, GD3 synthase; GSL, glyco-sphingolipid; HPRT, Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase; IDC, Invasive Ductal breast Carcinoma; PBS, Phosphate Buffered Saline; QPCR, Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction; RPLP0, Ribosomal Protein Large P0; TAM, Tamoxifen; TSS, transcription start sites; UTR, Untranslated Region.

Introduction

Gangliosides are glycosphingolipids carrying one or several sialic acid residues, and are essential compounds of the plasma membrane, by exposing their glycan moiety to the extracellular domain. They are enriched together with other phospholipids and cholesterol in lipid microdomains named "glycosynapses", where they can modulate cell signalling, leading to changes in cellular phenotype (Hakomori Si, 2002; Regina Todeschini and Hakomori, 2008). Glycosphingolipids from ganglio-series represent the main class of gangliosides and are usually classified in four series according to the presence of 0 to 3 sialic acid residues linked to lactosylceramide (Svennerholm, 1980; Tettamanti, 2004) (Fig. 1).

Whereas normal tissues usually expressed 0- and a-series gangliosides, complex gangliosides from b- and c-series are mostly expressed during embryogenesis and in the central nervous sys-

tem in healthy adults, where they play a key role in cell-cell interaction, differentiation and growth (Yamashita et al., 1999; Yu et al., 2012). In parallel, complex gangliosides such as G_{D3} , G_{T3} or G_{D2} have been shown to be over-expressed in human tumours of neuroectoderm origin such as melanoma, glioblastoma and neuroblastoma (Saito et al., 1985; Furukawa et al., 2006; Oblinger et al., 2006). They play a functional role in tumour growth and metastasis by mediating cell proliferation, migration, adhesion and angiogenesis (Birklé et al., 2003). Complex gangliosides have also been used as target molecules for cancer immunotherapy, such as G_{D3} in melanoma (Chapman et al., 2004; Lo et al., 2010) and G_{D2} in neuroblastoma (Navid et al., 2010; Yu et al., 2010).

In normal breast tissues, complex gangliosides are absent or expressed at 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 (IDC) (Marquina et al., 1996). Clinical studies have also shown that high expression of *ST8SIA1*, the gene coding the G_{D3} synthase (GD3S), is associated with Estrogen Receptor (ER) negativity and high histological grade of breast tumours (Ruckhäberle et al., 2008, 2009). The GD3S is the only α 2,8-sialyltransferase that synthesizes the disialoganglioside G_{D3} from its precursor G_{M3} (Nakayama et al., 1996; Nara et al., 1996) (Fig. 1). GD3S is therefore the key enzyme controlling the biosynthesis of complex gangliosides from b- and c- series.

In order to determine the role of complex gangliosides in breast cancer progression, we have previously induced GD3S over-expression in ER negative MDA-MB-231 breast cancer cell line (Cazet et al., 2009). The resulting cellular model, MDA-MB-231 GD3S+, displayed a proliferative phenotype in absence of exogenous growth factor. This proliferative capacity of MDA-MB-231 GD3S+ clones directly proceeded from the constitutive activation of c-Met Tyrosine Kinase Receptor (Cazet, Lefebvre, et al., 2010) and we recently showed that the ligand-independent activation of c-Met was due to the expression of G_{D2} ganglioside (Fig. 1) at the cell surface of GD3S+ clones (Cazet et al., 2012). Altogether, these data strongly suggest a possible role of GD3S and complex gangliosides in ER negative breast cancer progression. Moreover, high G_{D2} expression was recently detected in breast cancer stem cells that was shown to be critical for mammosphere formation and tumour initiation (Battula et al., 2012). Notably, the authors showed that GD3S but not G_{M2}/G_{D2} synthase (Fig. 1) correlated with G_{D2} expression and GD3S knockdown reduced cancer stem cells properties and tumor formation.

To elucidate the molecular mechanisms leading to over-expression of GD3S in breast cancer, we have undertaken the study of the transcriptional regulation of the GD3S coding gene, *ST8SIA1*, in breast cancer cells. *ST8SIA1* is located on chromosome 12, in p12.1-p11.2 locus and consists in five coding exons spanning over 135 kbp (Furukawa et al., 2003). Several reports have described the 5'-untranslated region (5'-UTR) of *ST8SIA1* in melanoma (Furukawa et al., 2003; Kang et al., 2007), glioblastoma (Dae et al., 2009) and neuroblastoma (Kwon et al., 2009) cell lines, showing a unique transcript with transcription start sites (TSS) located 400 to 650 pb upstream the initiation codon on the first exon . In this study, we described the main *ST8SIA1* transcript expressed in breast cancer tumours and cell lines and we characterized the core promoter of this gene. We also showed that estradiol repressed endogenous *ST8SIA1* mRNA expression as well as *ST8SIA1* core promoter activity in two breast cancer cell lines expressing Estrogen Receptor alpha (ER α).



Figure 1: Simplified representation of gangliosides biosynthesis. Gangliosides are synthesized from lactosylceramide (LacCer) by the stepwise action of sialyltransferases ST3Gal V (G_{M3} synthase), ST8Sia I (G_{D3} synthase) and ST8Sia V (G_{M3} synthase), leading to the precursors of a-, b-, c- series gangliosides, respectively. The 0-series is directly synthesized from LacCer. Cer: Ceramide, Glc: Glucose, Gal: Galactose, Neu5Ac: N-acetyl-neuraminic acid (sialic acid), Gal-NAc: N-acetylgalactosamine. Over-expression of ST8Sia I (as it is the case in ER negative breast tumours) leads to the expression of complex gangliosides from b- and c- series.

Material and Methods

Breast cancer tumour collection - 20 tissue samples of IDC with ER negative status (numbered 132 to 152) were provided by the Guy's and St Thomas's NHS foundation, Guy's Hospital, London, United Kingdom. The NHS Research Ethics Committee (REC) approved the use of these tissues (ref: 07/H0804/131; HTA licence ref: 12121).

Cell culture - The human breast cancer cell line Hs578T (Hackett et al., 1977) was kindly provided by Dr Van Slambrouck (New Mexico Institute of Mining and Technology, NM, USA). The human breast cancer cell line MCF-7 was obtained by the ATCC (Rockville, MD, USA). Both cell lines were routinely grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with 4.5 g/L glucose, Ultraglutamine 1 supplemented with 10 % fetal calf serum and 100 μ g/mL penicillin-streptomycin (Lonza, Verviers, Belgium), at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. When necessary, cells were grown for 48h in DMEM without phenol-red containing 10% charcoal-stripped serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) before treatment for 24h with 17- β -estradiol (Sigma Aldrich, Lyon, France) and/or tamoxifen (Sigma) or ethanol as vehicle.

5'-RACE - The 5'-RACE system for Rapid Amplification of cDNA ends (Invitrogen) was used according to the protocol provided by the manufacturer. Initial reverse transcription was performed with the RT primer (annealing to the *ST8SIA1* sequence) using 4 μg of total RNA. After synthesis of the first strand cDNA, nested PCR was performed using Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen). GSP1/Anchor primer and GSP2/AUAP primer pairs were used for first and second PCR, respectively. PCR products were size-separated by Agarose gel electrophoresis, subcloned into pCR2.1- TOPO vector (Invitrogen) and sequenced by Genoscreen (Lille, France).

Plasmids construction and mutagenesis - *ESR1* open reading frame was amplified from MCF-7 cells cDNA with the primer pair ER α Nhe1 and ER α Kpn1 (Table 1). The PCR product was digested by Nhe1 and Kpn1 and cloned into the pcDNA3.1 expression vector (Invitrogen). The resulting plasmid was designed pcDNA-ER α .

Genomic DNA of Hs578T cells was prepared with Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following manufacturer's instructions. The genomic sequence located between -2307 bp and the ATG site was amplified by PCR using the primer pair P1Nhe1 and P2Xho1 (Table 1). The PCR product was cloned into the pCR2.1- TOPO vector (Invitrogen). The promoter sequence was then isolated by digestion of the vector using Nhe1 and Xho1 restriction sites. The purified fragment was sub-cloned into pGL3-Enhancer vector (Promega, Madison, USA) upstream of the firefly luciferase gene at Nhe1/Xho1 sites. The resulting plasmid was designed pGL3(-2307/+1). Truncated promoter constructions were generated by enzymatic digestions, ends blunting and ligation (Table 2). All plasmid constructions were sequenced to ensure the absence of mutation (Genoscreen, Lille, France)

Mutations with base substitutions at ERE binding sites on pGL3(-923/-565) were obtained using a Quick Change mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the manufacturer's protocol, using the oligonucleotide primers shown in Table 1. The plasmid mutations were verified by sequence analysis.

RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative PCR - Total RNA from tumour samples or breast cancer cells was extracted using the Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel). RNA quality was checked using the Agilent Bioanalyser 2100 (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Total RNA was reverse transcribed using Affinity script QPCR cDNA Synthesis kit (Agilent) according to the protocol provided by the manufacturer.

<u>Table 1</u>: Primers used for 5'-RACE, QPCR and plasmid constructions. Restriction site sequences inserted for cloning are underlined and the mutated nucleotides in primers used for site directed mutagenesis are in bold

Primer	Sequence
RT primer ¹	5'-CACAGCCACTCTTCTT-3'
GSP1 ¹	5'-CACCATTTCCCACCACCGCGATT-3'
GSP2 ¹	5'-TTGCCTGTGGGAAGAGAGAGAGTAAGTTG-3'
Anchor primer ²	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG-3'
AUAP ²	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'
GD3SE4-E5 forward ³	5'-TCCCAGCATAATTCGGCAAAGGTT-3'
GD3SE4-E5 reverse ³	5'-ACCCTCAAAGATGGCTCTGTTCCT-3'
GD3SE1-E2 forward ³	5'-AACGAGAAAGAGATCGTGCAG-3'
GD3SE1-E2 reverse ³	5'-CCGTCATACCACATGCTCTTC-3'
PS2 forward ³	5'-TAGACACTTCTGCAGGGATCTG-3'
PS2 reverse ³	5'-GCAGTCAATCTGTGTGTGAGC-3'
RPLP0 forward ³	5'-GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT-3'
RPLP0 reverse ³	5'-GATGACCAGCCCAAAGGAGA-3'
HPRT forward ³	5'-GCCAGACTTTGTTGGATTTG-3'
HPRT reverse ³	5'-CTCTCATCTTAGGCTTTGTATTTTG-3'
P1Nhe1 forward ³	5'-CTCCCT <u>GCTAGC</u> TTTGCAGAAGAAAGAAAACAGC-3'
P2Xho1 <i>reverse</i> ³	5'-CAAATT <u>CTCGAG</u> CCCTCTGGACGTTTGTCG-3'
ERαNhe1 forward ³	5'-GG <u>GCTAGC</u> CCATGACCATGACCCTCCA-3'
ERαKpn1 reverse ³	5'-GG <u>GGTACC</u> ATGCAGCAGGGATTATCTGA-3'
muERE1 forward ⁴	5'- TGTCTGCCGTTATCTCCAAAGAACA TA GGCACGAGTGAGG-3'
muERE1 reverse ⁴	5'- CCTCACTCGTGCC TA TGTTCTTTGGAGATAACGGCAGACA-3'
muERE2 forward ⁴	5'-GGAGGGAGGGGGGAGACC AA GATTTCCACCAATCCC-3'
muERE2 reverse 4	5'- GGGATTGGTGGAAATC TT GGTCTCCCCCCCCCC-3'

¹ Previously used by Kang *et al.* [17]

² Provided by Invitrogen

³ Designed using the NCBI primer design software (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)

⁴ Designed using the QuickChange primer design software (http://labtools.stratagene.com/QC)

Table 2: Reporter plasmid constructions					
Digestion	Position	Vector name			
Nhel, Xhol	-2307/+1	pGL3(-2307/+1)			
Alel, Xhol	-1779/+1	pGL3(-1779/+1)			
HindIII, Xhol	-1419/+1	pGL3(-1419/+1)			
SacII, Xhol	-1117/+1	pGL3(-1117/+1)			
AlwNI, Xhol	-923/+1	pGL3(-923/+1)			
Bstxl, Xhol	-565/+1	pGL3(-565/+1)			
Fspl, Xhol	-335/+1	pGL3(-335/+1)			
Nhel, Bstxl	-2307/-565	pGL3(-2307/-565)			
Alel, Bstxl	-1779/-565	pGL3(-1779/-565)			
HindIII, Xho1	-1419/-565	pGL3(-1419/-565)			
SacII, Xho1	-1117/-565	pGL3(-1117/-565)			
AlwNI, Bstx	-923/-565	pGL3(-923/-565)			

Table 2: Penerter placmid constructions

Primer sequences (Eurogentec, Seraing, Belgium) used for the PCR reactions are given in Table 1. QPCR was performed using the Mx3005p Quantitative System (Stratagene) as previously described (Cazet et al., 2009). Briefly, 40 cycles were performed according to the following program (94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s, and extension at 72 °C for 30 s). The analysis of amplification was performed using the Mx3005p software. For each primer pair, the specificity of the amplification was checked by recording the dissociation curves, visualizing the amplified products in Agarose-gel electrophoresis and sequencing of the products. HPRT or RPLP0 genes were used to normalize the expression of transcripts of interest. Relative quantification was performed using the method described by Pfaffl, that takes in account the efficiency of each sequence amplification (Pfaffl, 2001).

Bioinformatic analysis – In silico analysis of the promoter was performed with BLAST analysis of the human genome of the NCBI database. Multiple sequence alignments were performed with the Multalin program (http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html). The core promoter sequence was analyzed with Matinspector 8.0 (www.genomatix.de) using TRANSAC matrices 8.4 (Quandt et al., 1995).

Transient transfection and luciferase assay-Hs578T cells (80% confluency) were transfected using lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, with 1.5 µg of pGL3 construction and 20 ng of control Renilla plasmid in UltraMEM medium (Invitrogen). When necessary, 2 µg of pcDNA-ERa were added to the transfection mix. After 6 h, the medium was replaced by fresh culture medium containing 10% FCS and further incubated for 48h. Cells were then washed with PBS, lysed with Passive Lysis Buffer (PLB, Dual Luciferase Reporter Assay System, Promega, Madison, USA) and 20 µL of lysate were used for luciferase Reporter Assay System. Luminescence was measured with the Centro luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

Results

Identification of human GD3S transcripts in breast cancer cells - The 5'-UTR of ST8SIA1 transcripts was analyzed in Hs578T cell line (expressing ST8SIA1 at higher level than others tested breast cancer cell lines) and 20 tumour samples of ER negative IDC. The 5'-UTR of ST8SIA1 transcripts were previously reported in melanoma, glioblastoma and neuroblastoma cell lines, showing a unique transcript, called T1, with several TSS within the first exon E1, from -400 to -650 bp upstream the ATG (Furukawa et al., 2003; Kang et al., 2007; Dae et al., 2009; Kwon et al., 2009). 5'-UTR amplification was performed for Hs578T cells and 3 tumour samples representative of the different levels of ST8SIA1 expression (#137, #142 and #144) by 5'-RACE as described in the Material and Methods section (Fig. 2A). The sequencing of the resulting products indicated that ST8SIA1 transcription also started within E1 exon, giving raise to T1 transcripts with different TSS between -345 and -20 bp upstream the ATG. Two minor transcripts (named T2 and T3) with alternative 5'-ends were also detected and located 34 and 150 kbp upstream E2 exon, respectively (Fig. 2B). The expression of T1 transcript was analyzed in 20 ERnegative IDC samples by QPCR and related to total ST8SIA1 expression. As shown in Fig. 2C, the total expression of ST8SIA1 was higher in tumour samples compared to Hs578T cells and T1 accounted for 50 to 100% of the total transcripts, making it the main ST8SIA1 transcript across this series of tumour samples.

Transariation factor	Core	Desition	Strond	Involvement in breast concer
Transcription factor	sequence	Position	Strand	Involvement in breast cancer
WT1 (Wilm's tumor 1)	CGGG TGGG AGGG	-914/-898 -793/-777 -783/-767	+ -	Involved in proliferation and differentiation (Caldon et al., 2008). Over-expressed in ER negative tumors (Han et al., 2008)
с-Муb	CAAC TAAC	-906/-892 -693/-679	- +	Oncogene. Stimulates cell pro- liferation (Quintana et al., 2011)
ERE (Estrogen Re- sponse Element)	AAGG	-867/-844 -783/-760	+ -	Regulation of estrogen- responsive genes (Welboren et al., 2007)
E2F2	GCGC	-849/-833 -710/-694	+/- +/-	Regulated by estradiol (Bhat- Nakshatri et al., 2009)
KLF15 (Krüppel Like Factor 15)	GGGG	-789/773	+	Regulates estradiol-induced proliferation (Ray and Pollard, 2012)
NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells)	GGAA	-770/-752 -589/-571	+ +/-	Pro-invasive and pro-migratory (Fougère et al., 2010)
ETS-1	GGAA	-723/-703	+	Associated to invasive pheno- type (Gilles et al., 1997)

<u>Table 3</u>: Predicted transcription factors binding sites in -923/-565 core promoter and their relevance in breast cancer.



Figure 2: Identification of human GD3S transcripts in breast cancer tumours and Hs578T cells. (A) Schematic representation of the 5'-RACE strategy. First strand cDNA synthesis was performed with a *ST8SIA1* specific primer. cDNA was dC-tailed at 3'end and amplified by PCR using Anchor Primer and GSP1. Nested PCR was performed using AUAP and GSP2 primers. (B) Schematic representation of the main 5'-ends of GD3S transcripts expressed in Hs578T cells and breast cancer tumour samples (#137, #142 and #148). The size of intronic sequences between E2 and the different first exon are shown. Position of PCR primers used for specific amplification of T1 transcript is indicated by black arrows. (C) QPCR analysis of T1 transcript (grey) and total *ST8SIA1* (black) expression, related to *HPRT*, in 20 ER negative IDC samples and 2 breast cancer cell lines (Hs578T and MCF-7).

Promoter activity of the 5'-flanking region upstream the GD3S T1 transcript - To determine the core promoter sequence of the T1 transcript, the genomic sequence located between -2307 bp and the ATG site in E1 was cloned into the pGL3basic upstream the luciferase gene and named pGL3(-2307/+1). This plasmid and the 5'- or 3'-deleted constructions, were transfected into Hs578T cells for luciferase assays. The results presented in Fig. 3 showed a 2.9-fold increase of luciferase activity for the full length plasmid pGL3(-2307/+1) compared to pGL3basic used as baseline control. By comparison, all constructs lacking the -565/+1 region showed increased activities with maximal promoter activities for pGL3(-1117/-565) and pGL3(-923/-565) constructs (7.4- and 7.0-fold, respectively). In parallel, 5' truncations of various length induced decreased luciferase activity with pGL3(-565/+1) and pGL3(-335/+1) constructs showing almost no activity compared to pGL3basic (1.2- and 1.5-fold, respectively). Together, these data suggest the existence of a core promoter region of GD3S within the sequence -923/-565 and a negative regulation region within -565/+1.



<u>Figure 3</u>: Promoter activity of the 5' flanking region of GD3S T1 transcript in Hs578T cells. (A) Location of the restriction sites used to generate the different deletions of the genomic sequence between -2307 and the ATG site (+1) in E1 exon. (B) On the left, schematic representation of the different constructs inserted in pGL3basic upstream the luciferase gene. Luc indicates the Firefly luciferase coding sequence. On the right, luminescence detected in luciferase assays. Transfection efficiencies were normalized with the co-transfected plasmid expressing *Renilla* luciferase and luciferase activities are expressed compared to empty pGL3basic activity. The data are means +/- S.D. of $n \ge 3$ experiments. **Bioinformatics' analysis of T1 core promoter region -** The putative core promoter sequence - 923/-565 was analyzed with Matinspector software with "core similarity: 0.95" and "matrice similarity : optimized". The analysis did not reveal any canonical TATA or CAAT boxes as it was shown by others (Furukawa et al., 2003), but a large number of putative binding sites for general (as SP1) and specific transcription factors. Positions of putative transcription factors related to breast cancer are presented in Table 3. Notably, two putative Estrogen Response Element (ERE) were found at position -867/-844 (ERE1) and -783/-760 (ERE2).

Estradiol represses endogenous ST8SIA1 transcripts in ER positive MCF-7 and in ER negative ERα-transfected Hs578T cells- Given that ST8SIA1 is over-expressed in ER negative breast tumours (Ruckhäberle et al., 2008) and that its core promoter contains two putative sites for ERa binding, we investigated the effect of estradiol on ST8SIA1 mRNA expression in breast cancer cell lines MCF-7 and Hs578T. ST8SIA1 expression was analysed by QPCR in ERpositive MCF-7 cells treated with estradiol (10⁻¹⁰ M) and/or tamoxifen (10⁻⁶ M) for 24h. *PS2/TFF1* (Trefoil Factor 1) gene, known to be up-regulated by estradiol (Masiakowski et al., 1982) was similarly analysed to control the estradiol responsiveness of the treated cells. As shown in Fig. 4A, estradiol expectedly increased PS2 expression while ST8SIA1 expression decreased significantly (about 4.5 fold). Tamoxifen (TAM) treatment abolished the increased PS2 expression but has no antagonistic effect on estradiol-mediated GD3S mRNA repression. Similar experiment was performed in ER-negative Hs578T cells transfected or not with the pcDNA-ERa vector 24h before estradiol treatment. Estradiol had no significant effect on the expression of PS2 or ST8SIA1 in mock-transfected Hs578T cells (Fig. 4B). In contrast, in Hs578T artificially expressing ERa, estradiol induced an increase of PS2 expression as well as a slight but significant decrease of ST8SIA1 expression. Taken together, our results demonstrate that estradiol represses *ST8SIA1* expression in an ERα dependent manner.

Effect of estradiol on ST8SIA1 core promoter activity in Hs578T expressing ER α – To demonstrate the role of the EREs found in the core promoter in the estradiol-mediated *ST8SIA1* regulation, we analyzed the promoter sequence -923/565 activity in estradiol treated Hs578T cells transfected or not with pcDNA-ER α . As shown in Fig. 5, estradiol had no significant effect on the core promoter activity in mock-transfected Hs578T cells (control). However, ER α expression allowed a significant decrease of the luciferase activity (50%) in estradiol treated cells. A similar fold of repression was obtained for the construction pGL3(-1117/-565) (data not shown). However, directed mutagenesis of both putative ERE sites on pGL3(-923/-565) plasmid did not suppress the repressive action of estradiol. This result suggests that these sites are not involved in ER signalling and that estradiol exerts an indirect effect on the *ST8SIA1* promoter activity.



Figure 4: Estradiol represses *ST8SIA1* mRNA expression in ER positive MCF-7 and in ER negative Hs578T expressing ERa. (A) Effect of estradiol and tamoxifen on GD3S mRNA expression in MCF-7 cells. After 48h of culture in steroid-free medium, MCF-7 cells were treated with 10^{-10} M estradiol and/or 10^{-6} M tamoxifen for 24h. (B) Effect of estradiol on GD3S mRNA expression in Hs578T cells transfected with ERa coding vector. After 48h of culture in steroid-free medium, Hs578T cells were transfected with pcDNA-ERa or pcDNA empty vector (control). 24h after transfection, cells were treated for 24h with 10^{-10} M estradiol. For (A) and (B), *ST8SIA1* or *PS2* (positive control) mRNA expression was determined by QPCR. Results were normalized to the expression of *RPLP0* and reported to the expression of *ST8SIA1* or *PS2* in cells treated with vehicle (0.1% ethanol). Data are means +/- SD of n ≥ 3 experiments. * p<0.05 vs. untreated (vehicle).


<u>Figure 5</u>: Effect of mutations of ERE putative sites on -923/-565 core promoter activity. After 48h of culture in steroid-free medium, Hs578T were transfected with pGL3(-923/-565), either native or mutated on ERE binding sites, and pcDNA-ERα. Transfection with pcDNA empty vector was used as negative control. The following day, cells were treated for 24 h with 10⁻¹⁰ M estradiol. On the left: schematic representation of the sequence transfected in Hs578T cells. Black circles indicate the mutated ERE sequences. On the right: relative luciferase activity of the core promoter in Hs578T cells treated or not with 10⁻¹⁰ M estradiol. Transfection efficiencies were normalized with the co-transfected plasmid expressing *Renilla* luciferase. Vehicle: 0.1% ethanol. Each bar represents the mean +/- S.D. of n≥ 3 experiments. *p<0.05.

Discussion

In this paper, we determined that T1 is the major transcript of GD3S expressed in breast tumour tissues and we characterized for the first time the core promoter essential for transcription of GD3S in breast cancer cells. In breast tumour tissues, the 5'-UTR of T1 transcript is shorter but the same than the one found in other cell lines (Furukawa et al., 2003; Kang et al., 2007; Dae et al., 2009; Kwon et al., 2009). Furthermore, we newly described minor transcripts as T2 and T3 with alternative first exon that lack initiation codon. Similar aberrant non-coding transcripts have recently been described in tumours and have been suggested to play functional roles in cancer progression and metastasis (Gibb et al., 2011). Interestingly, the core promoter we identified in breast cancer cells, between -923 and -565 upstream the initiation codon, overlaps with the core promoter found in melanoma (-833/-519) (Furukawa et al., 2003) and neuroblastoma (-1190/-690) (Kwon et al., 2009) but not with the one found in glioblastoma (-1330/-1190) (Dae et al., 2009), suggesting a tissue-specific regulation of *ST8SIA1*

In the present study, we show an ER α -mediated down-regulation by estradiol of both endogenous GD3S mRNA and GD3S core promoter activity in breast cancer cells. This result fits well with a microarray analysis showing an inverse correlation between *ST8SIA1* and *ESR1* (coding ER α receptor) gene expression in invasive breast cancer primary tumours (Ruckhäberle et al., 2008, 2009). We therefore propose that high expression of GD3S in ER negative tumours, due to the loss of ER α signalling, could increase complex gangliosides expression at the cell surface, and through this possibly enhance the aggressiveness of this tumour subtype (Cazet, Lefebvre, et al., 2010; Battula et al., 2012).

Transcriptional regulation by steroid hormones has been showed for several sialyltransferases. For instance, ST3Gal III and ST6Gal I were demonstrated to be up-regulated and down-regulated respectively by estradiol in MCF-7 breast cancer cells (Peyrat et al., 2000). Testosterone was also shown to up-regulate ST3Gal II expression, through epigenetic regulation involving NFκB, in prostate cancer cells (Hatano et al., 2012).

Although bioinformatics analysis indicate two ERE on the core promoter, site mutagenesis of these predicted EREs in Hs578T cells failed to confirm their *cis*-regulatory function in *ST8SIA1* transcription. To explain this result, first hypothesis is that *ST8SIA1* is down-regulated by estradiol *via* some *cis*-acting ERE that were not detected by computational analysis. However, it was reported that estradiol mediated down-regulation of gene expression can be classified in two groups according to the kinetic of their response to the hormone (Frasor et al., 2003; Carroll et al., 2006). Early-down-regulated genes are often primary targets of estrogen receptor, while late-down-regulated genes require secondary factors for transcription (Carroll et al., 2006). In our cells, *ST8SIA1* down-regulation was only observed after 8h of estradiol treatment (data not shown) suggesting *ST8SIA1* to be indirectly regulated by estradiol (i.e. without direct binding of ERα to *ST8SIA1* promoter).

Tamoxifen is an estradiol antagonist used to treat ER+ breast cancer patients. It plays an active role in inhibition of breast cancer cells proliferation through repression of ERα responsive genes normally involved in cell proliferation (Keeton and Brown, 2005). Although TAM treatment of Hs578T cells efficiently prevented the expression of *PS2*, a well characterized estradiol responsive gene, it did not compete with estradiol-induced *ST8SIA1* repression. Reassuringly, our results suggest that TAM treatment of breast cancer patients is unlikely to induce the expression of possibly deleterious complex gangliosides *via ST8SIA1* induction in ER+ breast cancer tumours. Moreover, we observed that TAM decreased *ST8SIA1* mRNA expression in absence of estradiol

at the same level than estradiol alone (Fig. 5A). Agonistic effect of TAM has been previously documented for estradiol repressed genes (Ramkumar and Adler, 1995; Merrell et al., 2011). This is likely due to the ability of both TAM and estradiol bound to ER to recruit the same corepressors, such as the nuclear co-repressor NCoR (Keeton and Brown, 2005; Merrell et al., 2011). Altogether our results leads to a second hypothesis that down-regulation of GD3S could be due to indirect binding of ER α to the core promoter, *via* unidentified co-repressors recruitable by either estradiol or TAM.

Finally, ligand-activated ERα could also repress the expression of transcriptional activators of *ST8SIA1*. Notably, it is unlikely that *ST8SIA1* could be decreased by a repressor, since TAM should have been able to prevent the expression of this putative repressor and avoid *ST8SIA1* decrease upon estradiol treatment. Bioinformatics analysis of the core promoter have revealed potential candidates such as WT1 (Caldon et al., 2008; Han et al., 2008), c-Myb (Quintana et al., 2011), KLF-15 (Ray and Pollard, 2012), E2F2 (Bhat-Nakshatri et al., 2009), NFAT (Fougère et al., 2010) and ETS-1 (Gilles et al., 1997) (Table 1). Kang and collaborators have also described a functional NFκB binding site at -773 pb upstream the ATG, that was essential for *ST8SIA1* transcription in melanoma cells (Kang et al., 2007). Interestingly, several studies have shown that NFκB is down-regulated by ER signalling (Frasor et al., 2003; Pratt et al., 2003; Wang, Belguise, et al., 2007). All these candidates will therefore be investigated in further studies.

To conclude, delineating the molecular mechanisms by which estradiol represses GD3S in breast cancer cells could provide new targets to inhibit complex gangliosides synthesis and potentially hamper ER negative breast tumours aggressiveness.

Acknowledgment

This work was supported by the University of Sciences and Technologies of Lille, the Association pour la Recherche sur le Cancer (Grant n° 7936 and 5023), le comité de l'Aisne de La Ligue contre le Cancer. M.B. was recipient of a Canon Foundation fellowship. We also thank the Guy's and St Thomas's NHS foundation Trust for providing breast tumour tissues.

References

- Battula VL, Shi Y, Evans KW, Wang R-Y, Spaeth EL, et al. (2012) Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. J Clin Invest 122: 2066–2078. doi:10.1172/JCI59735.
- Bhat-Nakshatri P, Wang G, Collins NR, Thomson MJ, Geistlinger TR, et al. (2009) Estradiolregulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. Nucleic Acids Res 37: 4850–4861. doi:10.1093/nar/gkp500.
- Birklé S, Zeng G, Gao L, Yu RK, Aubry J (2003) Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. Biochimie 85: 455–463.
- Caldon CE, Lee CSL, Sutherland RL, Musgrove EA (2008) Wilms' tumor protein 1: an early target of progestin regulation in T-47D breast cancer cells that modulates proliferation and differentiation. Oncogene 27: 126–138. doi:10.1038/sj.onc.1210622.
- Carroll JS, Meyer CA, Song J, Li W, Geistlinger TR, et al. (2006) Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. Nat Genet 38: 1289–1297. doi:10.1038/ng1901.
- Cazet A, Bobowski M, Rombouts Y, Lefebvre J, Steenackers A, et al. (2012) The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase. Glycobiology 22: 806–816. doi:10.1093/glycob/cws049.
- Cazet A, Groux-Degroote S, Teylaert B, Kwon K-M, Lehoux S, et al. (2009) GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. Biol Chem 390: 601–609. doi:10.1515/BC.2009.054.
- Cazet A, Lefebvre J, Adriaenssens E, Julien S, Bobowski M, et al. (2010) GD□ synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation. Mol Cancer Res 8: 1526–1535. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0302.
- Chapman PB, Wu D, Ragupathi G, Lu S, Williams L, et al. (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. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0345.
- Dae H-M, Kwon H-Y, Kang N-Y, Song N-R, Kim K-S, et al. (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.
- Fougère M, Gaudineau B, Barbier J, Guaddachi F, Feugeas J-P, et al. (2010) NFAT3 transcription factor inhibits breast cancer cell motility by targeting the Lipocalin 2 gene. Oncogene 29: 2292–2301. doi:10.1038/onc.2009.499.
- Frasor J, Danes JM, Komm B, Chang KCN, Lyttle CR, et al. (2003) Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. Endocrinology 144: 4562–4574. doi:10.1210/en.2003-0567.

- Furukawa K, Hamamura K, Aixinjueluo W, Furukawa K (2006) Biosignals modulated by tumorassociated carbohydrate antigens: novel targets for cancer therapy. Ann N Y Acad Sci 1086: 185–198. doi:10.1196/annals.1377.017.
- 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.
- Gibb EA, Vucic EA, Enfield KSS, Stewart GL, Lonergan KM, et al. (2011) Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. PLoS ONE 6: e25915. doi:10.1371/journal.pone.0025915.
- Gilles C, Polette M, Birembaut P, Brünner N, Thompson EW (1997) Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines. Clin Exp Metastasis 15: 519–526.
- Hackett AJ, Smith HS, Springer EL, Owens RB, Nelson-Rees WA, et al. (1977) Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. J Natl Cancer Inst 58: 1795–1806.
- Hakomori Si S (2002) The glycosynapse. Proc Natl Acad Sci USA 99: 225–232. doi:10.1073/pnas.012540899.
- Han Y, Yang L, Suarez-Saiz F, San-Marina S, Cui J, et al. (2008) Wilms' tumor 1 suppressor gene mediates antiestrogen resistance via down-regulation of estrogen receptor-alpha expression in breast cancer cells. Mol Cancer Res 6: 1347–1355. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2179.
- Hatano K, Miyamoto Y, Mori M, Nimura K, Nakai Y, et al. (2012) Androgen-regulated transcriptional control of sialyltransferases in prostate cancer cells. PLoS ONE 7: e31234. doi:10.1371/journal.pone.0031234.
- Kang N-Y, Kim C-H, Kim K-S, Ko J-H, Lee J-H, et al. (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. doi:10.1016/j.bbaexp.2007.08.001.
- Keeton EK, Brown M (2005) Cell cycle progression stimulated by tamoxifen-bound estrogen receptor-alpha and promoter-specific effects in breast cancer cells deficient in N-CoR and SMRT. Mol Endocrinol 19: 1543–1554. doi:10.1210/me.2004-0395.
- Kwon H-Y, Dae H-M, Song N-R, Kim K-S, Kim C-H, et al. (2009) Valproic acid induces transcriptional activation of human GD3 synthase (hST8Sia I) in SK-N-BE(2)-C human neuroblastoma cells. Mol Cells 27: 113–118. doi:10.1007/s10059-009-0012-4.
- Lo ASY, 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. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-0043.
- Marquina G, Waki H, Fernandez LE, Kon K, Carr A, et al. (1996) Gangliosides expressed in human breast cancer. Cancer Res 56: 5165–5171.
- Masiakowski P, Breathnach R, Bloch J, Gannon F, Krust A, et al. (1982) Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. Nucleic Acids Res 10: 7895–7903.

- Merrell KW, Crofts JD, Smith RL, Sin JH, Kmetzsch KE, et al. (2011) Differential recruitment of nuclear receptor coregulators in ligand-dependent transcriptional repression by estrogen receptor-α. Oncogene 30: 1608–1614. doi:10.1038/onc.2010.528.
- Nakayama J, Fukuda MN, Hirabayashi Y, Kanamori A, Sasaki K, et al. (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, Kawashima I, Tai T, Nagai Y, et al. (1996) Acceptor substrate specificity of a cloned GD3 synthase that catalyzes the biosynthesis of both GD3 and GD1c/GT1a/GQ1b. Eur J Biochem 238: 647–652.
- Navid F, Santana VM, Barfield RC (2010) Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. Curr Cancer Drug Targets 10: 200–209.
- Oblinger JL, Pearl DK, Boardman CL, Saqr H, Prior TW, et al. (2006) Diagnostic and prognostic value of glycosyltransferase mRNA in glioblastoma multiforme patients. Neuropathol Appl Neurobiol 32: 410–418. doi:10.1111/j.1365-2990.2006.00742.x.
- Peyrat JP, Recchi MA, Hebbar M, Pawlowski V, Hornez L, et al. (2000) Regulation of sialyltransferase expression by estradiol and 4-OH-tamoxifen in the human breast cancer cell MCF-7. Mol Cell Biol Res Commun 3: 48–52. doi:10.1006/mcbr.2000.0185.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29: e45.
- Pratt MAC, Bishop TE, White D, Yasvinski G, Ménard M, et al. (2003) Estrogen withdrawalinduced NF-kappaB activity and bcl-3 expression in breast cancer cells: roles in growth and hormone independence. Mol Cell Biol 23: 6887–6900.
- Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T (1995) MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nucleic Acids Res 23: 4878–4884.
- Quintana AM, Liu F, O'Rourke JP, Ness SA (2011) Identification and regulation of c-Myb target genes in MCF-7 cells. BMC Cancer 11: 30. doi:10.1186/1471-2407-11-30.
- Ramkumar T, Adler S (1995) Differential positive and negative transcriptional regulation by tamoxifen. Endocrinology 136: 536–542.
- Ray S, Pollard JW (2012) KLF15 negatively regulates estrogen-induced epithelial cell proliferation by inhibition of DNA replication licensing. Proc Natl Acad Sci USA 109: E1334–1343. doi:10.1073/pnas.1118515109.
- Regina Todeschini A, Hakomori S (2008) Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. Biochim Biophys Acta 1780: 421–433. doi:10.1016/j.bbagen.2007.10.008.
- Ruckhäberle E, Karn T, Rody A, Hanker L, Gätje R, et al. (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. doi:10.1007/s00432-008-0536-6.
- Ruckhäberle E, Rody A, Engels K, Gaetje R, von Minckwitz G, 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. doi:10.1007/s10549-007-9836-9.

- Saito M, Yu RK, Cheung NK (1985) Ganglioside GD2 specificity of monoclonal antibodies to human neuroblastoma cell. Biochem Biophys Res Commun 127: 1–7.
- Svennerholm L (1980) Ganglioside designation. Adv Exp Med Biol 125: 11.
- Tettamanti G (2004) Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. Glycoconj J 20: 301– 317. doi:10.1023/B:GLYC.0000033627.02765.cc.
- Wang X, Belguise K, Kersual N, Kirsch KH, Mineva ND, et al. (2007) Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. Nat Cell Biol 9: 470–478. doi:10.1038/ncb1559.
- Welboren W-J, Stunnenberg HG, Sweep FCGJ, Span PN (2007) Identifying estrogen receptor target genes. Mol Oncol 1: 138–143. doi:10.1016/j.molonc.2007.04.001.
- Yamashita T, Wada R, Sasaki T, Deng C, Bierfreund U, et al. (1999) A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. Proc Natl Acad Sci USA 96: 9142–9147.
- Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, et al. (2010) Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. N Engl J Med 363: 1324– 1334. doi:10.1056/NEJMoa0911123.
- Yu RK, Tsai Y-T, Ariga T (2012) Functional roles of gangliosides in neurodevelopment: an overview of recent advances. Neurochem Res 37: 1230–1244. doi:10.1007/s11064-012-0744-y.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I- ROLE DE LA G_{D3} SYNTHETASE DANS LE DEVELOPPE-MENT DU CANCER DU SEIN

Il est bien établi que la G_{D3} synthétase, l'enzyme clef la biosynthèse des gangliosides des séries b- et c-, joue un rôle important dans la progression des tumeurs d'origine neuroectodermique (Furukawa et al., 2006). En particulier, le produit de cette enzyme, le ganglioside G_{D3} , est décrit comme un antigène glucidique associé au mélanome. La réexpression de la G_{D3} synthétase et du G_{D3} dans une lignée de mélanome mutante SKMel-28-N1 conduit à une augmentation significative de la prolifération, de la migration et de l'adhésion cellulaires (Hamamura et al., 2005). Par ailleurs, l'expression des *ST8SIA1* peut également être altérée dans les tumeurs du cerveau, conduisant à la surexpression des gangliosides G_{D3} et G_{D2} . Même si le rôle du G_{D2} dans la progression des tumeurs cérébrales reste encore mal défini, l'utilisation d'anticorps thérapeutiques anti- G_{D2} chez des patients atteints de mélanome a montré une bonne efficacité anti-tumorale (Cheung et al., 2012).

Dans ce paragraphe, nous reviendrons sur les études relatant de l'expression et du rôle la G_{D3} synthétase dans le cancer du sein et nous verrons que les travaux effectués au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence le rôle du G_{D2} dans l'activation spécifique du récepteur c-Met et l'acquisition de propriétés malignes de cellules de cancer du sein.

A- Le G_{D2} : activateur spécifique du récepteur c-Met dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+

1) Rappel des résultats obtenus

Afin de déterminer le rôle de la G_{D3} synthétase et des gangliosides complexes dans le cancer du sein, un modèle de cellules de cancer de sein MDA-MB-231 surexprimant la G_{D3} synthétase a été créé au laboratoire par Aurélie Cazet.

Les cellules MDA-MB-231 appartiennent au sous-type moléculaire *basal-like* (ER-, HER2-, PR-). Elles 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). Ces cellules hormono-indépendantes présentent donc les caractéristiques d'un stade avancé de la maladie.

Malgré l'agressivité préexistante de cette lignée, il a été démontré que l'expression de la G_{D3} 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 intracellulaires MEK/ERK et PI3K/Akt (Cazet et al., 2009; 2010).

Au cours de ma thèse, nous avons montré que le G_{D3} et le G_{D2} sont les principaux gangliosides exprimés par les clones MDA-MB-231 GD3S+ alors que les cellules MDA-MB-231 contrôle accumulent principalement du G_{M3} et du G_{M2} . De plus, des expériences de siRNA ciblant la

 G_{M2}/G_{D2} synthétase et l'utilisation d'anticorps anti-gangliosides ont montré que le ganglioside G_{D2} était spécifiquement impliqué dans la phosphorylation de c-Met en l'absence de son ligand, conduisant au phénotype prolifératif des cellules MDA-MB-231 GD3S+ (<u>Figure 25</u>, Cazet, Bobowski et al., 2012).



<u>Figure 25</u> : Modèle de l'activation du récepteur c-Met par le ganglioside G_{D2} dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 sur-exprimant la G_{D3} synthase. Par un mécanisme encore inconnu, la présence de G_{D2} à la surface des cellules MDA-MB-231 GD3S+ induit l'auto-activation du récepteur c-Met, en l'absence d'HGF. L'activation des voies de signalisation MEK/ERK et PI3K/Akt induit une augmentation de la prolifération et la migration des cellules GD3S+ par rapport aux cellules contrôles, n'exprimant pas de gangliosides complexes.

2) Le récepteur à activité tyrosine kinase c-Met

Le proto-oncogène c-Met code pour un récepteur à activité tyrosine kinase, dont le seul ligand connu est l'*hepatocyte growth factor* (HGF) ou *scatter factor* (SF). Ce RTK est une protéine transmembranaire de type I constituée d'une sous-unité α (50 kDa) et d'une sous-unité β (140 kDa), liées entre elles par un pont disulfure. La sous-unité β de c-Met traverse la membrane cellulaire et contient un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. La liaison de l'HGF au domaine extracellulaire active l'activité tyrosine kinase intrinsèque et induit la transphosphorylation du récepteur. La protéine c-Met phosphorylée (phospho-Met) est alors capable de se lier aux protéines adaptatrices Grb2 et Gab1 et active les voies de signalisation PI3K/AKT et MAPK. En régulant la prolifération, la survie, la migration et l'invasion, la liaison HGF/c-Met est essentielle

Discussion et perspectives

aux fonctions physiologiques telles que l'embryogenèse, l'angiogenèse et la cicatrisation. En parallèle, une dérégulation de la signalisation de c-Met a été observée dans plusieurs types de tumeurs dont le cancer du sein. En particulier, la surexpression de c-Met contribue à la progression tumorale mammaire et est associée à un phénotype agressif dans le cas des carcinomes canalaires in situ (Beviglia et al., 1997; Lindemann et al., 2007). De plus, il a récemment été montré qu'une forte expression de c-Met et de phospho-Met était clairement corrélée à un mauvais pronostic de survie chez des patientes atteintes de cancer du sein (Raghav et al., 2012). Ainsi, l'activation du récepteur c-Met due à la présence de G_{D2} à la surface cellulaire pourrait contribuer au développement tumoral mammaire. En ce sens, des analyses par microarray ont montré une corrélation entre le niveau d'expression de ST8SIA1 et de c-Met dans des tumeurs primaires de cancer du sein. De plus, ces deux gènes sont tous deux fortement exprimés dans les tumeurs du sous-type basal-like par rapport aux autres sous-types de tumeurs (Cazet, et al., 2010). Ces résultats indiquent que les produits des gènes ST8SIA1 et c-Met pourrait coopérer au sein du même sous-type moléculaire pour contribuer aux propriétés particulièrement agressives des tumeurs basal-like. Dans ce contexte, déterminer les mécanismes de la coopération c-Met/G_{D2} apparaît essentiel.

3) Co-localisation de c-Met et du G_{D2}

Des expériences d'immunofluorescence ont clairement mis en évidence une co-localisation du récepteur c-Met et du G_{D2} au niveau de la membrane plasmique (Cazet, Bobowski et al., 2012). Cependant, l'interaction précise entre c-Met et le ganglioside G_{D2} reste à démontrer. Dans cet objectif, lors d'un séjour de 3 mois dans le laboratoire du Pr. K. Furukawa, j'ai entrepris la purification de radeaux lipidiques de cellules MDA-MB-231 GD3S+, grâce à la technique d'ultracentrifugation sur gradient de saccharose, de manière à déterminer si une co-localisation de c-Met et du G_{D2} existait au sein des microdomaines enrichis en glycosphingolipides. Les résultats préliminaires sont présentés dans la **Figure 26**.

Les membranes résistantes aux détergents ont été isolées à l'aide deux détergents nonioniques, le Triton X-100 et le Lubrol WX. Dans le cas du Triton X-100, nous n'avons pas pu détecté la présence de c-Met dans les fractions correspondant aux radeaux lipidiques alors que l'utilisation de Lubrol a permis de visualiser le récepteur c-Met dans les fractions enrichies en cavéoline-1, correspondant aux radeaux lipidiques. Ceci peut s'expliquer par le fait que chacun de ces détergents permet l'isolement d'un sous-type particulier de radeaux lipidiques ayant une composition distincte (Waugh et Hsuan, 2009). En effet, le Lubrol permet la purification de radeaux riches en cholestérol qui contiennent une forte proportion de phosphatidylcholine. A l'inverse, ce lipide est quasiment absent des radeaux lipidiques purifiées à partir de Triton X-100 (Drobnik et al., 2002).



<u>Figure 26</u>: Profil d'expression du récepteur c-Met après isolement des radeaux lipidiques à l'aide de 2 types de détergents, le Triton X-100 (A) et le Lubrol WX (B). $1-2 \ 10^7$ cellules MDA-MB-231 mock (transfectées avec un vecteur vide) ou surexprimant la G_{D3} synthétase (GD3S+) ont été lysées dans un tampon de lyse contenant 1 % de Triton X-100 ou 1% de Lubrol. Après homogénéisation et élimination des débris cellulaires, les lysats cellulaires ont été fractionnés à l'aide d'un gradient de saccharose suivie d'une ultracentrifugation. Les fractions (1-10) ont été analysées en Western blotting à l'aide d'anticorps anti-c-Met ou anti-cavéoline-1 qui constitue un contrôle de la purification. Les fractions qui correspondent aux radeaux lipidiques sont retrouvées au niveau des fractions 2, 3 et 4, de faible densité.

D'autre part, aucune différence de localisation de c-Met n'a été observée entre les cellules MDA-MB-231 contrôle et les cellules MDA-MB-231 GD3S+. Qu'en est t-il de la localisation de la forme activée de c-Met dans les cellules GD3S+? Pour répondre à cette question, nous envisageons de poursuivre ces études en analysant l'expression de phospho-Met et du G_{D2} dans les différentes fractions d'un gradient de densité obtenu à partir de Lubrol. Ceci pourrait permettre de mettre en évidence la co-localisation du récepteur c-Met phosphorylé et du G_{D2} au sein de microdomaines particuliers de la membrane plasmique.

4) Mécanismes d'activation de c-Met par le G_{D2}

L'incubation des cellules MDA-MB-231 GD3S+ avec un anticorps spécifique du G_{D2} a montré une forte diminution de la croissance cellulaire et de l'activation du récepteur c-Met, indiquant clairement le rôle de la partie oligosaccharidique du G_{D2} dans l'activation de c-Met en l'absence de son ligand. Cependant, les mécanismes d'interaction c-Met/ G_{D2} restent inconnus. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées.

D'une part, l'activation constitutive de c-Met par le G_{D2} pourrait être induite par une liaison directe de type saccharidique entre le G_{D2} et les chaînes N-glycanniques du récepteur c-Met. Ceci conduirait à un changement de conformation du récepteur et à l'induction de son activité tyrosine

Discussion et perspectives

kinase. Ce type d'interaction a été démontré dans le cas de l'inhibition du récepteur EGFR par le G_{M3} (Yoon et al., 2006; Kawashima et al., 2009). En effet, ces auteurs ont montré que l'inhibition de l'activation de l'EGFR est dépendante des interactions carbone-carbone entre le G_{M3} et les résidus de GlcNAc terminaux des chaînes N-glycanniques portées par le récepteur. Afin de valider cette hypothèse, nous envisageons d'utiliser la technique de *glycan array*, qui consiste en une variété d'oligosaccharides immobilisée sur un support solide. En particulier, les parties saccharidiques des glycolipides, clivées par une endocéraminidase, peuvent constituer une source oligosaccharidique pour la génération de microarray de type NGL (*neoglycolip*) (Feizi et Chai, 2004). L'incubation d'une forme recombinante de la protéine c-Met glycosylée sur cette puce pourrait indiquer si ce récepteur est capable ou non de se fixer à des séquences oligosaccharides de type G_{D2} . Grâce à cette méthode, l'équipe de Feizi a pu par exemple montrer que la malectine, une nouvelle protéine, était capable de se lier à une structure N-glycannique riche en mannose (Schallus et al., 2008).

D'autre part, l'activation G_{D2} -dépendante de c-Met pourrait mettre en jeu d'autres molécules de signalisation. L'équipe d'Hakomori a décrit l'existence d'un complexe associant G_{M2}/G_{M3} et té-traspanine CD82, capable d'inhiber l'activité tyrosine kinase de c-Met induite par l'HGF dans les cellules épithéliales HCV-29 (Todeschini et al., 2007; 2008b). De plus, ces auteurs ont montré que l'adhésion des cellules HCV-29 aux protéines de la matrice extracellulaire induisait une activation de c-Met à travers l'interaction entre c-Met et les intégrines $\alpha 3\beta 1$, suggérant l'existence de complexe de signalisation $G_{M2}/G_{M3}/CD82/c$ -Met et intégrines.

De tels complexes de signalisation pourraient exister au niveau des zones membranaires enrichies en G_{D2} dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+, permettant d'activer c-Met en l'absence d'HGF. En ce sens, l'équipe de Furukawa a rapporté que le G_{D2} pouvait être co-immunoprécipité avec l'intégrine β 1 (Aixinjueluo et al., 2005). Par ailleurs, une activation de c-Met par la fibronectine et les intégrines $\alpha 5\beta$ 1, indépendamment de la présence de son ligand, a été observée dans le cancer de l'ovaire, jouant un rôle important dans les phénomènes d'invasion et de métastase (Mitra et al., 2011). Afin de tester l'existence de tels complexes dans le cas de l'activation de c-Met par le G_{D2} , des expériences de co-immunoprécipitation et de microscopie confocale seront réalisées dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+. Nous envisageons également de visualiser l'expression de ces interactants potentiels (tétraspanine, fibronectine, intégrine β 1, EGFR) au sein des radeaux lipidiques, parallèlement à l'expression de c-Met.

B- GD3S et tumeurs primaires

L'effet de l'expression de la G_{D3} synthétase sur la croissance tumorale mammaire a été testé par injection sous-cutanée de cellules MDA-MB-231 GD3S+ dans des souris SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*). Après inoculation des cellules GD3S+, des tumeurs palpables apparaissaient au bout d'une semaine alors qu'elles n'apparaissaient qu'au bout de 3 semaines pour les cellules contrôle (Cazet, et al., 2010). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe d'Andreef, qui a montré que l'injection sous-cutanée de cellules MDA-MB-231 invalidées sur le gène *ST8SIA1* dans le flanc de souris NOD/SCID n'induisait pas de tumeurs après 8 se-

maines, alors que l'injection de cellules MDA-MB-231 contrôle conduisait à la formation de tumeurs dans 100 % des souris (Battula et al., 2012)

La croissance et le maintien des tumeurs primaires nécessitent un ensemble de modifications moléculaires, conduisant à une prolifération cellulaire accrue ainsi qu'à une augmentation du phénomène d'angiogenèse (cf. introduction : VI, B-). Dans un premier temps, l'activation constitutive de c-Met par le G_{D2} et des voies de signalisation associées à la prolifération pourraient favoriser la croissance de la tumeur GD3S+, malgré l'absence de facteurs de croissance dans l'environnement cellulaire. Dans un second temps, l'activation de c-Met pourrait jouer un rôle dans le phénomène d'angiogenèse, conduisant au passage d'un état de multiplication cellulaire à un état de prolifération incontrôlée. En effet, il a été démontré que l'activation du récepteur c-Met augmente de façon concomitante l'expression du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) sécrété par les cellules tumorales et du récepteur VEGFR2 exprimé par les cellules endothé-liales (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, l'étude de la coopération entre les voies de signalisation de c-Met et du VEGFR constitue une piste de recherche afin de déterminer si cette coopération permettrait d'augmenter la formation de capillaires et la vascularisation de la tumeur primaire GD3S+ *in vivo*.

Chez les patientes, les produits de la G_{D3} synthétase, le G_{D3} , le 9-O-acétyl- G_{D3} et le 9-O-acétyl- G_{D3} ont été détecté dans les carcinomes canalaires infiltrants (Marquina et al., 1996). Cependant, ce type d'étude mériterait d'être approfondi en analysant les gangliosides dans les différents sous-types moléculaires de tumeurs. Il serait par exemple intéressant d'analyser l'expression du ganglioside G_{D2} sur des coupes de tumeurs de type *basal-like*, pour lesquelles *ST8SIA1* est fortement exprimée. De plus, une co-localisation avec c-Met pourrait permettre de conforter l'idée d'une coopération c-Met/ G_{D2} dans le cancer du sein.

Par ailleurs, il a été montré que le G_{D2} était exprimé dans une petite fraction de cellules provenant de lignées cellulaires de sein ou d'échantillons de tumeurs (Battula et al., 2012). Ces cellules G_{D2} + sont principalement de phénotype CD44⁺/CD24^{-/low}, caractéristique des cellules souches de cancer du sein (cf introduction : VI, 3, B-)⁻ Ces auteurs ont montré le rôle essentiel de la GD3S et du G_{D2} dans la formation de mammosphères et l'initiation de la tumeur mammaire (Battula et al., 2012). Les glycolipides sont utilisés comme marqueurs de cellules souches (Yanagisawa, 2011b). En particulier, le G_{D2} est exprimé dans les cellules souches neurales (Klassen et al., 2001) alors que les antigènes A2B5 (gangliosides de la série c-) sont exprimés dans les cellules souches de cerveau de type gliome et oligodendrogliome (Ogden et al., 2008; Tchoghandjian et al., 2010). Le rôle précis de ces gangliosides, notamment dans la capacité des cellules souches à initier le processus métastatique, reste à explorer.

C- GD3S et métastases

Quelques indices amènent à penser au rôle de la G_{D3} synthétase dans le phénomène de métastase du cancer du sein. Tout d'abord, il a été montré que l'induction de la transition epithéliomésenchymateuse (EMT) par l'expression ectopique de Twist (cf introduction : VI, B, 2, b-) dans la lignée épithéliale mammaire humaine transformée HMLER conduit à une augmentation de l'expression de la GD3S et du pourcentage de cellules G_{D2} + (100%) par rapport aux cellules HMLER initiales, pour lesquelles le pourcentage de la population G_{D2} + est seulement de 18% (Battula et al., 2012). Ces résultats suggèrent le rôle des cellules G_{D2} + au cours de l'EMT et du processus métastatique.

Au cours de ma thèse, en collaboration avec le Dr. Cheryl Gillett du Guy's Hospital de Londres, nous avons pu répertorier les sites métastatiques chez 20 patientes atteintes de cancer du sein, pour lesquelles nous avons mesuré l'expression transcriptionnelle de la G_{D3} synthase dans les tumeurs primaires (**Figure 27**). Même si le nombre de tumeurs demeure trop faible pour réaliser une étude statistique, on peut voir que les tumeurs qui expriment fortement la GD3S ont une nette tendance à présenter une invasion locale, un nombre élevé de ganglions lymphatiques axillaires atteints ainsi qu'une fréquence plus élevée de métastases distantes (os, foie, poumon, méninges et cerveau) par rapport aux tumeurs exprimant faiblement la GD3S.



Figure 27 : Caractéristiques métastatiques de patientes atteintes de cancer du sein en fonction de l'expression de la G_{D3} synthétase au niveau la tumeur primaire. Le niveau d'expression des ARN de *ST8SIA1* a été mesuré par Q-PCR à partir de 20 échantillons de tumeurs de type ER- (132 à 151), obtenus par le Guy's Hospital de Londres. Les données ont été normalisées par *HPRT* et classées de la plus forte à la plus faible expression de *ST8SIA1*. Les sites métastatiques sont indiqués dans le tableau pour chaque patiente.

Enfin, une étude 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 α -, permet aux cellules mammaires de métastaser spécifiquement au cerveau (Bos et al., 2009). En parallèle, des cellules mammaires migrant au niveau du tissu osseux sur-expriment *ST8SIA1* (Carcel-Trullols et al., 2006). Ces données renforcent le rôle de la glycosylation de surface dans le processus de cancérisation mammaire et apporte 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 ?

Pour y répondre, un projet a été initié au laboratoire qui consiste à transfecter stablement l'ADNc codant la luciférase dans les clones MDA-MB-231 GD3S+ et les cellules contrôle. Le but est d'inoculer chez la souris ces cellules exprimant la luciférase et d'observer 6 semaines plus tard la luminescence *in vivo*, à la fois de l'animal et des organes à l'aide d'imagerie biophotonique (Tao et al., 2008). Ceci permettra de savoir si les cellules GD3S+ sont capables de s'étendre au niveau de sites métastatiques préférentiels. En parallèle, une collaboration avec le Pr. Roméo Cecchelli (Physiologie de la barrière hémato-encéphalique, Université d'Artois, Lens, France) est actuellement en cours, et vise à déterminer les capacités d'adhérence et le passage des clones GD3S+ dans un modèle mimant la barrière hémato-encéphalique (Vandenhaute et al., 2012).

II- REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU GENE ST8SIA1 DANS LE CANCER DU SEIN

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, le niveau d'expression et la diversité des gangliosides peuvent être en partie expliqués par le niveau d'expression des glycosyltransférases, impliquant une régulation au niveau de la transcription des gènes codant les GTs (Ruan et al., 1999, Nairn et al., 2008).

La régulation transcriptionnelle du gène *ST8SIA1* a été préalablement étudiée dans les cellules de mélanome (Furukawa et al., 2003; Kang et al., 2007), de glioblastome (Dae et al., 2009) et de neuroblastome (Kwon et al., 2008) (cf. introduction : V, D-) ; tissus pour lesquels le rôle important de la G_{D3} synthétase dans la progression tumorale est bien établi (voir paragraphe IV, B-). Depuis quelques années, plusieurs études ont décrit l'expression et l'impact de la GD3S et des gangliosides des séries b- et c- au cours de la carcinogenèse mammaire (Marquina et al., 1996; Ruckhäberle et al., 2008, 2009; Cazet, et al., 2010; Battula et al., 2012; Cazet, Bobowski et al., 2012, cf. introduction :VII-). Dans ce contexte, il nous est apparu important de comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la régulation du gène *ST8SIA1* dans le cancer du sein. Dans cet objectif, après détermination des transcrits exprimés par les tumeurs mammaires, nous avons caractérisé le promoteur core, essentiel à la transcription de *ST8SIA1* dans les cellules de cancer du sein. Enfin, nous avons montré que l'œstradiol régulait négativement l'expression transcriptionnelle de *ST8SIA1* de façon dépendante du récepteur aux œstrogènes α (ER α), probablement par un mécanisme indirect (Bobowski et al., 2012).

A- Caractérisation de la région 5'UTR et du promoteur de ST8SIA1 dans les cellules de cancer du sein

1) Niveau expression du gène *ST8SIA1* dans les lignées de cancer du sein et les tumeurs mammaires

Pour débuter ce projet, nous avons mesuré l'expression du gène *ST8SIA1* dans plusieurs lignées de cancer du sein et dans 20 échantillons de tumeurs mammaires ER négatives, type de tumeurs pour lequel une forte expression de la GD3S a préalablement été observée (Ruckhäberle et al., 2008). Même si le niveau d'expression apparait relativement hétérogène dans les différents échantillons de tumeurs, il s'avère que l'expression des transcrits de la GD3S est au minimum 10 fois plus élevée dans les échantillons de tumeurs que dans les lignées cellulaires (tumeurs 132-151 > Hs578T (ER-) > MDA-MB-231 (ER-) > BT-20 (ER+) > MCF-7 (ER+)). Ceci semble indiquer que les lignées cellulaires en culture ont perdues la capacité d'exprimer le gène de la GD3S. La diminution d'expression de gène de glycosyltransférases dans les lignées cellulaires de sein en culture pourtant fortement exprimé dans les tumeurs primaires a également été observée pour la sialyltransférase ST6GalNAc I (Julien et al., 2001). Même si ce phénomène demeure inexpliqué, plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Tout d'abord, il est possible que l'expression de ces gènes soit un événement défavorable à la prolifération des cellules en culture ou que les conditions de culture ne soient pas favorables à l'expression de ces gènes. Ainsi, le niveau d'expression des gènes codant ces sialyltransférases aurait progressivement diminué au fur et à mesure de la culture. D'autre part, il est également envisageable que l'expression de ces gènes ne soit pas nécessaire au maintien des cellules en culture et que de ce fait, les cellules aient progressivement perdu la capacité de les exprimer. Par ailleurs, il est intéressant de noter que les lignées de cancer du sein ER négatives présentent une expression plus élevée de *ST8SIA1* que les lignées ER positives, ce qui est en accord avec les données cliniques (Ruckhäberle et al., 2008).

Pour la suite de l'étude, nous avons choisi comme modèle la lignée cellulaire Hs578T pour laquelle la plus forte expression de la GD3S a été observée. Les cellules épithéliales Hs578T, de type triple-négatif, proviennent d'un carcinome de sein. Elles ne sont pas tumorigènes chez les souris immunodéprimés mais sont capables de former des tumeurs en milieu semi-solide (Hackett et al., 1977; Smith, 1979).

2) Les transcrits de *ST8SIA1* dans les lignées de cancer du sein et les tumeurs mammaires

L'organisation du transcrit T1, le transcrit majeur identifié dans les tumeurs mammaires et les lignées Hs578T et MCF-7, est similaire à celle retrouvée dans les autres tissus (introduction : V, C-). Cependant, la taille de la région 5'-UTR dans les tumeurs et la lignée de cancer du sein est plus courte que celle décrite dans la littérature. En effet, dans les cellules de mélanome, de neuroblastome et de glioblastome, les sites d'initiation de la transcription (TSS) ont été retrouvés entre -600 et -450 pb en amont du site d'initiation de la traduction alors que dans le cas de la lignée Hs578T, les TSS ont été retrouvés aux alentours de -345 pb. Dans les tumeurs de sein, les extrémités 5'-UTR de ST8SIA1 observées sont très courtes (environ -20 pb en amont du +1). En outre, il est intéressant de noter la présence de multiples TSS pour ce gène dans les lignées et les tumeurs, ce qui est un phénomène courant pour les gènes de glycosyltransférases (Harduin-Lepers et al., 2001). La courte taille de ces extrémités 5' pourrait s'expliquer par une dégradation des ARN avant leur amplification par 5'-RACE. Cependant, la qualité des ARN a été préalablement contrôlée par analyse microfluidique sur un Bioanalyzer Agilent et ces extrémités courtes ont été retrouvées dans plusieurs échantillons de tumeurs. Chez l'homme, la longueur moyenne des 5'-UTR des ARNm est de 210 nucléotides et la longueur minimale est de 18 nucléotides, ces différences de taille pouvant influencer l'efficacité de la traduction (Mignone et al., 2002). De plus, des 5'-UTR de tailles différentes ont également été observées entre lignées et tumeurs de cancer du sein, notamment pour les gènes TGF- β et BRCA1 (Chatterjee et Pal, 2009) ce qui pourrait être le cas du transcrit T1 de ST8SIA1.

D'autre part, si nous avons montré que T1 était majoritaire dans la plupart des échantillons de tumeurs analysés, deux autres transcrits présentant un premier exon alternatif ont également été détecté par 5'-RACE, uniquement dans les tumeurs. Ces transcrits T2 et T3 possèdent un premier exon situé à 34 Kb et 150 Kb de l'exon 2, respectivement, et ne contiennent donc pas le site d'initiation de la traduction. Si ces transcrits alternatifs étaient traduits à partir de l'ATG situé

dans l'exon 2, il en résulterait une forme tronquée de la GD3S ayant perdu le domaine transmembranaire. Même si la fonction de ces transcrits reste pour le moment inconnue, des tels transcrits aberrants ont récemment été décrits dans les tumeurs et pourrait jouer un rôle dans la progression cancéreuse (Gibb et al., 2011).

3) Activité promotrice de *ST8SIA1* dans les cellules de cancer du sein

Après avoir caractérisé les transcrits de *ST8SIA1* dans les lignées de cancer du sein et les tumeurs mammaires, la séquence génomique d'environ 2300 pb en 5' du transcrit T1 a été clonée et insérée, entière ou tronquée, dans un vecteur rapporteur pGL3b afin de caractériser le promoteur de *ST8SIA1* par des tests luciférase.

L'analyse de l'activité promotrice des différentes délétions de la séquence génomique en amont de T1 nous ont apportées plusieurs informations importantes.

Dans un premier temps, les résultats ont révélé une faible activité promotrice en présence de la séquence -565/+1. La délétion de cette séquence conduit à une forte augmentation de l'activité luciférase, indiquant que cette séquence correspondant à la partie 5' de l'exon E1 constitue une région « silencer ».

Ensuite, la différence d'activité promotrice observée entre les constructions pGL3(-2307/-565) et pGL3(-1779/-565) suggère la présence d'un élément répresseur entre -2307 et -1779 en amont du +1. Nous avons également constaté la présence d'une séquence répressive entre -1419 et -1117. Cette séquence contient des répétitions GT/CG, conservées entre les espèces (Furukawa et al., 2003) qui sont susceptibles d'adopter une conformation en double hélice gauche de type ADN-Z (Wang et al., 1979). Même la signification biologique de l'ADN-Z n'a pas été clairement démontrée, ce type de conformation peut moduler la transcription de gène. En particulier, il a récemment été montré qu'un élément répresseur présentant une conformation en ADN-Z était impliqué dans la répression transcriptionnelle du gène *ADAM-12*, par l'intermédiaire de protéines de liaison à l'ADN-Z (Ray et al., 2011). Afin de déterminer la relevance des répétitions GT/CG présentes dans le promoteur de *ST8SIA1*, des expériences de retard sur gel à l'aide d'anticorps anti-ADN-Z pourront être réalisées.

Enfin, l'analyse de l'activité luciférase des différentes constructions a montré que le vecteur pGL3(-923/-565) constituait la plus petite séquence présentant l'activité promotrice maximale. Nous avons ainsi pu définir la séquence promotrice core entre -923 et -565, essentielle à la transcription de la GD3S dans les cellules de cancer du sein Hs578T. Ce promoteur coïncide en partie avec le promoteur core retrouvé dans les cellules de mélanome (-833/-519, Furukawa et al., 2003) et de neuroblastome (-1190/-690, Kwon et al., 2009) mais pas avec celui retrouvé dans les cellules de glioblastome (-1330/1190, Dae et al., 2009), suggérant une régulation tissuspécifique de *ST8SIA1*.

B- Effet de l'œstradiol sur l'expression transcriptionnelle de ST8SIA1

1) La répression de *ST8SIA1* par l'œstradiol, quelles conséquences chez les patientes ?

Au cours de ma thèse, nous avons montré que l'œstradiol réprime à la fois l'expression endogène des ARNm de la GD3S ainsi que l'activité promotrice core de *ST8SIA1*, uniquement dans les cellules de cancer du sein exprimant le récepteur ER α . Ces résultats sont en accord avec les données cliniques, qui montrent une corrélation inverse entre l'expression de *ST8SIA1* et celle de *ESR1* (codant ER α) dans des tumeurs primaires de sein invasives (Ruckhäberle et al., 2008, 2009). Les tumeurs ER négatives sont plus agressives que les tumeurs ER positives (Rochefort et al., 2003) ; elles sont insensibles aux anti-œstrogènes et leur traitement nécessite donc d'autres types de thérapies ciblées (cf. introduction : VI, A, 2, b-). Par ailleurs, comme nous l'avons précédemment décrit (cf discussion : I, B- et C-), la GD3S semble être importante dans le développement de la tumeur primaire de sein et potentiellement dans le phénomène de métastases. De plus, sa surexpression dans les tumeurs ER négatives est associée à un grade histologique élevé, de mauvais pronostic (Ruckhäberle et al., 2009, cf. introduction : VI, A, 1, b-). Ainsi, nous proposons que l'expression élevée de la GD3S dans les tumeurs ER négatives, due à la perte de la signalisation par ER α , pourrait augmenter l'expression de gangliosides complexes, tels que le G_{D2} à la surface cellulaire, et participer à ainsi à l'agressivité de ce type de tumeur.

Dans ce contexte, les traitements visant à restaurer le statut ER des tumeurs de façon les rendre sensibles aux anti-œstrogènes (cf. introduction : VI, B, 1, c-) pourraient également diminuer le niveau d'expression de *ST8SIA1* et participer à l'amélioration du bénéfice clinique chez ces patientes (Munster et al., 2011)

Le tamoxifène (TAM) est un antagoniste de l'œstradiol utilisé pour traiter les cancers du sein ER+. Il permet l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires en réprimant les gènes de réponse à ERa normalement impliqués dans la prolifération cellulaire (Keeton et Brown, 2005). Nos résultats ont montré que le TAM ne rentrait pas en compétition avec la répression de *ST8SIA1* induite par l'œstradiol. De façon rassurante, ces données suggèrent que le traitement au TAM des patientes atteintes de cancer du sein ne conduirait pas à l'induction de *ST8SIA1* ni à l'expression de gangliosides complexes potentiellement néfastes dans les tumeurs de sein ER+.

2) Mécanisme général de la signalisation par les œstrogènes

L'œstradiol (E2) est une hormone stéroïde qui constitue la principale hormone sexuelle chez la femme. En clinique, des médicaments interagissant avec les ER sont couramment prescrits en particulier dans le cadre de l'hormonothérapie du cancer du sein. D'autre part, les œstrogènes sont utilisés dans les contraceptifs oraux, le traitement de l'infertilité ou encore le traitement hormonal de la ménopause. Leur administration chez les femmes post-ménopausées est désormais

controversée du fait de l'apparition d'effets secondaires dont une augmentation du risque de cancer du sein (Santen et al., 2010).

L'effet des œstrogènes est arbitré par deux types de récepteur : ER α et ER β . Ces récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription qui peuvent former des homodimères ou des hété-rodimères avant de se lier à l'ADN. ER α et ER β ont des affinités différentes pour les différents éléments de réponse et leur effet sur la transcription peut donc être différent au sein d'un même site (Gruber et al., 2004). Dans les cellules de cancer du sein, l'effet prolifératif de E2 est gouverné par ER α alors que le récepteur ER β agit comme un suppresseur de tumeur en bloquant les effets arbitrés par ER α (Leitman et al., 2012).

La régulation transcriptionnelle par E2 s'effectue en plusieurs étapes. Dans un premier temps, E2 se lie à son récepteur induisant un changement de conformation qui permet au complexe E2-ER de se lier à des éléments de régulation spécifiques sur les gènes cibles (Leitman et al., 2012). L'élément de réponse au récepteur ER le mieux caractérisé est un palindrome inversé de 13 nucléotides 5'-GGTCA nnn TGACC-3' (ERE), sur lequel se lie directement le complexe E2-ER sous forme de dimère. Le complexe E2-ER peut également se lier à la chromatine de façon indirecte *via* des facteurs de transcription tels que AP-1 et NFkB (McKay et Cidlowski, 1998; Kushner et al., 2000; Cvoro et al., 2006). Enfin, le complexe E2-ER peut se lier au niveau de séquence d'ADN adjacente aux sites de fixation pour des facteurs de transcription tels que Sp1 et FoxA1, qui stabilisent la liaison de l'ER et induisent l'assemblage d'un complexe transcription-nel (Krishnan et al., 1994; Carroll et al., 2005).

Une fois que le complexe E2-ER est attaché au niveau de l'élément régulateur, il peut recruter des protéines co-régulatrices, soit des co-activateurs dans le cas de l'activation de gènes soit des co-répresseurs lorsqu'il s'agit d'une inactivation de gènes (Lonard et al., 2007).

3) Mécanisme de la répression transcriptionnelle par E2

Les recherches sur les mécanismes de régulation transcriptionnelle du récepteur ER se sont principalement focalisées sur des gènes dont le niveau d'expression est régulé positivement après stimulation à l'œstradiol (e.g. *PS2/TFF1*). Les analyses par microarray des altérations transcriptomiques suggèrent cependant qu'un grand nombre de gènes de réponse sont réprimés sous traitement œstrogènique (Frasor et al., 2003). Même si les mécanismes de répression de gènes par E2 restent encore mal compris, il a été montré que les co-répresseurs NCoR, NRIP1 et SMRT sont recrutés au niveau des sites de liaison à l'ER des gènes réprimés (Carroll et al., 2006; Merrell et al., 2011). Ces co-répresseurs sont capables d'interagir avec des histones désacétylases et bloquent l'activité transcriptionnelle en inhibant le recrutement de l'ARN polymérase II (Guenther et al., 2001; Merrell et al., 2011).

De manière intéressante, l'équipe de Liu a relevé une plus faible fréquence d'ERE pour les gènes réprimés et un enrichissement de sites de liaison à l'ER au niveau des régions promotrices des gènes activés. Les sites de liaison à ER au niveau des promoteurs de gènes réprimés sont plus dispersés et n'apparaissent pas localisés au niveau d'une région spécifique (Lin et al., 2007). Ces données suggèrent que la répression des gènes par ERα pourrait se faire de manière indirecte.

4) La répression de *ST8SIA1* par l'œstradiol est indépendante des sites ERE identifiés sur le promoteur

Une analyse bioinformatique a révélé deux éléments de réponse potentiels (ERE) sur la séquence promotrice core. Cependant, la mutagenèse de ces sites n'affecte pas l'effet répresseur de l'œstradiol sur l'activité promotrice.

Même si la séquence 5'-GGTCA nnn TGACC-3' constitue le site ERE palindromique parfait, dans le génome humain, la plupart des gènes cibles de l'œstradiol contient des ERE non palindromiques au sein de leur promoteur. L'ERE peut par exemple différer d'un à trois nucléotides comme c'est le cas du gène *PS2* (Berry et al., 1989). La régulation par l'œstradiol peut être également être arbitré par des éléments de réponse semi-palindromique (semi-ERE, Martini et Katzenellenbogen, 2001) ou par des séquences semi-palindromiques qui peuvent agir en synergie avec d'autres éléments de régulation présents sur le promoteur (Gruber et al., 2004). Par exemple, le promoteur du gène *HSP27* présente un semi-ERE séparé de 10pb d'un site SP1, qui sont capables de coopérer (Porter et al., 1996).

Dans le cas du promoteur *ST8SIA1*, le site ERE 1 prédit par bioinformatique est imparfait, avec plus 3 nucléotides différents par rapport à la séquence ERE citée précédemment. Le site ERE 2 est basé sur la matrice CAGGTCA (Badis et al., 2009), il ne comprend qu'une moitié de la séquence consensus ERE et l'analyse bioinformatique n'a décelé aucun site SP1 à proximité. Ces données pourraient expliquer pourquoi les sites ERE du promoteur core ne sont pas fonctionnels.

Il semble ainsi que la répression de *ST8SIA1* par le complexe ER-E2 fasse intervenir d'autres voies de signalisation.

C- La répression de ST8SIA1 par l'œstradiol : un mécanisme de régulation indirecte ?

Il a été montré que la régulation négative de l'expression de gènes par l'œstradiol peut être classée en deux groupes selon la cinétique de réponse à l'hormone (Frasor et al., 2003; Carroll et al., 2006). Les gènes régulés négativement de façon précoce sont souvent des cibles primaires de l'ER alors que les gènes régulés négativement de façon tardive nécessitent généralement l'intervention de facteurs secondaires (Carroll et al., 2006). Dans les cellules MCF-7, la répression de *ST8SIA1* a été observée uniquement après 8h de traitement à l'œstradiol (résultat non présenté), ce qui amène à penser à une régulation indirecte par l'intermédiaire d'autres facteurs de transcription, sans liaison directe d'ERα au promoteur core de *ST8SIA1*. Le cyclohéximide, un inhibiteur de la synthèse protéique sera utilisé en présence ou non d'œstradiol de manière à savoir si la synthèse d'autres protéines est nécessaire à la répression et de confirmer cet effet indirect.

Discussion et perspectives

Ainsi, nous proposons que d'autres facteurs de transcription interviennent dans la répression de *ST8SIA1* par l'œstradiol indépendamment des sites ERE. Ces facteurs de transcription pourraient exprimer leur effet répresseur en formant des complexes avec ER, ou encore le complexe ER-E2 pourrait réprimer l'expression d'activateurs transcriptionnels de *ST8SIA1*. De façon intéressante, il semble peu probable que l'expression de *ST8SIA1* soit diminuée suite à l'activation d'un répresseur car dans ces conditions, le TAM aurait empêché l'expression de ce répresseur et annuler la diminution de *ST8SIA1* sous E2.

L'analyse bioinformatique de la séquence promotrice core a révélé plusieurs candidats potentiellement impliqués dans la régulation de *ST8SIA1* par l'intermédiaire de l'œstradiol (**Figure 28**). Les deux candidats rassemblant le plus d'arguments en ce sens sont présentés ci-dessous :

- WT1 (Wilms tumor protein 1). Le gène WT1 a été d'abord identifié comme un gène suppresseur de tumeurs infantiles Wilms'. Cependant, de plus en plus de données indiquent que ce facteur de transcription fonctionne comme un oncogène dans différents types de tumeurs solides dont le cancer du sein (Scharnhorst et al., 2001). Une forte expression de WT1 est d'ailleurs associée à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein (Miyoshi et al., 2002) vraisemblablement du fait de sa capacité à induire la prolifération (Zapata-Benavides et al., 2002; Caldon et al., 2008). Deux sites putatifs pour la fixation de WT1 ont été détectés sur le promoteur core de ST8SIA1 (Figure 28) et des résultats préliminaires indiquent que la mutation du deuxième site situé entre -783 et -767 pb en amont de l'ATG réduit considérablement l'activité promotrice core, indiquant que ce facteur de transcription pourrait activer la transcription de ST8SIA1. En ce sens, il a été montré que WT1 est surexprimé dans les cellules de cancer du sein ER négatives (Han et al., 2008), ce qui suggère son implication dans la régulation de ST8SIA1 dépendante d'ERα.
- NFκB est composé d'un hétérodimère de facteurs de transcription de la famille Rel incluant p50, p65 (ReIA), c-Rel, RelB et p52. L'activation de NFκB a lieu suite à divers stimuli tels que les cytokines et le stress. Parallèlement, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle de NFκB dans la tumorigenèse et la résistance aux thérapies cancéreuses (Mayo et Baldwin, 2000; Prasad et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré que les lignées de cancer du sein ER+ présentent une faible expression de NFκB par rapport aux cellules ER-, pour lesquelles une forte activité de régulation transcriptionnelle par NFκB a été observée (Sovak et al., 1997; Pratt et al., 2003). Kang et ses collaborateurs ont décrit un site NFκB fonctionnel à environ -773 pb an amont de l'ATG, essentiel à la transcription de *ST8SIA1* dans les cellules de mélanome (Figure 28, Kang et al., 2007). Dans les cellules de cancer du sein, on peut donc supposer que NFκB soit régulé négativement par le complexe E2-ER conduisant à une diminution de l'activité transcriptionnelle de *ST8IA1*.



Figure 28 : Position des sites potentiels de fixation à des facteurs de transcription sur le promoteur core de *ST8SIA1*. La séquence promotrice core de *ST8SIA1* située entre -923 et -565 en amont du codon d'initiation a été analysée à l'aide du logiciel MatInspector (genomatix.de). Les facteurs de transcription relevant dans le cancer du sein avec une similarité de matrice optimale ont été sélectionnés. Les séquences core des sites putatifs pour la fixation de facteurs de transcription sont soulignées.

Des expériences de mutagenèse dirigée, retard sur gel (EMSA) ou encore d'immunoprécipitation de la chromatine (CHIP) en présence ou non d'œstradiol sont en cours afin de déterminer l'implication de ces facteurs de transcription dans la répression de *ST8SIA1* dépendante du récepteur ER α .

En conclusion, mon travail de thèse a permis, d'une part, d'apporter de nouvelles données sur l'activation des RTK par les gangliosides. La partie oligosaccharidique du G_{D2} active spécifiquement le récepteur c-Met dans les cellules triple-négatives MDA-MB-231, renforçant ainsi les capacités prolifératives et migratoires de ces cellules. 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 ces travaux étaient validés in vivo, de nouvelles approches thérapeutiques combinant inhibiteurs de c-Met et anticorps anti- G_{D2} pourraient être envisagées.

D'autre part, mon travail a permis de mettre en évidence le rôle de l'œstradiol dans la répression transcriptionnelle du gène ST8SIA1. Comprendre l'action de l'œstradiol et les mécanismes de régulation transcriptionnelle des gènes affectés par le récepteur aux œstrogènes est de première importance dans le cadre de la thérapie hormonale du cancer du sein. De plus, la compréhension des mécanismes moléculaires par lesquels l'œstradiol régule l'expression transcriptionnelle de la G_{D3} synthétase dans les cellules de cancer du sein pourrait apporter de nouvelles cibles thérapeutiques dans le but d'inhiber la synthèse de gangliosides complexes et potentiellement réduire l'agressivité des tumeurs ER négatives.

REFERENCES

Abe, A., Inokuchi, J., Jimbo, M., Shimeno, H., Nagamatsu, A., Shayman, J.A., Shukla, G.S., Radin, N.S., 1992. Improved inhibitors of glucosylceramide synthase. J. Biochem. 111, 191–196.

- 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.
- Awada, A., Bozovic-Spasojevic, I., Chow, L., 2012. New therapies in HER2-positive breast cancer: a major step towards a cure of the disease? Cancer Treat. Rev. 38, 494–504.
- Badis, G., Berger, M.F., Philippakis, A.A., Talukder, S., Gehrke, A.R., Jaeger, S.A., Chan, E.T., Metzler, G., Vedenko, A., Chen, X., Kuznetsov, H., Wang, C.-F., Coburn, D., Newburger, D.E., Morris, Q., Hughes, T.R., Bulyk, M.L., 2009. Diversity and complexity in DNA recognition by transcription factors. Science 324, 1720–1723.
- Bassi, R., Riboni, L., Tettamanti, G., 1994. Cultured cerebellar granule cells, but not astrocytes, produce an ester of ganglioside GD1b, presumably GD1b monolactone, from exogenous GD1b. Biochem. J. 302 (Pt 3), 937–942.
- Battula, V.L., Shi, Y., Evans, K.W., Wang, R.-Y., Spaeth, E.L., Jacamo, R.O., Guerra, R., Sahin, A.A., Marini, F.C., Hortobagyi, G., Mani, S.A., Andreeff, M., 2012. Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. J. Clin. Invest. 122, 2066– 2078.
- Berry, M., Nunez, A.M., Chambon, P., 1989. Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 1218–1222.
- Bertucci, F., Finetti, P., Birnbaum, D., 2012. Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. Curr. Mol. Med. 12, 96–110.
- Beviglia, L., Matsumoto, K., Lin, C.S., Ziober, B.L., Kramer, R.H., 1997. Expression of the c-Met/HGF receptor in human breast carcinoma: correlation with tumor progression. Int. J. Cancer 74, 301–309.
- Bhat-Nakshatri, P., Wang, G., Collins, N.R., Thomson, M.J., Geistlinger, T.R., Carroll, J.S., Brown, M., Hammond, S., Srour, E.F., Liu, Y., Nakshatri, H., 2009. Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. Nucleic Acids Res. 37, 4850–4861.
- Bieberich, E., Freischütz, B., Liour, S.S., Yu, R.K., 1998. Regulation of ganglioside metabolism by phosphorylation and dephosphorylation. J. Neurochem. 71, 972–979.
- Bieberich, E., MacKinnon, S., Silva, J., Li, D.D., Tencomnao, T., Irwin, L., Kapitonov, D., Yu, R.K., 2002. Regulation of ganglioside biosynthesis by enzyme complex formation of glycosyltransferases. Biochemistry 41, 11479–11487.
- Bieberich, E., Tencomnao, T., Kapitonov, D., Yu, R.K., 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, R.K., 2000. Down-regulation of GD3 ganglioside and its Oacetylated 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, R.K., Aubry, J., 2003. Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. Biochimie 85, 455–463.
- Blennow, K., Davidsson, P., Wallin, A., Fredman, P., Gottfries, C.G., Karlsson, I., Månsson, J.E., Svennerholm, L., 1991. Gangliosides in cerebrospinal fluid in "probable Alzheimer"s disease'. Arch. Neurol. 48, 1032–1035.
- Blum, S., Hug, F., Hänsch, G.M., Wagner, C., 2005. Fibronectin on activated T lymphocytes is bound to gangliosides and is present in detergent insoluble microdomains. Immunol. Cell Biol. 83, 167–174.

- Bos, P.D., Zhang, X.H.-F., Nadal, C., Shu, W., Gomis, R.R., Nguyen, D.X., Minn, A.J., van de Vijver, M.J., Gerald, W.L., Foekens, J.A., Massagué, J., 2009. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. Nature 459, 1005–1009.
- Bosco, E.E., Wang, Y., Xu, H., Zilfou, J.T., Knudsen, K.E., Aronow, B.J., Lowe, S.W., Knudsen, E.S., 2007. The retinoblastoma tumor suppressor modifies the therapeutic response of breast cancer. J. Clin. Invest. 117, 218–228.
- Bouvier, J.D., Seyfried, T.N., 1989. Ganglioside composition of normal and mutant mouse embryos. J. Neurochem. 52, 460–466.
- Bremer, E.G., 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.
- Cailleau, R., Young, R., Olivé, M., Reeves, W.J., Jr, 1974. Breast tumor cell lines from pleural effusions. J. Natl. Cancer Inst. 53, 661–674.
- Caldon, C.E., Lee, C.S.L., Sutherland, R.L., Musgrove, E.A., 2008. Wilms' tumor protein 1: an early target of progestin regulation in T-47D breast cancer cells that modulates proliferation and differentiation. Oncogene 27, 126–138.
- Carcel-Trullols, J., Stanley, J.S., Saha, R., Shaaf, S., Bendre, M.S., Monzavi-Karbassi, B., Suva, L.J., 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, L.A., Dees, E.C., Sawyer, L., Gatti, L., Moore, D.T., Collichio, F., Ollila, D.W., Sartor, C.I., Graham, M.L., Perou, C.M., 2007. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. Clin. Cancer Res. 13, 2329–2334.
- Carroll, J.S., Liu, X.S., Brodsky, A.S., Li, W., Meyer, C.A., Szary, A.J., Eeckhoute, J., Shao, W., Hestermann, E.V., Geistlinger, T.R., Fox, E.A., Silver, P.A., Brown, M., 2005. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FoxA1. Cell 122, 33–43.
- Carroll, J.S., Meyer, C.A., Song, J., Li, W., Geistlinger, T.R., Eeckhoute, J., Brodsky, A.S., Keeton, E.K., Fertuck, K.C., Hall, G.F., Wang, Q., Bekiranov, S., Sementchenko, V., Fox, E.A., Silver, P.A., Gingeras, T.R., Liu, X.S., Brown, M., 2006. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. Nat. Genet. 38, 1289–1297.
- Cazet, A., Bobowski, M., Rombouts, Y., Lefebvre, J., Steenackers, A., Popa, I., Guérardel, Y., Le Bourhis, X., Tulasne, D., Delannoy, P., 2012. The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase. Glycobiology 22, 806–816.
- Cazet, A., Groux-Degroote, S., Teylaert, B., Kwon, K.-M., Lehoux, S., Slomianny, C., Kim, C.-H., 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., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J., Delannoy, P., 2010. Tumour-associated carbohydrate antigens in breast cancer. Breast Cancer Res. 12, 204.
- 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. 8, 1526–1535.
- Chapman, P.B., Wu, D., Ragupathi, G., Lu, S., Williams, L., Hwu, W.-J., Johnson, D., Livingston, P.O., 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., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.-H., Diebel, M.E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Viens, P., Xerri, L., Bertucci, F., Stassi, G., Dontu, G., Birnbaum, D., Wicha, M.S., 2009. Breast cancer cell lines contain func-

tional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. Cancer Res. 69, 1302–1313.

- Chatterjee, S., Pal, J.K., 2009. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. Biol. Cell 101, 251–262.
- Cheung, N.-K.V., Cheung, I.Y., Kushner, B.H., Ostrovnaya, I., Chamberlain, E., Kramer, K., Modak, S., 2012. Murine Anti-GD2 Monoclonal Antibody 3F8 Combined With Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and 13-Cis-Retinoic Acid in High-Risk Patients With Stage 4 Neuroblastoma in First Remission. J. Clin. Oncol.
- Chiavegatto, S., Sun, J., Nelson, R.J., Schnaar, R.L., 2000. A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. Exp. Neurol. 166, 227–234.
- Choi, H.-J., Chung, T.-W., Kang, N.-Y., Kim, K.-S., Lee, Y.-C., Kim, C.-H., 2003. Transcriptional regulation of the human GM3 synthase (hST3Gal V) gene during monocytic differentiation of HL-60 cells. FEBS Lett. 555, 204–208.
- Choi, H.-J., Chung, T.-W., Kang, N.-Y., Kim, K.-S., Lee, Y.-C., Kim, C.-H., 2004. Involvement of CREB in the transcriptional regulation of the human GM3 synthase (hST3Gal V) gene during megakaryocytoid differentiation of human leukemia K562 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313, 142–147.
- Connolly, R., Stearns, V., 2012. Epigenetics as a Therapeutic Target in Breast Cancer. Journal of mammary gland biology and neoplasia.
- Coskun, Ü., Grzybek, M., Drechsel, D., Simons, K., 2011. Regulation of human EGF receptor by lipids. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 9044–9048.
- Croce, M.V., Isla-Larrain, M., Rabassa, M.E., Demichelis, S., Colussi, A.G., Crespo, M., Lacunza, E., Segal-Eiras, A., 2007. Lewis x is highly expressed in normal tissues: a comparative immunohistochemical study and literature revision. Pathol. Oncol. Res. 13, 130–138.
- Cvoro, A., Tzagarakis-Foster, C., Tatomer, D., Paruthiyil, S., Fox, M.S., Leitman, D.C., 2006. Distinct roles of unliganded and liganded estrogen receptors in transcriptional repression. Mol. Cell 21, 555–564.
- Dae, H.-M., Kwon, H.-Y., Kang, N.-Y., Song, N.-R., Kim, K.-S., Kim, C.-H., Lee, J.-H., Lee, Y.-C., 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.
- Daniotti, J.L., Iglesias-Bartolomé, R., 2011. Metabolic pathways and intracellular trafficking of gangliosides. IUBMB Life 63, 513–520.
- Degroote, S., Wolthoorn, J., van Meer, G., 2004. The cell biology of glycosphingolipids. Semin. Cell Dev. Biol. 15, 375–387.
- Ding, L., Ellis, M.J., Li, S., Larson, D.E., Chen, K., et al., 2010. Genome remodelling in a basallike breast cancer metastasis and xenograft. Nature 464, 999–1005.
- Drobnik, W., Borsukova, H., Böttcher, A., Pfeiffer, A., Liebisch, G., Schütz, G.J., Schindler, H., Schmitz, G., 2002. Apo Al/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains. Traffic 3, 268–278.
- Eckhardt, B.L., Francis, P.A., Parker, B.S., Anderson, R.L., 2012. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. Nat Rev Drug Discov 11, 479–497.
- Eheman, C.R., Shaw, K.M., Ryerson, A.B., Miller, J.W., Ajani, U.A., White, M.C., 2009. The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 18, 1763–1769.
- Eidels, L., Proia, R.L., Hart, D.A., 1983. Membrane receptors for bacterial toxins. Microbiol. Rev. 47, 596–620.

- Feizi, T., Chai, W., 2004. Oligosaccharide microarrays to decipher the glyco code. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 5, 582–588.
- Fernandez, L.E., Gabri, M.R., Guthmann, M.D., Gomez, R.E., Gold, S., Fainboim, L., Gomez, D.E., Alonso, D.F., 2010. NGcGM3 ganglioside: a privileged target for cancer vaccines. Clin. Dev. Immunol. 2010, 814397.
- Fougère, M., Gaudineau, B., Barbier, J., Guaddachi, F., Feugeas, J.-P., Auboeuf, D., Jauliac, S., 2010. NFAT3 transcription factor inhibits breast cancer cell motility by targeting the Lipocalin 2 gene. Oncogene 29, 2292–2301.
- Frasor, J., Danes, J.M., Komm, B., Chang, K.C.N., Lyttle, C.R., Katzenellenbogen, B.S., 2003. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. Endocrinology 144, 4562–4574.
- Fuda, N.J., Ardehali, M.B., Lis, J.T., 2009. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. Nature 461, 186–192.
- 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.
- Furukawa, K., Hamamura, K., Ohkawa, Y., Ohmi, Y., Furukawa, K., 2012. Disialyl gangliosides enhance tumor phenotypes with differential modalities. Glycoconjugate journal.
- 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., Soejima, H., Niikawa, N., Shiku, H., 1996. Genomic organization and chromosomal assignment of the human beta1, 4-N-acetylgalactosaminyltransferase gene. Identification of multiple transcription units. J. Biol. Chem. 271, 20836–20844.
- Gibb, E.A., Vucic, E.A., Enfield, K.S.S., Stewart, G.L., Lonergan, K.M., Kennett, J.Y., Becker-Santos, D.D., MacAulay, C.E., Lam, S., Brown, C.J., Lam, W.L., 2011. Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. PLoS ONE 6, e25915.
- Gilles, C., Polette, M., Birembaut, P., Brünner, N., Thompson, E.W., 1997. Expression of c-ets-1 mRNA is associated with an invasive, EMT-derived phenotype in breast carcinoma cell lines. Clin. Exp. Metastasis 15, 519–526.
- Giraudo, C.G., Daniotti, J.L., Maccioni, H.J., 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, 1625–1630.
- Giraudo, C.G., Maccioni, H.J.F., 2003. Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells. J. Biol. Chem. 278, 40262–40271.
- Grant, S.C., Kostakoglu, L., Kris, M.G., Yeh, S.D., Larson, S.M., Finn, R.D., Oettgen, H.F., Cheung, N.V., 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.
- Grimm, M.O.W., Zinser, E.G., Grösgen, S., Hundsdörfer, B., Rothhaar, T.L., Burg, V.K., Kaestner, L., Bayer, T.A., Lipp, P., Müller, U., Grimm, H.S., Hartmann, T., 2012. Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. PLoS ONE 7, e34095.
- Gruber, C.J., Gruber, D.M., Gruber, I.M.L., Wieser, F., Huber, J.C., 2004. Anatomy of the estrogen response element. Trends Endocrinol. Metab. 15, 73–78.
- Gu, X., Preuss, U., Gu, T., Yu, R.K., 1995. Regulation of sialyltransferase activities by phosphorylation and dephosphorylation. J. Neurochem. 64, 2295–2302.
- Gu, Y., Zhang, J., Mi, W., Yang, J., Han, F., Lu, X., Yu, W., 2008. Silencing of GM3 synthase suppresses lung metastasis of murine breast cancer cells. Breast Cancer Res. 10, R1.

- Guenther, M.G., Barak, O., Lazar, M.A., 2001. The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3. Mol. Cell. Biol. 21, 6091–6101.
- Gupta, G., Surolia, A., 2010. Glycosphingolipids in microdomain formation and their spatial organization. FEBS Lett. 584, 1634–1641.
- Hackett, A.J., Smith, H.S., Springer, E.L., Owens, R.B., Nelson-Rees, W.A., Riggs, J.L., Gardner, M.B., 1977. Two syngeneic cell lines from human breast tissue: the aneuploid mammary epithelial (Hs578T) and the diploid myoepithelial (Hs578Bst) cell lines. J. Natl. Cancer Inst. 58, 1795–1806.
- Hakomori, S., 2004. Glycosynapses: microdomains controlling carbohydrate-dependent cell adhesion and signaling. An. Acad. Bras. Cienc. 76, 553–572.
- Hakomori Si, S., 2002. The glycosynapse. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 225–232.
- Hamamura, K., Furukawa, K., Hayashi, T., Hattori, T., Nakano, J., Nakashima, H., Okuda, T., Mizutani, H., Hattori, H., Ueda, M., Urano, T., Lloyd, K.O., 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.
- Hammache, D., Yahi, N., Piéroni, G., Ariasi, F., Tamalet, C., Fantini, J., 1998. Sequential interaction of CD4 and HIV-1 gp120 with a reconstituted membrane patch of ganglioside GM3: implications for the role of glycolipids as potential HIV-1 fusion cofactors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 246, 117–122.
- Han, Y., Yang, L., Suarez-Saiz, F., San-Marina, S., Cui, J., Minden, M.D., 2008. Wilms' tumor 1 suppressor gene mediates antiestrogen resistance via down-regulation of estrogen receptor-alpha expression in breast cancer cells. Mol. Cancer Res. 6, 1347–1355.
- Hanisch, F.G., Uhlenbruck, G., Peter-Katalinic, J., Egge, H., Dabrowski, J., Dabrowski, U., 1989. Structures of neutral O-linked polylactosaminoglycans 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. 264, 872–883.
- 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 (Pt 1), 273–280.
- Haraguchi, M., Yamashiro, S., Yamamoto, A., Furukawa, K., Takamiya, K., Lloyd, K.O., Shiku, H., Furukawa, K., 1994. Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 10455–10459.
- Harduin-Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi, M.A., Samyn-Petit, B., Julien, S., Delannoy, P., 2001. The human sialyltransferase family. Biochimie 83, 727–737.
- Hatano, K., Miyamoto, Y., Mori, M., Nimura, K., Nakai, Y., Nonomura, N., Kaneda, Y., 2012. Androgen-regulated transcriptional control of sialyltransferases in prostate cancer cells. PLoS ONE 7, e31234.
- Hebbar, M., Krzewinski-Recchi, M.A., Hornez, L., Verdière, A., Harduin-Lepers, A., Bonneterre, J., Delannoy, P., Peyrat, J.P., 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.
- Ichikawa, N., Iwabuchi, K., Kurihara, H., Ishii, K., Kobayashi, T., Sasaki, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Hozumi, K., Yamada, Y., Arikawa-Hirasawa, E., 2009a. Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. J. Cell. Sci. 122, 289–299.
- Ichikawa, N., Iwabuchi, K., Kurihara, H., Ishii, K., Kobayashi, T., Sasaki, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Hozumi, K., Yamada, Y., Arikawa-Hirasawa, E., 2009b. Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. J. Cell. Sci. 122, 289–299.

- Irie, F., Hashikawa, T., Tai, T., Seyama, Y., Hirabayashi, Y., 1994. Distribution of cholinergic neuron-specific gangliosides (GT1a alpha and GQ1b alpha) in the rat central nervous system. Brain Res. 665, 161–166.
- Ishii, A., Ikeda, T., Hitoshi, S., Fujimoto, I., Torii, T., Sakuma, K., Nakakita, S., Hase, S., Ikenaka, K., 2007. Developmental changes in the expression of glycogenes and the content of Nglycans in the mouse cerebral cortex. Glycobiology 17, 261–276.
- Jeschke, U., Mylonas, I., Shabani, N., Kunert-Keil, C., Schindlbeck, C., Gerber, B., Friese, K., 2005. 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. 25, 1615–1622.
- Jin, H.J., Nam, H.Y., Bae, Y.K., Kim, S.Y., Im, I.R., Oh, W., Yang, Y.S., Choi, S.J., Kim, S.W., 2010. GD2 expression is closely associated with neuronal differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. Cell. Mol. Life Sci. 67, 1845–1858.
- Julien, S., Adriaenssens, E., Ottenberg, K., Furlan, A., Courtand, G., Vercoutter-Edouart, A.-S., Hanisch, F.-G., 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., 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., Lagadec, C., Krzewinski-Recchi, M.-A., Courtand, G., Le Bourhis, X., Delannoy, P., 2005. 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. 90, 77–84.
- Julien, S., Picco, G., Sewell, R., Vercoutter-Edouart, A.-S., Tarp, M., Miles, D., Clausen, H., Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J.M., 2009. Sialyl-Tn vaccine induces antibody-mediated tumour protection in a relevant murine model. Br. J. Cancer 100, 1746–1754.
- Jung, J.-U., Ko, K., Lee, D.-H., Ko, K., Chang, K.-T., Choo, Y.-K., 2009. The roles of glycosphingolipids in the proliferation and neural differentiation of mouse embryonic stem cells. Exp. Mol. Med. 41, 935–945.
- 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.
- Kang, N.-Y., Kim, C.-H., Kim, K.-S., Ko, J.-H., Lee, J.-H., Jeong, Y.-K., Lee, Y.-C., 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.
- Kaucic, K., Liu, Y., Ladisch, S., 2006. Modulation of growth factor signaling by gangliosides: positive or negative? Meth. Enzymol. 417, 168–185.
- Kawai, H., Sango, K., Mullin, K.A., Proia, R.L., 1998. Embryonic stem cells with a disrupted GD3 synthase gene undergo neuronal differentiation in the absence of b-series gangliosides. J. Biol. Chem. 273, 19634–19638.
- Kawashima, N., Yoon, S.-J., 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.
- Kazarian, T., Jabbar, A.A., Wen, F.-Q., Patel, D.A., Valentino, L.A., 2003. Gangliosides regulate tumor cell adhesion to collagen. Clin. Exp. Metastasis 20, 311–319.
- Keeton, E.K., Brown, M., 2005. Cell cycle progression stimulated by tamoxifen-bound estrogen receptor-alpha and promoter-specific effects in breast cancer cells deficient in N-CoR and SMRT. Mol. Endocrinol. 19, 1543–1554.
- Kelly, W.K., O'Connor, O.A., Krug, L.M., Chiao, J.H., Heaney, M., Curley, T., MacGregore-Cortelli, B., Tong, W., Secrist, J.P., Schwartz, L., Richardson, S., Chu, E., Olgac, S., Marks, P.A., Scher, H., Richon, V.M., 2005. Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. J. Clin. Oncol. 23, 3923–3931.
- Kim, K.W., Kim, S.W., Min, K.S., Kim, C.H., Lee, Y.C., 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, Y.J., Kim, K.S., Do, S., Kim, C.H., Kim, S.K., Lee, Y.C., 1997. Molecular cloning and expression of human alpha2,8-sialyltransferase (hST8Sia V). Biochem. Biophys. Res. Commun. 235, 327–330.
- Klassen, H., Schwartz, M.R., Bailey, A.H., Young, M.J., 2001. Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. Neurosci. Lett. 312, 180–182.
- Knappskog, S., Lønning, P.E., 2012. P53 and its molecular basis to chemoresistance in breast cancer. Expert Opin. Ther. Targets 16 Suppl 1, S23–30.
- 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.
- Kohla G., Schauer R., 2005. Sialic acids in gangliosides : origin and function. Neuroglycobiology, Chapter 6 http://www.uni-kiel.de/Biochemie/AGSch/pdf/reviews/77_KohlaS05.pdf
- Kozak, M., 1989. The scanning model for translation: an update. J. Cell Biol. 108, 229-241.
- Kracun, I., Rosner, H., Drnovsek, V., Heffer-Lauc, M., Cosović, C., Lauc, G., 1991. Human brain gangliosides in development, aging and disease. Int. J. Dev. Biol. 35, 289–295.
- Krishnan, V., Wang, X., Safe, S., 1994. Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogeninduced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. J. Biol. Chem. 269, 15912–15917.
- Kumar, V., 2007. Robbins basic pathology. Saunders/Elsevier, Philadelphia.
- Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, A.K., Uht, R.M., Webb, P., 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 74, 311–317.
- Kwak, D.H., Seo, B.B., Chang, K.T., Choo, Y.K., 2011. Roles of gangliosides in mouse embryogenesis and embryonic stem cell differentiation. Exp. Mol. Med. 43, 379–388.
- Kwon, H., Kang, N., Dae, H., Kim, K., Kim, C., Do, S., Lee, Y., 2008. Valproic acid-mediated transcriptional regulation of human GM3 synthase (hST3Gal V) in SK-N-BE(2)-C human neuroblastoma cells. Acta Pharmacol. Sin. 29, 999–1005.
- Kwon, H.-Y., Dae, H.-M., Song, N.-R., Kim, K.-S., Kim, C.-H., Lee, Y.-C., 2009. Valproic acid induces transcriptional activation of human GD3 synthase (hST8Sia I) in SK-N-BE(2)-C human neuroblastoma cells. Mol. Cells 27, 113–118.
- 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.
- Lapidus, R.G., Nass, S.J., Butash, K.A., Parl, F.F., Weitzman, S.A., Graff, J.G., Herman, J.G., Davidson, N.E., 1998. Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction. Cancer Res. 58, 2515–2519.
- Leitman, D.C., Paruthiyil, S., Yuan, C., Herber, C.B., Olshansky, M., Tagliaferri, M., Cohen, I., Speed, T.P., 2012. Tissue-specific regulation of genes by estrogen receptors. Semin. Reprod. Med. 30, 14–22.

- Lin, C.-Y., Vega, V.B., Thomsen, J.S., Zhang, T., Kong, S.L., Xie, M., Chiu, K.P., Lipovich, L., Barnett, D.H., Stossi, F., Yeo, A., George, J., Kuznetsov, V.A., Lee, Y.K., Charn, T.H., Palanisamy, N., Miller, L.D., Cheung, E., Katzenellenbogen, B.S., Ruan, Y., Bourque, G., Wei, C.-L., Liu, E.T., 2007. Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. PLoS Genet. 3, e87.
- Lindemann, K., Resau, J., Nährig, J., Kort, E., Leeser, B., Annecke, K., Welk, A., Schäfer, J., Vande Woude, G.F., Lengyel, E., Harbeck, N., 2007. Differential expression of c-Met, its ligand HGF/SF and HER2/neu in DCIS and adjacent normal breast tissue. Histopathology 51, 54–62.
- Lo, A.S.Y., Ma, Q., Liu, D.L., Junghans, R.P., 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.
- Lonard, D.M., Lanz, R.B., O'Malley, B.W., 2007. Nuclear receptor coregulators and human disease. Endocr. Rev. 28, 575–587.
- Lord, C.J., Ashworth, A., 2012. The DNA damage response and cancer therapy. Nature 481, 287–294.
- Lucci, A., Krishnamurthy, S., Singh, B., Bedrosian, I., Meric-Bernstam, F., Reuben, J., Broglio, K., Mosalpuria, K., Lodhi, A., Vincent, L., Cristofanilli, M., 2009. Cyclooxygenase-2 expression in primary breast cancers predicts dissemination of cancer cells to the bone marrow. Breast Cancer Res. Treat. 117, 61–68.
- Maccioni, H.J.F., Quiroga, R., Spessott, W., 2011. Organization of the synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex. FEBS Lett. 585, 1691–1698.
- Malisan, F., Testi, R., 2002. GD3 ganglioside and apoptosis. Biochim. Biophys. Acta 1585, 179– 187.
- Marcato, P., Dean, C.A., Pan, D., Araslanova, R., Gillis, M., Joshi, M., Helyer, L., Pan, L., Leidal, A., Gujar, S., Giacomantonio, C.A., Lee, P.W.K., 2011. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. Stem Cells 29, 32–45.
- Marconi, S., Acler, M., Lovato, L., De Toni, L., Tedeschi, E., Anghileri, E., Romito, S., Cordioli, C., Bonetti, B., 2006. Anti-GD2-like IgM autoreactivity in multiple sclerosis patients. Mult. Scler. 12, 302–308.
- Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L.E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., Perez, R., Ando, S., 1996. Gangliosides expressed in human breast cancer. Cancer Res. 56, 5165–5171.
- Martina, J.A., Daniotti, J.L., Maccioni, H.J., 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, J.A., Daniotti, J.L., Maccioni, H.J., 2000. GM1 synthase depends on N-glycosylation for enzyme activity and trafficking to the Golgi complex. Neurochem. Res. 25, 725–731.
- Martini, P.G., Katzenellenbogen, B.S., 2001. Regulation of prothymosin alpha gene expression by estrogen in estrogen receptor-containing breast cancer cells via upstream halfpalindromic estrogen response element motifs. Endocrinology 142, 3493–3501.
- Masiakowski, P., Breathnach, R., Bloch, J., Gannon, F., Krust, A., Chambon, P., 1982. Cloning of cDNA sequences of hormone-regulated genes from the MCF-7 human breast cancer cell line. Nucleic Acids Res. 10, 7895–7903.
- Mayo, M.W., Baldwin, A.S., 2000. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. Biochim. Biophys. Acta 1470, M55–62.
- McKay, L.I., Cidlowski, J.A., 1998. Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism. Mol. Endocrinol. 12, 45–56.
- Merrell, K.W., Crofts, J.D., Smith, R.L., Sin, J.H., Kmetzsch, K.E., Merrell, A., Miguel, R.O., Candelaria, N.R., Lin, C.-Y., 2011. Differential recruitment of nuclear receptor

coregulators in ligand-dependent transcriptional repression by estrogen receptor- α . On-cogene 30, 1608–1614.

- Metzger-Filho, O., Tutt, A., de Azambuja, E., Saini, K.S., Viale, G., Loi, S., Bradbury, I., Bliss, J.M., Azim, H.A., Jr, Ellis, P., Di Leo, A., Baselga, J., Sotiriou, C., Piccart-Gebhart, M., 2012. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. J. Clin. Oncol. 30, 1879–1887.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., Pesole, G., 2002. Untranslated regions of mRNAs. Genome Biol. 3, REVIEWS0004.
- Miljan, E.A., Bremer, E.G., 2002. Regulation of growth factor receptors by gangliosides. Sci. STKE 2002, re15.
- Miljan, E.A., Meuillet, E.J., Mania-Farnell, B., George, D., Yamamoto, H., Simon, H.-G., Bremer, E.G., 2002. Interaction of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor with gangliosides. J. Biol. Chem. 277, 10108–10113.
- Millikan, R.C., Newman, B., Tse, C.-K., Moorman, P.G., Conway, K., Dressler, L.G., Smith, L.V., Labbok, M.H., Geradts, J., Bensen, J.T., Jackson, S., Nyante, S., Livasy, C., Carey, L., Earp, H.S., Perou, C.M., 2008. Epidemiology of basal-like breast cancer. Breast Cancer Res. Treat. 109, 123–139.
- Mitchell, J.S., Brown, W.S., Woodside, D.G., Vanderslice, P., McIntyre, B.W., 2009. Clustering Tcell GM1 lipid rafts increases cellular resistance to shear on fibronectin through changes in integrin affinity and cytoskeletal dynamics. Immunol. Cell Biol. 87, 324–336.
- Mitra, A.K., Sawada, K., Tiwari, P., Mui, K., Gwin, K., Lengyel, E., 2011. Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and $\alpha(5)\beta(1)$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. Oncogene 30, 1566–1576.
- Mitsuda, T., Furukawa, K., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Urano, T., Furukawa, K., 2002. Overexpression of ganglioside GM1 results in the dispersion of platelet-derived growth factor receptor from glycolipid-enriched microdomains and in the suppression of cell growth signals. J. Biol. Chem. 277, 11239–11246.
- Mitsuzuka, K., Handa, K., Satoh, M., Arai, Y., Hakomori, S., 2005. A specific microdomain ("glycosynapse 3") controls phenotypic conversion and reversion of bladder cancer cells through GM3-mediated interaction of alpha3beta1 integrin with CD9. J. Biol. Chem. 280, 35545–35553.
- 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.
- Miyoshi, Y., Ando, A., Egawa, C., Taguchi, T., Tamaki, Y., Tamaki, H., Sugiyama, H., Noguchi, S., 2002. High expression of Wilms' tumor suppressor gene predicts poor prognosis in breast cancer patients. Clin. Cancer Res. 8, 1167–1171.
- Molander-Melin, M., Blennow, K., Bogdanovic, N., Dellheden, B., Månsson, J.-E., Fredman, P., 2005. Structural membrane alterations in Alzheimer brains found to be associated with regional disease development; increased density of gangliosides GM1 and GM2 and loss of cholesterol in detergent-resistant membrane domains. J. Neurochem. 92, 171–182.
- Munster, P.N., Thurn, K.T., Thomas, S., Raha, P., Lacevic, M., Miller, A., Melisko, M., Ismail-Khan, R., Rugo, H., Moasser, M., Minton, S.E., 2011. A phase II study of the histone deacetylase inhibitor vorinostat combined with tamoxifen for the treatment of patients with hormone therapy-resistant breast cancer. Br. J. Cancer 104, 1828–1835.
- Mutoh, T., Tokuda, A., Miyadai, T., Hamaguchi, M., Fujiki, N., 1995. Ganglioside GM1 binds to the Trk protein and regulates receptor function. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 5087–5091.
- Nairn, A.V., York, W.S., Harris, K., Hall, E.M., Pierce, J.M., Moremen, K.W., 2008. Regulation of glycan structures in animal tissues: transcript profiling of glycan-related genes. J. Biol. Chem. 283, 17298–17313.

- Nakamura, K., Kojima, H., Suzuki, M., Suzuki, A., Tamai, Y., 2000. Novel polysialogangliosides of skate brain structural determination of tetra, penta and hexasialogangliosides with a NeuAc-GalNAc linkage. Eur. J. Biochem. 267, 5198–5208.
- Nakano, J., Yasui, H., Lloyd, K.O., 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, 173–176.
- Nakatani, Y., Yanagisawa, M., Suzuki, Y., Yu, R.K., 2010. Characterization of GD3 ganglioside as a novel biomarker of mouse neural stem cells. Glycobiology 20, 78–86.
- Nakayama, J., Fukuda, M.N., 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., Kawashima, I., Tai, T., Nagai, Y., Sanai, Y., 1996. Acceptor substrate specificity of a cloned GD3 synthase that catalyzes the biosynthesis of both GD3 and GD1c/GT1a/GQ1b. Eur. J. Biochem. 238, 647–652.
- Nara, K., Watanabe, Y., Maruyama, K., Kasahara, K., Nagai, Y., Sanai, Y., 1994. Expression cloning of a CMP-NeuAc:NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-4Glc beta 1-1'Cer alpha 2,8sialyltransferase (GD3 synthase) from human melanoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 7952–7956.
- Nasi, M.L., Meyers, M., Livingston, P.O., Houghton, A.N., Chapman, P.B., 1997. Anti-melanoma effects of R24, a monoclonal antibody against GD3 ganglioside. Melanoma Res. 7 Suppl 2, S155–162.
- Navid, F., Santana, V.M., Barfield, R.C., 2010. Anti-GD2 antibody therapy for GD2-expressing tumors. Curr Cancer Drug Targets 10, 200–209.
- Ngamukote, S., Yanagisawa, M., Ariga, T., Ando, S., Yu, R.K., 2007. Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycogenes in mouse brains. J. Neurochem. 103, 2327–2341.
- Nguyen, D.X., Bos, P.D., Massagué, J., 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. Nat. Rev. Cancer 9, 274–284.
- Niimi, K., Nishioka, C., Miyamoto, T., Takahashi, E., Miyoshi, I., Itakura, C., Yamashita, T., 2011. Impairment of neuropsychological behaviors in ganglioside GM3-knockout mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 406, 524–528.
- Oblinger, J.L., Pearl, D.K., Boardman, C.L., Saqr, H., Prior, T.W., Scheithauer, B.W., Jenkins, R.B., Burger, P.C., Yates, A.J., 2006. Diagnostic and prognostic value of glycosyltransferase mRNA in glioblastoma multiforme patients. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 32, 410–418.
- Ogden, A.T., Waziri, A.E., Lochhead, R.A., Fusco, D., Lopez, K., Ellis, J.A., Kang, J., Assanah, M., McKhann, G.M., Sisti, M.B., McCormick, P.C., Canoll, P., Bruce, J.N., 2008. Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. Neurosurgery 62, 505–514; discussion 514–515.
- Ohmi, Y., Ohkawa, Y., Yamauchi, Y., Tajima, O., Furukawa, K., Furukawa, K., 2012. Essential roles of gangliosides in the formation and maintenance of membrane microdomains in brain tissues. Neurochem. Res. 37, 1185–1191.
- Ohmi, Y., Tajima, O., Ohkawa, Y., Yamauchi, Y., Sugiura, Y., Furukawa, K., Furukawa, K., 2011. Gangliosides are essential in the protection of inflammation and neurodegeneration via maintenance of lipid rafts: elucidation by a series of ganglioside-deficient mutant mice. J. Neurochem. 116, 926–935.
- Ohtani, Y., Tamai, Y., Ohnuki, Y., Miura, S., 1996. Ganglioside alterations in the central and peripheral nervous systems of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. Neurodegeneration 5, 331–338.
- Okada, M., Itoh Mi, M., Haraguchi, M., Okajima, T., Inoue, M., Oishi, H., Matsuda, Y., Iwamoto, T., Kawano, T., Fukumoto, S., Miyazaki, H., Furukawa, K., Aizawa, S., Furukawa, K.,

2002. b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. J. Biol. Chem. 277, 1633–1636.

- Okada, T., Wakabayashi, M., Ikeda, K., Matsuzaki, K., 2007. Formation of toxic fibrils of Alzheimer's amyloid beta-protein-(1-40) by monosialoganglioside GM1, a neuronal membrane component. J. Mol. Biol. 371, 481–489.
- Okajima, T., Chen, H.H., Ito, H., Kiso, M., Tai, T., Furukawa, K., Urano, T., Furukawa, K., 2000. Molecular cloning and expression of mouse GD1alpha/GT1aalpha/GQ1balpha synthase (ST6GalNAc VI) gene. J. Biol. Chem. 275, 6717–6723.
- Oliva, J.P., Valdés, Z., Casacó, A., Pimentel, G., González, 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, A.M., Mateos, C., Rubio, M.C., Pérez, R., Fernández, L.E., 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., Jukkola-Vuorinen, A., Niederacher, D., Kato, S., Ishioka, C., Hainaut, P., Børresen-Dale, A.-L., 2006. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. Clin. Cancer Res. 12, 1157–1167.
- Pan, B., Fromholt, S.E., Hess, E.J., Crawford, T.O., Griffin, J.W., Sheikh, K.A., 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.
- Papini, N., Anastasia, L., Tringali, C., Croci, G., Bresciani, R., Yamaguchi, K., Miyagi, T., Preti, A., Prinetti, A., Prioni, S., Sonnino, S., Tettamanti, G., Venerando, B., Monti, E., 2004. The plasma membrane-associated sialidase MmNEU3 modifies the ganglioside pattern of adjacent cells supporting its involvement in cell-to-cell interactions. J. Biol. Chem. 279, 16989–16995.
- Parker, J.S., Mullins, M., Cheang, M.C.U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., Davies, S., Fauron, C., He, X., Hu, Z., Quackenbush, J.F., Stijleman, I.J., Palazzo, J., Marron, J.S., Nobel, A.B., Mardis, E., Nielsen, T.O., Ellis, M.J., Perou, C.M., Bernard, P.S., 2009. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. J. Clin. Oncol. 27, 1160–1167.
- Perou, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S.X., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., Brown, P.O., Botstein, D., 2000. Molecular portraits of human breast tumours. Nature 406, 747–752.
- Peyrat, J.P., Recchi, M.A., Hebbar, M., Pawlowski, V., Hornez, L., Dong-Lebouhris, X., Hondermarck, H., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., 2000. Regulation of sialyltransferase expression by estradiol and 4-OH-tamoxifen in the human breast cancer cell MCF-7. Mol. Cell Biol. Res. Commun. 3, 48–52.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29, e45.
- Pilar Rauter, A., Kren, V., Royal Society of Chemistry (Great Britain), 2011. Carbohydrate chemistry. chemical and biological approaches Volume 37. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- Porter, W., Wang, F., Wang, W., Duan, R., Safe, S., 1996. Role of estrogen receptor/Sp1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. Mol. Endocrinol. 10, 1371–1378.
- Portoukalian, J., Zwingelstein, G., Doré, J.F., 1979. Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. Eur. J. Biochem. 94, 19–23.

- Prasad, S., Ravindran, J., Aggarwal, B.B., 2010. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. Mol. Cell. Biochem. 336, 25–37.
- Prat, A., Perou, C.M., 2011. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Mol Oncol 5, 5–23.
- Pratt, M.A.C., Bishop, T.E., White, D., Yasvinski, G., Ménard, M., Niu, M.Y., Clarke, R., 2003. Estrogen withdrawal-induced NF-kappaB activity and bcl-3 expression in breast cancer cells: roles in growth and hormone independence. Mol. Cell. Biol. 23, 6887–6900.
- Prinetti, A., Loberto, N., Chigorno, V., Sonnino, S., 2009. Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. Biochim. Biophys. Acta 1788, 184–193.
- Puryear, W.B., Yu, X., Ramirez, N.P., Reinhard, B.M., Gummuluru, S., 2012. HIV-1 incorporation of host-cell-derived glycosphingolipid GM3 allows for capture by mature dendritic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, 7475–7480.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., Werner, T., 1995. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. Nucleic Acids Res. 23, 4878–4884.
- Quintana, A.M., Liu, F., O'Rourke, J.P., Ness, S.A., 2011. Identification and regulation of c-Myb target genes in MCF-7 cells. BMC Cancer 11, 30.
- Rabu, C., McIntosh, R., Jurasova, Z., Durrant, L., 2012. Glycans as targets for therapeutic antitumor antibodies. Future Oncol 8, 943–960.
- Raghav, K.P., Wang, W., Liu, S., Chavez-MacGregor, M., Meng, X., Hortobagyi, G.N., Mills, G.B., Meric-Bernstam, F., Blumenschein, G.R., Jr, Gonzalez-Angulo, A.M., 2012. cMET and phospho-cMET protein levels in breast cancers and survival outcomes. Clin. Cancer Res. 18, 2269–2277.
- Ramkumar, T., Adler, S., 1995. Differential positive and negative transcriptional regulation by tamoxifen. Endocrinology 136, 536–542.
- Ravindranath, M.H., Tsuchida, T., Morton, D.L., Irie, R.F., 1991. Ganglioside GM3:GD3 ratio as an index for the management of melanoma. Cancer 67, 3029–3035.
- Ray, B.K., Dhar, S., Shakya, A., Ray, A., 2011. Z-DNA-forming silencer in the first exon regulates human ADAM-12 gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 103–108.
- Ray, S., Pollard, J.W., 2012. KLF15 negatively regulates estrogen-induced epithelial cell proliferation by inhibition of DNA replication licensing. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 109, E1334– 1343.
- Reader, J., Holt, D., Fulton, A., 2011. Prostaglandin E2 EP receptors as therapeutic targets in breast cancer. Cancer Metastasis Rev. 30, 449–463.
- Regina Todeschini, A., Hakomori, S., 2008. Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains. Biochim. Biophys. Acta 1780, 421–433.
- Renkonen, J., Paavonen, T., Renkonen, R., 1997. Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis(x) and sialyl Lewis(a) in lesions of breast carcinoma. Int. J. Cancer 74, 296–300.
- Rochefort, H., Glondu, M., Sahla, M.E., Platet, N., Garcia, M., 2003. How to target estrogen receptor-negative breast cancer? Endocr. Relat. Cancer 10, 261–266.
- Roepstorff, K., Thomsen, P., Sandvig, K., van Deurs, B., 2002. Sequestration of epidermal growth factor receptors in non-caveolar lipid rafts inhibits ligand binding. J. Biol. Chem. 277, 18954–18960.
- Rouzier, R., Perou, C.M., Symmans, W.F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K.R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., Morandi, P., Fan, C., Rabiul, I., Ross, J.S., Hortobagyi, G.N., Pusztai, L., 2005. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. Clin. Cancer Res. 11, 5678–5685.
- Roy, P.G., Thompson, A.M., 2006. Cyclin D1 and breast cancer. Breast 15, 718–727.

- Ruan, S., Raj, B.K., 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., 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.
- 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.
- 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. U.S.A. 99, 4367–4372.
- Saito, M., Yu, R.K., Cheung, N.K., 1985. Ganglioside GD2 specificity of monoclonal antibodies to human neuroblastoma cell. Biochem. Biophys. Res. Commun. 127, 1–7.
- Sandhoff, K., 2001. The GM2-gangliosidoses and the elucidation of the beta-hexosaminidase system. Adv. Genet. 44, 67–91.
- Santen, R.J., Allred, D.C., Ardoin, S.P., Archer, D.F., Boyd, N., Braunstein, G.D., Burger, H.G., Colditz, G.A., Davis, S.R., Gambacciani, M., Gower, B.A., Henderson, V.W., Jarjour, W.N., Karas, R.H., Kleerekoper, M., Lobo, R.A., Manson, J.E., Marsden, J., Martin, K.A., Martin, L., Pinkerton, J.V., Rubinow, D.R., Teede, H., Thiboutot, D.M., Utian, W.H., 2010. Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement. J. Clin. Endocrinol. Metab. 95, s1–s66.
- Sasaki, K., Kurata, K., Kojima, N., Kurosawa, N., Ohta, S., Hanai, N., Tsuji, S., Nishi, T., 1994. Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase). J. Biol. Chem. 269, 15950–15956.
- Schallus, T., Jaeckh, C., Fehér, K., Palma, A.S., Liu, Y., Simpson, J.C., Mackeen, M., Stier, G., Gibson, T.J., Feizi, T., Pieler, T., Muhle-Goll, C., 2008. Malectin: a novel carbohydratebinding protein of the endoplasmic reticulum and a candidate player in the early steps of protein N-glycosylation. Mol. Biol. Cell 19, 3404–3414.
- Scharnhorst, V., van der Eb, A.J., Jochemsen, A.G., 2001. WT1 proteins: functions in growth and differentiation. Gene 273, 141–161.
- Schauer, R., 2009. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. Curr. Opin. Struct. Biol. 19, 507–514.
- Scheideler, M.A., Dawson, G., 1986. Direct demonstration of the activation of UDP-Nacetylgalactosamine: [GM3]N-acetylgalactosaminyltransferase by cyclic AMP. J. Neurochem. 46, 1639–1643.
- Schmitt, F.C., Figueiredo, P., Lacerda, M., 1995. Simple mucin-type carbohydrate antigens (T, sialosyl-T, Tn and sialosyl-Tn) in breast carcinogenesis. Virchows Arch. 427, 251–258.
- Scott, A.M., Liu, Z., Murone, C., Johns, T.G., MacGregor, D., Smyth, F.E., Lee, F.-T., Cebon, J., Davis, I.D., Hopkins, W., Mountain, A.J., Rigopoulos, A., Hanai, N., Old, L.J., 2005. Immunological effects of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma. Cancer Immun. 5, 3.
- Sekimoto, J., Kabayama, K., Gohara, K., Inokuchi, J., 2012. Dissociation of the insulin receptor from caveolae during TNFα-induced insulin resistance and its recovery by D-PDMP. FEBS Lett. 586, 191–195.
- Shirure, V.S., Henson, K.A., Schnaar, R.L., Nimrichter, L., Burdick, M.M., 2011. Gangliosides expressed on breast cancer cells are E-selectin ligands. Biochem. Biophys. Res. Commun. 406, 423–429.

- Sihto, H., Lundin, J., Lundin, M., Lehtimäki, T., Ristimäki, A., Holli, K., Sailas, L., Kataja, V., Turpeenniemi-Hujanen, T., Isola, J., Heikkilä, P., Joensuu, H., 2011. Breast cancer biological subtypes and protein expression predict for the preferential distant metastasis sites: a nationwide cohort study. Breast Cancer Res. 13, R87.
- Singh, B., Berry, J.A., Shoher, A., Ayers, G.D., Wei, C., Lucci, A., 2007. COX-2 involvement in breast cancer metastasis to bone. Oncogene 26, 3789–3796.
- Smith, H.S., 1979. In vitro properties of epithelial cell lines established from human carcinomas and nonmalignant tissue. J. Natl. Cancer Inst. 62, 225–230.
- Song, N., Kim, S.-J., Kwon, H.-Y., Son, S.-W., Kim, K.-S., Ahn, H.-B., Lee, Y.-C., 2011. Transcriptional activation of human GM3 synthase (hST3Gal V) gene by valproic acid in ARPE-19 human retinal pigment epithelial cells. BMB Rep 44, 405–409.
- Sonnino, S., Aureli, M., Loberto, N., Chigorno, V., Prinetti, A., 2010. Fine tuning of cell functions through remodeling of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycohydrolases. FEBS Lett. 584, 1914–1922.
- Sørlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L., 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98, 10869–10874.
- Sottocornola, E., Colombo, I., Vergani, V., Taraboletti, G., Berra, B., 1998. Increased tumorigenicity and invasiveness of C6 rat glioma cells transfected with the human alpha-2,8 sialyltransferase cDNA. Invasion Metastasis 18, 142–154.
- Sovak, M.A., Bellas, R.E., Kim, D.W., Zanieski, G.J., Rogers, A.E., Traish, A.M., Sonenshein, G.E., 1997. Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer. J. Clin. Invest. 100, 2952–2960.
- Spessott, W., Crespo, P.M., Daniotti, J.L., Maccioni, H.J.F., 2012. Glycosyltransferase complexes improve glycolipid synthesis. FEBS Lett. 586, 2346–2350.
- Springer, G.F., 1984. T and Tn, general carcinoma autoantigens. Science 224, 1198–1206.
- Suzuki, J., Chen, Y.-Y., Scott, G.K., Devries, S., Chin, K., Benz, C.C., Waldman, F.M., Hwang, E.S., 2009. Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. Clin. Cancer Res. 15, 3163–3171.
- Suzuki, Y., Yanagisawa, M., Ariga, T., Yu, R.K., 2011. Histone acetylation-mediated glycosyltransferase gene regulation in mouse brain during development. J. Neurochem. 116, 874–880.
- Svennerholm, L., 1980. Ganglioside designation. Adv. Exp. Med. Biol. 125, 11.
- SVENNERHOLM, L., 1964. THE GANGLIOSIDES. J. Lipid Res. 5, 145–155.
- Tagami, S., Inokuchi Ji, J., Kabayama, K., Yoshimura, H., Kitamura, F., Uemura, S., Ogawa, 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.
- Tajima, O., Egashira, N., Ohmi, Y., Fukue, Y., Mishima, K., Iwasaki, K., Fujiwara, M., Inokuchi, J., Sugiura, Y., Furukawa, K., Furukawa, K., 2009. Reduced motor and sensory functions and emotional response in GM3-only mice: emergence from early stage of life and exacerbation with aging. Behav. Brain Res. 198, 74–82.
- Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Furukawa, K., Aizawa, S., 1996. Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 10662–10667.
- Tao, K., Fang, M., Alroy, J., Sahagian, G.G., 2008. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. BMC Cancer 8, 228.

- Tchoghandjian, A., Baeza, N., Colin, C., Cayre, M., Metellus, P., Beclin, C., Ouafik, L., Figarella-Branger, D., 2010. A2B5 cells from human glioblastoma have cancer stem cell properties. Brain Pathol. 20, 211–221.
- Tencomnao, T., Kapitonov, D., Bieberich, E., Yu, R.K., 2004. Transcriptional regulation of the human UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase (hCGT) gene expression: functional role of GC-box and CRE. Glycoconj. J. 20, 339–351.
- Tencomnao, T., Yu, R.K., Kapitonov, D., 2001. Characterization of the human UDPgalactose:ceramide galactosyltransferase gene promoter. Biochim. Biophys. Acta 1517, 416–423.
- Tettamanti, G., 2004. Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. Glycoconj. J. 20, 301–317.
- Thampoe, I.J., Furukawa, K., Vellvé, E., Lloyd, K.O., 1989. Sialyltransferase levels and ganglioside expression in melanoma and other cultured human cancer cells. Cancer Res. 49, 6258–6264.
- Todeschini, A.R., Dos Santos, J.N., Handa, K., Hakomori, S., 2007. Ganglioside GM2tetraspanin 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, A.R., Dos Santos, J.N., Handa, K., Hakomori, S., 2008a. 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.
- Todeschini, A.R., Dos Santos, J.N., Handa, K., Hakomori, S., 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.
- Uchida, Y., Itoh, M., Taguchi, Y., Yamaoka, S., Umehara, H., Ichikawa, S.-I., Hirabayashi, Y., Holleran, W.M., Okazaki, T., 2004. Ceramide reduction and transcriptional up-regulation of glucosylceramide synthase through doxorubicin-activated Sp1 in drug-resistant HL-60/ADR cells. Cancer Res. 64, 6271–6279.
- Uliana, A.S., Crespo, P.M., Martina, J.A., Daniotti, J.L., Maccioni, H.J.F., 2006. Modulation of GaIT1 and SiaIT1 sub-Golgi localization by SiaIT2 expression reveals an organellar level of glycolipid synthesis control. J. Biol. Chem. 281, 32852–32860.
- Valaperta, R., Chigorno, V., Basso, L., Prinetti, A., Bresciani, R., Preti, A., Miyagi, T., Sonnino, S., 2006. Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts. FASEB J. 20, 1227–1229.
- Van Brocklyn, J., Bremer, E.G., Yates, A.J., 1993. Gangliosides inhibit platelet-derived growth factor-stimulated receptor dimerization in human glioma U-1242MG and Swiss 3T3 cells. J. Neurochem. 61, 371–374.
- Vandenhaute, E., Sevin, E., Hallier-Vanuxeem, D., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., 2012. Case study: adapting in vitro blood-brain barrier models for use in early-stage drug discovery. Drug Discov. Today 17, 285–290.
- Varki, A.A., Cummings, R.D.R.D., Esko, J.D.J.D., Freeze, H.H.H.H., Stanley, P.P., Bertozzi, C.R.C.R., Hart, G.W.G.W., Etzler, M.E.M.E. (Eds.), 2009. Essentials of Glycobiology, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY).
- Velasco-Velázquez, M.A., Homsi, N., De La Fuente, M., Pestell, R.G., 2012. Breast cancer stem cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44, 573–577.
- Velasco-Velázquez, M.A., Popov, V.M., Lisanti, M.P., Pestell, R.G., 2011. The role of breast cancer stem cells in metastasis and therapeutic implications. Am. J. Pathol. 179, 2–11.
- Vilcaes, A.A., Demichelis, V.T., Daniotti, J.L., 2011. Trans-activity of plasma membraneassociated ganglioside sialyltransferase in mammalian cells. J. Biol. Chem. 286, 31437– 31446.

- Wang, A.H., Quigley, G.J., Kolpak, F.J., Crawford, J.L., van Boom, J.H., van der Marel, G., Rich, A., 1979. Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. Nature 282, 680–686.
- Wang, X., Belguise, K., Kersual, N., Kirsch, K.H., Mineva, N.D., Galtier, F., Chalbos, D., Sonenshein, G.E., 2007. Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. Nat. Cell Biol. 9, 470–478.
- Wang, X., Yan, Q., Sun, P., Liu, J.-W., Go, L., McDaniel, S.M., Paller, A.S., 2007. Suppression of epidermal growth factor receptor signaling by protein kinase C-alpha activation requires CD82, caveolin-1, and ganglioside. Cancer Res. 67, 9986–9995.
- Wang, X.-Q., Sun, P., Paller, A.S., 2002. Ganglioside induces caveolin-1 redistribution and interaction with the epidermal growth factor receptor. J. Biol. Chem. 277, 47028–47034.
- Wang, Z., Sun, Z., Li, A.V., Yarema, K.J., 2006. Roles for UDP-GlcNAc 2-epimerase/ManNAc 6kinase 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.
- Waugh, M.G., Hsuan, J.J., 2009. Preparation of membrane rafts. Methods Mol. Biol. 462, 403–414.
- Weigelt, B., Hu, Z., He, X., Livasy, C., Carey, L.A., Ewend, M.G., Glas, A.M., Perou, C.M., Van't Veer, L.J., 2005. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. Cancer Res. 65, 9155–9158.
- Welboren, W.-J., Stunnenberg, H.G., Sweep, F.C.G.J., Span, P.N., 2007. Identifying estrogen receptor target genes. Mol Oncol 1, 138–143.
- Wen, F.Q., Jabbar, A.A., Patel, D.A., Kazarian, T., Valentino, L.A., 1999. Atherosclerotic aortic gangliosides enhance integrin-mediated platelet adhesion to collagen. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 19, 519–524.
- Wilkening, G., Linke, T., Uhlhorn-Dierks, G., Sandhoff, K., 2000. Degradation of membranebound ganglioside GM1. Stimulation by bis(monoacylglycero)phosphate and the activator proteins SAP-B and GM2-AP. J. Biol. Chem. 275, 35814–35819.
- Xin, X., Yang, S., Ingle, G., Zlot, C., Rangell, L., Kowalski, J., Schwall, R., Ferrara, N., Gerritsen, M.E., 2001. Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factorinduced angiogenesis in vitro and in vivo. Am. J. Pathol. 158, 1111–1120.
- Xu, J., Chen, Y., Olopade, O.I., 2010. MYC and Breast Cancer. Genes Cancer 1, 629–640.
- 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.
- Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., Proia, R.L., 1999. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 9142–9147.
- Yamashita, T., Wu, Y.-P., Sandhoff, R., Werth, N., Mizukami, H., Ellis, J.M., Dupree, J.L., Geyer, R., Sandhoff, K., Proia, R.L., 2005. Interruption of ganglioside synthesis produces central nervous system degeneration and altered axon-glial interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 2725–2730.
- Yanagisawa, K., 2007. Role of gangliosides in Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta 1768, 1943–1951.
- Yanagisawa, K., 2011a. Pathological significance of ganglioside clusters in Alzheimer's disease. J. Neurochem. 116, 806–812.
- Yanagisawa, M., 2011b. Stem cell glycolipids. Neurochem. Res. 36, 1623–1635.
- Yanagisawa, M., Nakamura, K., Taga, T., 2005. Glycosphingolipid synthesis inhibitor represses cytokine-induced activation of the Ras-MAPK pathway in embryonic neural precursor cells. J. Biochem. 138, 285–291.

- Yanagisawa, M., Yoshimura, S., Yu, R.K., 2011. Expression of GD2 and GD3 gangliosides in human embryonic neural stem cells. ASN Neuro 3.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., Weinberg, R.A., 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell 117, 927–939.
- Yang, L.J., Zeller, C.B., Shaper, N.L., Kiso, M., Hasegawa, A., Shapiro, R.E., Schnaar, R.L., 1996. Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 814–818.
- Yoon, S.-J., Nakayama, K., Hikita, T., Handa, K., Hakomori, S., 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, 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.
- Yoshikawa, M., Go, S., Takasaki, K., Kakazu, Y., Ohashi, M., Nagafuku, M., Kabayama, K., Sekimoto, J., Suzuki, S., Takaiwa, K., Kimitsuki, T., Matsumoto, N., Komune, S., Kamei, D., Saito, M., Fujiwara, M., Iwasaki, K., Inokuchi, J., 2009. Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106, 9483–9488.
- Yu, A.L., Gilman, A.L., Ozkaynak, M.F., London, W.B., Kreissman, S.G., Chen, H.X., Smith, M., Anderson, B., Villablanca, J.G., Matthay, K.K., Shimada, H., Grupp, S.A., Seeger, R., Reynolds, C.P., Buxton, A., Reisfeld, R.A., Gillies, S.D., Cohn, S.L., Maris, J.M., Sondel, P.M., 2010. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. N. Engl. J. Med. 363, 1324–1334.
- Yu, R.K., Bieberich, E., 2001. Regulation of glycosyltransferases in ganglioside biosynthesis by phosphorylation and dephosphorylation. Mol. Cell. Endocrinol. 177, 19–24.
- Yu, R.K., Bieberich, E., Xia, T., Zeng, G., 2004. Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. J. Lipid Res. 45, 783–793.
- Yu, R.K., Macala, L.J., Taki, T., Weinfield, H.M., Yu, F.S., 1988. Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain. J. Neurochem. 50, 1825– 1829.
- Yu, R.K., Tsai, Y.-T., Ariga, T., 2012. Functional roles of gangliosides in neurodevelopment: an overview of recent advances. Neurochem. Res. 37, 1230–1244.
- Yusuf, H.K., 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, M.K., 2009. Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2specific T cells. Clin. Cancer Res. 15, 5852–5860.
- Zapata-Benavides, P., Tuna, M., Lopez-Berestein, G., Tari, A.M., 2002. Downregulation of Wilms' tumor 1 protein inhibits breast cancer proliferation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 295, 784–790.
- Zava, S., Milani, S., Sottocornola, E., Berra, B., Colombo, I., 2010. Two active and differently Nglycosylated isoforms of human ST3Gal-V are produced from the placental mRNA variant by a leaky scanning mechanism. FEBS Lett. 584, 1476–1480.
- Zeng, G., Gao, L., Birklé, S., Yu, R.K., 2000. Suppression of ganglioside GD3 expression in a rat F-11 tumor cell line reduces tumor growth, angiogenesis, and vascular endothelial growth factor production. Cancer Res. 60, 6670–6676.
- Zha, Q., Ruan, Y., Hartmann, T., Beyreuther, K., Zhang, D., 2004. GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. Mol. Psychiatry 9, 946–952.

- Zhang, Y.-W., Su, Y., Volpert, O.V., Vande Woude, G.F., 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.
- 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.

ANNEXE

Role of Complex Gangliosides in Cancer Progression

Marie Bobowski,^{*a,b,c*} Aurélie Cazet,^{*a,b,c*} Agata Steenackers^{*a,b,c*} and Philippe Delannoy*^{*a,b,c*}

DOI: 10.1039/9781849732765-00001

1. 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, adhesion and motility.^{1,2} According to Svennerholm, gangliosides are classified in four series (0-, a-, b- and c-series) according to the presence of 0 to 3 sialic acid residues linked to the lactosylceramide (LacCer, G_{A3}) (Fig. 1).³ 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 nervous system in healthy adults.⁴ In mammals, the expression of b- and c-series gangliosides increases under pathological conditions including cancer. In this context, G_{D3} and G_{D2} have been revealed as tumor-associated carbohydrate antigens (TACA) in neuroectoderm-derived tumors such as melanoma, neuroblastoma and glioblastoma.⁵ Moreover, substantial evidences have demonstrated the implication of complex gangliosides in oncogenesis by mediating cell proliferation, migration, tumor growth and angiogenesis.

2. Biosynthesis of gangliosides

The biosynthesis of gangliosides starts in the *cis*-Golgi by the transfer of a glucose (Glc*p*) residue onto ceramide (Cer) by the UDP-Glc*p*: ceramide β -glucosyltransferase (GlcCer synthase) encoded by the *UGCG* gene (Table I).⁶ The GlcCer synthase is highly specific for ceramide and can be specifically inhibited by D,L-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpho-lino-1-propanol (PDMP) or D,L-threo-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-morpholino-1-propanol (PPMP), blocking the synthesis of glycosphingolipids.⁷ The next step is the galactosyltransferase (LacCer to LacCer by the UDP-Gal*p*: GlcCer β 1,4-galactosyltransferase (LacCer synthase).^{8,9} The transfer of sialic acid to LacCer is then catalyzed by specific sialyltransferases: the G_{M3} synthase (ST3Gal V), the G_{D3} synthase (ST8Sia I, GD3S) and the G_{T3} synthase.¹⁰ The human ST3Gal V was shown to use only LacCer as an

^{*a}Univ. Lille Nord de France, F-59000 Lille, France* ^{*b*}USTL, UGSF, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France ^{*c*}CNRS, UMR 8576, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France</sup>



Fig. 1 Biosynthesis pathway for gangliosides. Gangliosides are synthesized by the stepwise addition of monosaccharides to ceramide. Ceramide (Cer) is the acceptor for UDP-Glcp: ceramide β-glucosyltransferase. Extension of GlcCer occurs by the action of UDP-Galp: GlcCer β1-4 galactosyltransferase to make lactosylceramide (G_{A3}). The action of ST3Gal V (G_{M3} synthase), ST8Sia I (G_{D3} synthase) and ST8Sia V (G_{T3} synthase) leads to the biosynthesis of the precursors of a-, b- and c-series gangliosides, respectively. The 0-series gangliosides are directly synthesized from lactosylceramide. Elongation is performed by the sequential action of N-acetyl-galactosaminyltransferase (β4GalNAc T1), galactosyltransferase (β3Gal T4) and sialyltransferases (ST3Gal I, ST3Gal II and ST8Sia V). α-gangliosides derive from the action of ST6GalNAc III, V or VI on G_{M1b}, G_{D1a} or G_{T1b}. The code names of gangliosides are according to Svennerholm.³ Cer: ceramide; LacCer: lactosylceramide. ● Glcp; ○ Galp; □ GalpNAc; ◆ Neup5Ac.

Table I glycosyltransferases involved in gangliosides biosynthesis.

Gene	Common name	Main acceptors	Accession #	Ref
UGCG	GlcCer synthase	Ceramide	NM_003358	6
B4GALT6	LacCer synthase	Glucosylceramide	NM_004775	8,9
ST3GAL5	G _{M3} synthase	Lactosylceramide	NM_003896	11
ST8SIA1	G _{D3} synthase	G_{M3}, G_{D3}	NM_003034.2	13,14
ST8SIA5	G _{T3} synthase	G _{D3} , G _{M1b} , G _{D1a} , G _{T1b}	NM_013305	15
B4GALNACT1	G_{M2}/G_{D2} synthase	$G_{A3}, G_{M3}, G_{D3}, G_{T3}$	NM_001478.2	18,22,23
B3GALT4	G_{M1a}/G_{D1b} synthase	$G_{A2}, G_{M2}, G_{D2}, G_{T2}$	NM_003782.3	19,22
ST3GAL1	ST3Gal I	β -Gal <i>p</i> -(1 \rightarrow 3)- β -Galc <i>p</i> NAc-	NM_003033	20
		Cer-R ^a		
ST3GAL2	ST3Gal II	β-Gal <i>p</i> -(1→3)-β-Galc <i>p</i> NAc- Cer-R ^a	NM_006927	21
ST6GALNAC3	ST6GalNAc III	α-Neup5Ac- $(2\rightarrow 3)$ -β-Galp- $(1\rightarrow 3)$ -β-GalcpNAc-Cer-R ^a	NM_152996	24
ST6GALNAC5	ST6GalNAc III	α-Neup5Ac- $(2\rightarrow 3)$ -β-Galp- $(1\rightarrow 3)$ -β-GalcpNAc-Cer-R ^a	NM_030965.1	25
ST6GALNAC6	ST6GalNAc III	α-Neup5Ac- $(2\rightarrow 3)$ -β-Galp- $(1\rightarrow 3)$ -β-GalcpNAc-Cer-R ^a	NM_013443.3	25
${}^{a}R = G_{A3}, G_{M3}, G_{D3} \text{ or } G_{T3}$				

acceptor substrate to synthesize G_{M3}^{11} and a loss-of-function mutation in ST3GAL5 gene is associated with the infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome.¹² The G_{D3} synthase ST8Sia I is also highly specific to G_{M3}^{13} but the human enzyme was also shown to use G_{D3} to synthesize G_{T3} .¹⁴ The human ST8Sia V exhibits a broader activity toward gangliosides, using G_{D3}, but also G_{M1b}, G_{D1a} or G_{T1b} as acceptors.¹⁵ Thus, gangliosides are classified in four series according to the presence of 0 to 3 sialic acid residues linked to LacCer. G_{A3}, G_{M3}, G_{D3} and G_{T3} are the precursors for 0-, a-, b- and c-series gangliosides, respectively, and the biosynthesis of these compounds determine the relative proportion of gangliosides in each series (Fig. 1). The steady state level of membrane associated gangliosides is therefore dependent on the activity of several glycosyltransferases (GTs), including the sialyltransferases ST3Gal V, ST8Sia I and ST8Sia V. To note, the sialic acid residues carried by human gangliosides are in the form of Nacetylneuraminic acid (Neup5Ac) and its O-acetylated derivatives whereas it is expressed in both Neup5Ac and N-glycolylneuraminic acid (Neup5Gc) in other mammal species. This is due to an irreversible inactivating mutation in the CMAH gene encoding the CMP-Neup5Ac hydroxylase. The lack of the enzyme responsible for the conversion of CMP-Neup5Ac in CMP-Neup5Gc results in the total absence of Neup5Gc in healthy human tissues and fluids.^{16,17}

Afterwards, further monosaccharides, including *N*-acetylgalactosamine (Gal*p*NAc), galactose (Gal*p*) and sialic acid (Neu*p*5Ac), can be transferred in a stepwise manner by other GTs: the β 1,4-N-acetyl-galactosaminyl-transferase I (G_{M2}/G_{D2} synthase),¹⁸ the β 1,3-galactosyltransferase IV¹⁹ and the sialyltransferases ST3Gal I,²⁰ ST3Gal II²¹ and ST8Sia V.¹⁵ The β 1,4-N-acetyl-galactosaminyltransferase I is active on the four series of ganglio-sides and converts G_{A3}, G_{M3}, G_{D3} and G_{T3} into G_{A2}, G_{M2}, G_{D2} and G_{T2},

respectively.^{22,23} Similarly, the β 1,3-galactosyltransferase IV equally uses G_{A2} , G_{M2} , G_{D2} and G_{T2} as acceptor substrates.²² ST3Gal I and ST3Gal II are not ganglioside-specific enzymes. Both transfer a sialic acid residue onto Gal β 1-3GalNAc disaccharide sequence of *O*-glycosylproteins or gangliosides. However, on the basis of enzymatic properties and tissue distribution, it appears that ST3Gal II is mainly involved in the biosynthesis of gangliosides. A sialic acid residue can also be linked in α 2,6-linkage to the GalpNAc residue of G_{M1b}, G_{D1a} or G_{T1b} by the sialyltransferases ST6GalNAc III,²⁴ ST6GalNAc V or ST6GalNAc VI,²⁵ forming the α -gangliosides G_{D1 α}, G_{T1 $\alpha\alpha$} or G_{Q1b α} (Fig. 1).

The enzymes involved in the biosynthesis of gangliosides are typical type II membrane-anchored GTs showing a gradient distribution in the Golgi system. The first steps of glycosylation take place in the *cislmedial*-Golgi and the later in the trans-Golgi and trans-Golgi network.²⁶ These GTs can form functional complexes, such as it has been shown for the G_{M2}/G_{D2} synthase and the β 1,3-galactosyltransferase IV in the *trans*-Golgi network²⁷ or for the LacCer synthase, the G_{M3} synthase and the G_{D3} synthase that form a multi-enzymatic complex in the cis-Golgi.²⁸ These complexes are thought to act without releasing intermediate structures, ensuring the biosynthesis of a clearly defined ganglioside end product. The regulation of GTs activity is mainly achieved at the transcriptional level and GT genes expression can be tissue-specific. As example, B4GALNACT1 gene is essentially expressed in embryonic and adult human brain, lung and testis whereas ST3GAL5 is expressed in almost all human tissues.^{11,29,30} The tissue-specificity of GT genes expression is depending on alternative promoters that control tissue specific transcripts, differing in their 5' untranslated region (5'UTR) but encoding the same polypeptide.^{10,31} GTs involved in the synthesis of gangliosides can be also regulated by phosphorylation and dephosphorylation. For example, in neuroblastoma cells NG108-15, the protein kinases PKA and PKC activate the G_{M2}/G_{D2} synthase whereas the activity of ST3Gal I, ST3Gal II or \beta1,3-galactosyltransferase IV is decreased.^{32–34}

3. The G_{D3} synthase: key enzyme for the biosynthesis of b- and c-series gangliosides

The sialyltransferase ST8Sia I is the only enzyme known to catalyze the transfer of a sialic acid residue onto G_{M3} through an $\alpha 2,8$ -linkage to synthesize G_{D3} (α -Neup5Ac-(2 \rightarrow 8)- α -Neup5Ac-(2 \rightarrow 3)- β -Galp-(1 \rightarrow 4)- β -Glcp-Cer). Whereas ST8Sia I mainly sialylates G_{M3} , Nakayama and coworkers have underlined its ability to synthesize G_{T3} from G_{D3} .¹⁴ ST8Sia I was also shown to use G_{M1b} , G_{D1a} or G_{T1b} as acceptor substrates to synthesize G_{D1c} , G_{T1a} or G_{Q1b} , respectively, both *in vitro* and *in vivo*.³⁵ However, the $\alpha 2,8$ -sialyltransferase ST8Sia V is a much better candidate for G_{T1a}/G_{Q1b} synthase activity¹⁵ and no ST8Sia V activity was detected toward G_{M3} . Consequently, ST8Sia I is considered as the only G_{D3} synthase (GD3S) that controls the biosynthesis of gangliosides from b- and c-series.

 G_{D3} and GD3S are expressed in fetal brain at an early developmental stage,^{36,37} where they play a key role in cell-cell interaction, cell differentiation and proliferation.⁴ In adult human tissues, GD3S transcripts are essentially detected in brain.¹⁴ G_{D3} and GD3S have been also shown to be over-expressed in neuroectoderm-derived malignant cells such as melanoma, glioblastoma, neuroblastoma and estrogen receptor (ER) negative breast cancer.^{5,38–40}

The human GD3S cDNA was simultaneously isolated by expression cloning by three research groups.^{13,41,42} The *ST8SIA1* gene is located on chromosome 12, in p12.1-p11.2 and consists in five coding exons (E1 to E5) spanning over 135 kbp of genomic DNA (Fig. 2).⁴³ The 5'UTR was previously reported in melanoma and glioblastoma cell lines, showing transcription start sites between -650 and -400 pb upstream the initiation codon.^{43,44} Two initiation codons on E1 exon can lead to two protein isoforms of 356 or 341 amino acids. The second initiation codon has a better sequence for translation initiation according to the Kozak's rule.⁴⁵ Moreover, GD3S cDNA lacking first ATG shows the same expression level than the GD3S containing both ATG.⁴² These data suggest that the protein of 341 residues may be preferentially expressed *in vivo*. The corresponding protein has a 12 amino acid cytoplasmic tail, a transmembrane domain of about 20 residues and a Golgi catalytic domain containing the conserved Sialyl motifs involved in substrate binding and transfer.⁴⁶

The promoter region controlling the expression of GD3S gene was studied in melanoma and glioblastoma cell lines. The promoter lacks



Fig. 2 Gene and protein sequences organization of the human G_{D3} synthase. A: Genomic organization of the human G_{D3} synthase gene. The coding region (dark grey boxes) spreads on five exons (E1 to E5). Light grey boxes indicate the non coding regions. Two ATG initiation codons are indicated but the second (underlined) seems to be more used (adapted from⁴³). B: Schematic representation of two G_{D3} synthase translation products depending on the use of the first or the second initiation codons. The translation starts in residue 1 or residue 16. The cytoplasmic tail (Cyt), the transmembrane domain (Tm), the stem region (Stem) and the catalytic domain (Cat) are shown. Sialyl motifs L (residues 137–182) and S (residues 273–295) are shown by grey boxes (adapted from¹⁴).

TATA or CCAAT boxes, as commonly observed for glycosyltransferase genes, but contains several SP1 sites. Moreover, luciferase assays in SK-MEL-28 melanoma cells show the presence of a silencer at -2262 to -978upstream the initiation codon. GT/CG repeated sequences between -1200and -1300, suggesting a Z-type DNA, could also regulate the expression of GD3S mRNA.⁴³ In glioblastoma cells, analysis of GD3S promoter activity has showed the essential role of AREB6 and Elk-1 transcription factors in GD3S transcription.⁴⁴ Finally, EMSA and mutagenesis experiments have demonstrated the key role of NF κ B in activating the expression of GD3S in SK-MEL-2 melanoma cells.⁴⁷

4. Role of complex gangliosides in carcinogenesis

A neo-expression of complex gangliosides is observed in a variety of human diseases including atherosclerosis, multiple sclerosis, Creutzfeld-Jacob disease and neuro-ectoderm-derived cancers.^{5,48–50} In particular, G_{D3} and G_{D2} are considered as melanoma- and neuroblastoma-associated antigens, playing a key role in tumor development. However, the biological effects resulting from their over-expression have not been clarified and the mechanisms by which tumor-associated gangliosides induce invasive and metastatic phenotypes of tumor cells remain to be demonstrated.

4.1 Complex gangliosides in neuroectoderm-derived tumors

4.1.1 Melanoma. G_{D3} is known as a specific melanoma-associated carbohydrate antigen since several decades. That disialoganglioside is highly expressed in primary melanoma tissues as well as in established melanoma cell lines, whereas it is mostly absent in healthy human melanocytes.^{51–53} Furthermore, highly metastatic cells show an increase in ganglioside content and express more G_{D3} and b- and c-series gangliosides than poorly metastatic cells.⁵⁴ Accordingly, GD3S expression follows the same profile and GD3S is significantly expressed in the well-described melanoma model SK-Mel-28.^{39,55}

Indirect evidences have suggested that G_{D3} might play a central role in the maintenance of malignancy of melanoma cells. Inhibition of GD3S expression by antisense knockdown leads to a significant decreased expression of G_{D3} and its 9-*O*-acetylated derivative in hamster AbC-1 melanoma cells and results in a marked decreased in tumor growth without affecting melanogenesis.⁵⁶ In parallel, anti- G_{D3} mAb suppress melanoma cell growth in culture and anti- G_{D3} mAb injected in melanoma tissues or melanoma patients also showed a marked suppressive activity of tumor progression.⁵⁷

The role of G_{D3} in primary melanoma tumor development and metastasis dissemination was investigated by Koichi Furukawa's team using SK-Mel-28-N1 melanoma line. This model was selected after treatment of SK-Mel-28 cells with R24 anti- G_{D3} mAb and subsequent subcloning of the surviving cells.⁵⁸ The G_{D3} deficient-N1 mutant expresses exclusively a-series gangliosides (G_{M3} , G_{M2} and G_{D1a})⁵⁹ and shows a

significant decrease of proliferation, adhesion and motility both *in vitro* and *in vivo*.⁵⁸ Stable transfection of GD3S cDNA in SK-Mel-28-N1 cells leads to the conversion of G_{M3} into G_{D3} . GD3S positive melanoma cells proliferate and migrate more than control cells in culture media containing different serum concentrations.^{5,60} These phenotypic changes are related to a high level of phosphorylation and activation of three major adaptator proteins: paxillin, p130Cas and the Focal Adhesion Kinase FAK.^{59,60} The activation of p130Cas and FAK are directly correlated to cell growth and migration whereas paxillin is involved in invasive properties of G_{D3} positive melanoma cells.⁶¹

In parallel, several studies have shown that G_{D3} could play a crucial role in tumor invasion by acting as metastasis mediator through direct interactions with extracellular matrix proteins or through complexes formation with integrins and plasma membrane receptors. G_{D3} is involved in the attachment of human melanoma cells to various extracellular matrix proteins, including fibronectin, laminin or collagen type I and IV.^{62–64} In this context, Ohkawa and colleagues have recently showed that the adhesion of SK-Mel-28-N1 GD3S positive cells to collagen type I implies a colocalization of G_{D3} with integrin β 1 chain in GSL-rich microdomains of the plasma membrane, leading to the activation of paxillin and FAK protein as well as the Integrin-Linked Kinase-Akt (IKL-Akt) signaling pathway.⁶⁵ These results suggested that integrins assembled and formed a cluster in lipid rafts domain, leading to the enhanced signaling and malignant properties of melanoma cells under G_{D3} expression.

Solid tumors synthesize and shed gangliosides into the microenvironment, in greater quantity than do healthy tissues. This phenomenon could also promote the tumor development by amplifying growth factor responsiveness and inhibiting the immune response. Thus, G_{D3} purified from human melanoma tumors, inhibits the phenotypic differentiation and induce apoptosis of dendritic cells.⁶⁶ This programmed cell death is depending on caspase activation and involves a direct interaction of G_{D3} with mitochondria as well as ROS production.⁶⁷ Finally, the G_{D3} could be important in the radioresistance of melanoma tumors. The radiosensitivity of human melanoma M4Be cells is inversely correlated to the total amount of shed gangliosides and especially to the presence of G_{D3} .^{68,69}

Tumors from melanoma are also enriched in de-*N*-acetyl- G_{M3} , G_{D2} , 9-*O*-acetyl- G_{D3} (CDw60) and 9-*O*-acetyl- G_{D2} .^{70–73} Particularly, the de-*N*-acetyl- G_{M3} is a marker of metastatic melanoma phenotype. That ganglio-side especially promotes cell migration and invasion of melanoma cells by a mechanism depending on urokinase-like plasminogen activator uPA and matrix metalloproteinase MMP-2 activation.⁷⁴ In contrast, G_{D1b} , G_{T1b} and G_{Q1b} suppress tumor growth by inhibiting the production of IL-8.⁷⁵ Over-expression of the G_{M1}/G_{D1b} synthase (β 3Gal T4) inhibits the tumorigenicity of metastatic melanoma cells by affecting the expression and the dispersion of G_{D3} , G_{D1b} and G_{T1b} in the non-GEM/raft fractions.⁷⁶

4.1.2 Tumors of the central nervous system. G_{D3} and G_{D2} are mainly over-expressed in astrocytoma, medulloblastoma, meningioma and neuroblastoma.^{77–80} On the contrary, the other b-series gangliosides G_{D1b} , G_{T1b}

and G_{Q1b} are less expressed in neuroblastoma tumors than in normal brain and this absence of expression is associated with an aggressive phenotype and a poor prognosis.^{81,82}

The expression of GTs implicated in gangliosides biosynthesis is also altered in brain tumors and the analysis of GTs mRNA levels may be used for both diagnosis and prognosis. For example, a high expression of GD3S in glioma biopsies, in combination with a decreased expression of G_{M2}/G_{D2} synthase, correlated with increased overall survival of patients.³⁸ The expression of G_{M2}/G_{D2} synthase can also be used as a prognostic marker for grade IV aggressive neuroblastoma that generates metastases in bone marrow.^{83,84} Recently, the role of the sialyltransferase ST6GalNAc V, responsible for the biosynthesis of α -gangliosides, has also been demonstrated in glioma.⁸⁵

The role of G_{D3} in the proliferative and invasive capacities of tumors has been first highlighted in neuroblastoma and glioma cells. The inhibition of the G_{D3} expression in rat F11 hybrid neuroblastoma cells by stable transfection with an antisense vector against GD3S gene was associated with reduced cell migration *in vitro* and reduced metastatic potential in nude mouse model.^{86,87} In parallel, over-expression of GD3S increases tumorigenicity and invasion of rat glioma cells, whereas anti- G_{D3} mAb specifically inhibits tumor growth.^{88,89}

The molecular mechanisms involving G_{D2} in carcinogenesis of brain tumors have not yet been clarified and eventual relationships between disialogangliosides expression and central nervous system tumors aggressiveness have to be demonstrated. Nevertheless, G_{D2} represents a therapeutic target of interest in cancer therapies (see paragraph 1.6).

On the contrary, G_{M3} inhibits cell proliferation of neural progenitors.^{90,91} The G_{M3} -dependent inhibition of astrocyte precursor proliferation and apoptosis appears to be mediated in part by the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27(Kip1).⁹² In parallel, G_{M3} inhibits angiogenesis through autocrine and paracrine effects on vascular endothelial growth factor (VEGF) and associated receptors. Brain tumors expressing high levels of G_{M3} are generally less vascularized and grow slower than tumors that express low levels of G_{M3} .⁹³ It has been also demonstrated that the proliferation of human neuroblastoma cells is reduced in the presence of G_{M3} , G_{M1} , G_{D1a} and G_{T1b} via the inhibition of epidermal growth factor receptor (EGFR) phosphorylation.⁹⁴

4.2 Complex gangliosides in lung cancer

Lung tumors express various gangliosides such as *N*-glycolyl- G_{M3} , G_{M2} , G_{M1} , fucosyl- G_{M1} , G_{D3} , 9-*O*-acetyl- G_{D3} and G_{D2} .⁹⁵ However, only complex gangliosides from the b-series, including G_{D2} , are neo-expressed in small cell lung cancer (SCLC).^{95–97} G_{D2} represents not only a marker of SCLC, but is also involved in the acquisition of the malignant properties of lung cancer cells. The expression of G_{D2} at the surface of SK-LC-17 cells is necessary and sufficient to increase cell growth and invasion of SCLC cells.⁹⁵ In parallel, inhibition of G_{D2} expression by RNA interference

reduces cell proliferation *in vitro* and tumor growth in SCID mice.⁹⁸ Competition experiments using anti- G_{D2} mAb lead to a marked growth suppression and induce apoptosis of SCLC cells by a mechanism dependent of ERK/MAPK and p38/MAPK signaling pathways.^{95,99} G_{D2} positive lung cells incubated with anti- G_{D2} mAb undergo anoikis through the conformational changes of integrin molecules and subsequent FAK dephosphorylation, ERK and p38 activation.⁹⁹

4.3 Complex gangliosides in breast cancer

Little is known about ganglioside expression in breast cancer. Total ganglioside levels appear to be significantly higher in the breast tumor than in normal tissues. The gangliosides G_{D3} , 9-*O*-acetyl- G_{D3} and 9-*O*-acetyl- G_{T3} , which show a very restricted expression in normal breast tissues, have been reported to be over-expressed in about 50% of invasive ductal breast carcinoma (IDC).¹⁰⁰ The *N*-glycolyl- G_{M3} , absent from normal tissues, was also detected in IDC, with 100 % efficiency in primary tumors for women diagnosed in stage II breast cancer.¹⁰¹ However, data concerning the ganglioside pattern of breast cancer cells remains relatively fragmented.¹⁰²

Two clinical studies performed on several public databases (Uppsala, Stockholm, Rotterdam, Oxford-Untreated, Oxford-Tamoxifen, London, New York, Villejuif, and ExpO) and on tissues samples of invasive breast cancer from the Frankfurt Hospital have shown that GD3S displayed higher expression among ER-negative breast cancer tumors and *ST8SIA1* over-expression was associated with poor pathohistological grading in ER-negative tumors.^{40,103} In contrast, a better prognosis for estrogen receptor-positive samples with high expression of *ST8SIA1* was noticed.¹⁰³ Finally, the expression of *ST8Sia1* was shown to be up-regulated in osteolytic MDA-MET metastatic breast cancer cells.¹⁰⁴

We have recently demonstrated that GD3S expression in MDA-MB-231 cells is associated with morphological changes and increased proliferation in absence of serum or exogenous growth factors.^{105,106} GD3S expression 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 under serum-free conditions.¹⁰⁵ GD3S expression contributes to increase the malignant properties of breast cancer cells by mediating cell proliferation and migration in vitro and in vivo by a specific and constitutive activation of c-Met receptor and the subsequent Erk/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways.¹⁰⁶ These data underlie a new way for c-Met constitutive activation. Recently, the role of ST6GalNAc V, a sialyltransferase involved in the biosynthesis of α -gangliosides, has been clearly demonstrated in breast cancer metastasis. Normally restricted to the brain, the expression of ST6GalNAc V in breast cancer cells enhances specific adhesion to brain endothelial cells and the passage through the blood-brain barrier.¹⁰⁷ Gangliosides expressed at the cell surface of breast cancer cell lines may represent ligands for E-selectin, required for cell tethering and rolling, highlighting the role of cell surface glycosylation in the metastatic cascade and in organ-specific metastatic interactions.^{107,108}

4.4 Expression of complex gangliosides in other types of cancer

The 9-O-acetyl- G_{D3} is over-expressed in lymphoblasts of childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). Interestingly, this acetylated derivate of G_{D3} seems to protect the lymphoblasts from G_{D3} -induced apoptosis.¹⁰⁹ In parallel, the sialidase Neu3 is down-regulated in ALL, when compared with cells from healthy controls, in terms of transcriptional expression and enzymatic activity. Furthermore, the expression of Neu3 is associated with cancer progression, by increasing in clinical remission after chemotherapy and decreasing again in patients that relapsed. The low expression of the sialidase is negatively correlated to the detection of the 9-O-acetyl- G_{D3} motif.¹¹⁰

Finally, G_{M3} , G_{M2} , G_{D2} , 9-*O*-acetyl- G_{D2} , G_{D1a} and G_{M1b} are detected in ovarian cancers. G_{D1a} is also found in the ascitic fluid and plasma of patients, reflecting the shedding of this ganglioside into the tumor microenvironment.¹¹¹

5. Regulation of RTKs signaling by complex gangliosides in cancer cells

The role of gangliosides as mediators of cell adhesion and modulators of signal transduction is clearly demonstrated.¹¹² GSL, particularly gangliosides, are concentrated at the cell surface with membrane proteins such as integrins, tetraspanins and growth factor receptors, and with small G-proteins and proteins from the Src family kinases, in microdomains named "glycosynapse".¹ In that microenvironment, GSL associate with membrane proteins and signal transducers, and can induce or modulate cell growth and differentiation. In that part of the review, we will focus on the role of gangliosides in tyrosine kinase receptors (RTK) modulation.

RTKs play crucial roles in cell proliferation, migration, differentiation and survival.¹¹³ They localize at the plasma membrane and share a similar structure, with an extracellular region, a single transmembrane domain and a cytoplasmic region.¹¹⁴ Deregulation of these receptors has been described for numerous types of cancer and is often associated with an aggressive phenotype, increasing proliferation, migration and invasion capacity of cancer cells.^{115,116}

Recent studies have shown that the crosstalk between different RTKs, or between RTKs and other membrane proteins such as integrins, tetraspanins or plexins, can be regulated by gangliosides and potentially implicated in cancer progression.^{117–119} Moreover, the modulating effect of gangliosides on RTKs has been clearly demonstrated and involved either direct or indirect interactions. A number of growth factor receptors, including receptors for epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), platelet-derived growth factor (PDGF), nerve growth factor (NGF), and insulin are known to be influenced by gangliosides. Gangliosides can negatively or positively regulate RTKs according to the cellular context. For example, G_{M1} , G_{M2} , G_{D1a} , G_{D1b} , G_{D3} and G_{T1b} inhibit the activation of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR).^{120,121} In A431 human epidermoid carcinoma cells, the activation of EGFR is inhibited by G_{M3} through direct carbohydratecarbohydrate interactions between G_{M3} and terminal GlcpNAc residue on EGFR.^{122,123} In contrast, G_{D1a} promotes the dimerization of EGFR and enhances EGFR-mediated activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, causing ligand-independent EGFR dimerization and, in turn, enhanced EGF signaling.^{121,124}

TRKs activity can be also regulated by the formation of complexes between gangliosides and different membrane proteins. In HCV29 bladder epithelial cells, cell motility and growth are greatly influenced by the expression of G_{M2}/G_{M3} complexes, which affects the cross-talk between the tumor suppressor CD82, integrin α 3-chain and c-Met through glycosynaptic domain. The G_{M3}/G_{M2} complex specifically interacts with tetraspanin CD82, thus inhibiting the trans-phosphorylation of the receptor, the recruiting of the key molecule Grb2 and the activation of PI3K/Akt and MEK/ERK pathways.^{119,125}

In the other hand, we have also recently shown a ganglioside-dependent activation of c-Met in breast cancer cells.¹⁰⁶ The expression of the GD3S in MDA-MB-231 breast cancer cells induces the accumulation of b- and c-series gangliosides at the cell surface, mainly G_{D2} .¹⁰⁵ Change in the ganglioside composition is associated with increased migration and proliferation of MDA-MB-231 cells, due to the G_{D2} -dependent activation of c-Met in the absence of HGF.¹⁰⁶ Altogether, these results show that activation of c-Met in cancer cells is depending on the ganglioside pattern of expression. Furthermore, Fukumoto *et al.* reported that introduction of the GD3S gene into the rat pheochromocytoma cell line PC12 resulted in the continuous activation of NGF receptor TrkA and its downstream signal molecule MAPK. The increased expression of G_{D1b} and G_{T1b} in transfected cells might induce the conformational change of TrkA to form a dimer and to be continuously activated, leading to a marked enhancement of cell proliferation.¹²⁶

 G_{D1a} expression is also associated with enhanced angiogenesis, whereas the process of vascularity is correlated with proliferation and invasion of tumor cells. Incubation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with exogenously added G_{D1a} increases VEGF-induced proliferation and migration.¹²⁷ In contrast, G_{M3} is implicated in the decrease of VEGFR2 phosphorylation and subsequent inhibition of Akt downstream signaling pathway in HUVECs.^{93,109} Moreover, G_{M3} negatively influences proliferation, migration and proangiogenic effects of G_{D1a} .

In conclusion, gangliosides have profound effects on RTKs signaling, leading to changes in cell properties such as increased proliferation and migration, which are often associated with tumor progression and metastasis. Still, the mechanisms by which ganglioside interact with RTKs is largely unknown, as well as the effect of all gangliosides on RTKs. Further studies should elucidate these questions.

6. Anti-cancer vaccine strategies targeting complex gangliosides

By their direct involvement in tumorigenesis, gangliosides appear as attractive targets for tumor-specific therapies. Although cell surface TACA can render cancer cells mildly antigenic, they are poorly immunogenic. Many tumor-associated gangliosides have an embryonic origin and are expressed at low levels in normal tissues. The glycans can be therefore perceived as self by the human immune system, in which case B-cells expressing high-affinity antibodies for these structures would have been eliminated during development. For this reason, multiple signals appear necessary to activate a strong cellular immune response against TACA via T-cells and many attempts to generating anticancer vaccines have focused on breaking immune self-tolerance for tumor-associated gangliosides. Innovative therapeutic tools based on the use of anti-ganglioside mAbs have been developed and some of them are presently undergoing clinical evaluations for patients suffered for melanoma, neuroblastoma or small cell lung cancer. We will focus on the development of vaccine strategies targeting gangliosides in melanoma.

Given to the chemo- and radioresistance of primary tumor and the rapid development of melanoma metastasis, conventional antitumor therapies are often ineffective, encouraging the design of new therapeutic approaches. Ganglioside vaccines present several advantages in melanoma: wide applicability, being acellular and the possibility of developing an 'off the shelf' vaccine.¹²⁸ The first passive trials were undertaken at the dawn of the 1980s with the development of the mouse mAb R24.^{57,129} The anti-tumor effects of this mAb, which specifically recognizes the disialoganglioside G_{D3} , were first reported in mice. R24 is potent at mediating in vitro effector functions such as human complement-mediated cytotoxicity (CDC) and antibody-dependent cellular cytotoxicity, and can block melanoma tumor growth in animal models.¹³⁰ However, R24 used alone or in combination with cytokines or with chemotherapeutic agents, has limited success in patients with metastatic melanoma. This was related to the potential immunogenicity of R24 mAb.^{129,131–133} In this context, a chimeric antibody KM871 has been developed.¹³⁴ The intravenous injection of radiolabeled KM871 successful targeted G_{D3} -expressing xenografts in nude mice.¹³⁵ In addition, preliminary clinical results indicated that KM871 is stable in vivo and has potential for metastatic melanoma treatment.¹³⁶

The main disadvantage of ganglioside vaccines is that they do not generate cellular immunity. A promising approach to increase the effectiveness of targeted T-cell therapy of melanoma is the genetic engineering of human primary T-lymphocytes with chimeric antigen receptors (CARs), specifically recognizing ganglioside antigens over-expressed by tumor cells. Thus, Brenner and coworkers have developed a model of chimeric T-cells specific for G_{D2} by joining an extracellular antigen-binding domain derived from the G_{D2} -specific antibody sc14.G2a, with the endodomain of the co-stimulatory molecules CD28 and OX40.¹³⁷ These chimeric CAR T-cells had anti-melanoma activity both *in vitro* and in xenograft model, increasing the survival of tumor-bearing animals.¹³⁷ Similar experiments have recently shown that injection of T-cells bearing G_{D3} -specific chimeric antigen receptor (sFv-TCRzeta) in addition with CD28 costimulation domain was more potent in suppressing melanoma tumor in an *in vivo* model than sFv-TCRzeta alone.¹³⁸

Downloaded on 21 September 2012

Currently, immunologists are designing active immunotherapy strategies that may induce T-cell immune response *in vivo* by linking multiple copies of synthetic tumor-associated gangliosides to the immunogenic carrier protein keyhole limpet haemocyanin (KLH). When administered to mice and/or humans, many of these glycoconjugate vaccines elicited antibodyand cell-mediated immune responses against gangliosides. As an example, G_{D3} - or G_{D2} -KLH conjugate vaccines combined with adjuvant present a potential therapeutic interest by inducing the production of anti- G_{D3} or anti- G_{D2} antibodies and by stimulating CDC in the majority of melanoma patients.^{139–141}

7. Conclusion

Gangliosides are important components of the plasma membrane where they can interact with transmembrane receptors or signal transducers involved in cell proliferation and signaling in GSL rich microdomains.^{1,2} Usually, a-series gangliosides negatively regulate RTKs whereas b- and cseries gangliosides enhance RTKs activation, by inducing a ligandindependent dimerization of the receptors and/or interactions with other RTKs or signaling molecules at the plasma membrane. As described above, the re-expression of gangliosides from b- and c-series is a common phenotypic change observed in neuro-ectoderm related cancers. It is usually associated with a more aggressive disease and a poor prognosis for patients. It clearly appears that tumor cells take advantage of the expression of these compounds through interactions that occur between gangliosides and RTKs in cell membrane microdomains, activating RTKs phosphorylation and subsequent transduction pathways. The expression of complex gangliosides can therefore promote tumor growth independently of growth factors stimulation, which is a crucial point for tumor development in deprivation conditions that usually occurs in the tumor neighboring. By increasing cell proliferation, migration and angiogenesis, complex gangliosides also favor the formation of metastases and recent examples have shown that the organ targeting of metastatic cells may be dependent on the expression of specific glycosyltransferases involved in the biosynthesis of complex gangliosides. The fine determination of the mechanisms by which complex gangliosides can favor the organ-specific targeting is a new way of research for the next years. Moreover, the combination of anti-gangliosides and anti-RTKs mAbs in anti-cancer vaccine strategies would be a new therapeutic approach in a next future.

Abbreviations

5'UTR	5' untranslated region
ALL	acute lymphoblastic leukaemia
CAR	chimeric antigen receptor
CDC	complement-mediated cytotoxicity
Cdk	cyclin-dependent kinase
Cer	ceramide

EGF	epidermal growth factor
EGFR	EGF receptor
ER	estrogen Receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	fibroblast growth factor
GD3S	G _{D3} synthase
GlcCer	glucosylceramide
GSL	glycosphingolipids
GT	glycosyltransferase
HGF	hepatocyte growth factor
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IDC	invasive ductal breast carcinoma
IKL-Akt	Integrin-Linked Kinase-Akt
KLH	keyhole limpet haemocyanin
LacCer	lactosylceramide
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
NGF	nerve growth factor
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR	PDGF receptor
ROS	reactive oxygen species
RTK	tyrosine kinase receptors
SCID	severe combined immunodeficiency
SCLC	small cell lung cancer
ГАСА	tumor-associated carbohydrate antigens
VEGF	vascular endothelial growth factor

Acknowledgment

This work was supported by the University of Sciences and Technologies of Lille, the Association pour la Recherche sur le Cancer (Grant n° 7936 and 5023) et le comité de l'Aisne de La Ligue contre le Cancer.

References

- 1 S. I. Hakomori, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2002, 99, 225.
- 2 A. R. Todeschini and S.I. Hakomori, Biochim. Biophys. Acta, 2008, 1780, 421.
- 3 L. Svennerholm, Adv. Exp. Med. Biol., 1980, 125, 11.
- T. Yamashita, R. Wada, T. Sasaki, C. Deng, U. Bierfreund, K. Sandhoff and R. L. Proia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, 96, 9142.
- 5 K. Furukawa, K. Hamamura, W. Aixinjueluo and K. Furukawa, Ann. N.Y. Acad. Sci., 2006, **1086**, 185.
- 6 S. Ichikawa, H. Sakiyama, G. Suzuki, K.I. Hidari and Y. Hirabayashi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1996, **93**, 4638.
- 7 A. Abe, J. Inokuchi, M. Jimbo, H. Shimeno, A. Nagamatsu, J. A. Shayman, G. S. Shukla and N. S. Radin, J. Biochem., 1992, 111, 191.
- 8 T. Nomurova, M. Takizawa, J. Aoki, H. Arai, K. Inoue, E. Wakisaka, N. Yoshizuka, G. Imokawa, N. Dohmae, K. Takio, M. Hattori and N. Matsuo, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 13570.

- 9 M. Takizawa, T. Nomura, E. Wakisaka, N. Yoshizuka, J. Aoki, H. Arai, K. Inoue, M. Hattori and N. Matsuo, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1438**, 301.
- 10 G. Zeng and R. K. Yu, Curr. Drug Targets, 2008, 9, 317.
- 11 A. Ishii, M. Ohta, Y. Watanabe, K. Matsuda, K. Ishiyama, K. Sakoe, M. Nakamura, J. Inokuchi, Y. Sanai and M. Saito, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 31652.
- 12 M. A. Simpson, H. Cross, C. Proukakis, D. A. Priestman, D. C. A. Neville, G. Reinkensmeier, H. Wang, M. Wiznitzer, K. Gurtz, A. Verganelaki, A. Pryde, M. A. Patton, R. A. Dwek, T. D. Butters, F. M. Platt and A. H. Crosby, *Nature Genetics*, 2004, **36**, 1225.
- 13 M. Haraguchi, S. Yamashiro, A. Yamamoto, K. Furukawa, K. Takamiya, K. O. Lloyd, H. Shiku and K. Furukawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, 91, 10455.
- 14 J. Nakayama, M. N. Fukuda, Y. Hirabayashi, A. Kanamori, K. Sasaki, T. Nishi and M. Fukuda, J. Biol. Chem., 1996, 271, 3684.
- 15 Y. J. Kim, K. S. Kim, S. Do, C. H. Kim, S. K. Kim and Y. C. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, **235**, 327.
- 16 H. H. Chou, H. Takematsu, S. Diaz, J. Iber, E. Nickerson, K. L. Wright, E. A. Muchmore, D. L. Nelson, S. T. Warren and A. Varki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1998, 95, 11751.
- 17 A. Irie, S. Koyama, Y. Kozutsumi, T. Kawasaki and A. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 15866.
- 18 Y. Nagata, S. Yamashiro, J. Yodoi, K. O. Lloyd, H. Shiku and K. Furukawa, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 12082.
- 19 M. Amado, R. Almeida, F. Carneiro, S. B. Levery, E. H. Holmes, M. Nomoto, M.A. Hollingsworth, H. Hassan, T. Schwientek, P. A. Nielsen, E. P. Bennett and H. Clausen, *J. Biol. Chem.*, 1998, **273**, 12770.
- 20 H. Kitagawa and J. C. Paulson, J. Biol. Chem., 1994, 269, 17872.
- 21 V. Giordanengo, S. Bannwarth, C. Laffont, V. Van Miegem, A. Harduin-Lepers, P. Delannoy and J. C. Lefebvre, *Eur. J. Biochem.*, 1997, **247**, 558.
- 22 H. Iber, C. Zacharias and K. Sandhoff, *Glycobiology*, 1992, 2, 137.
- 23 S. Yamashiro, M. Haraguchi, K. Furukawa, K. Takamiya, A. Yamamoto, Y. Nagata, K.O. Lloyd, H. Shiku and K. Furukawa, *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 6149.
- 24 A. Tsuchida, M. Ogiso, Y. Nakamura, M. Kiso, K. Furukawa and K. Furukawa, J. Biochem., 2005, 138, 237.
- 25 A. Harduin-Lepers, R. Mollicone, P. Delannoy and R. Oriol, *Glycobiology*, 2005, **15**, 805.
- 26 H. J. F. Maccioni, J. L. Daniotti and J. A. Martina, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1437**, 101.
- 27 C. G. Giraudo, J. L. Daniotti and H. J. Maccioni, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2001, 98, 1625.
- 28 C. G. Giraudo and H. J. Maccioni J. Biol. Chem., 2003, 278, 40262.
- 29 J. K. Hidari, S. Ichikawa, K. Furukawa, M. Yamasaki and Y. Hirabayashi, *Biochem. J.*, 1994, **303**, 957.
- 30 S. Fukumoto, H. Miyazaki, G. Goto, T. Urano, K. Furukawa and K. Furukawa, J. Biol. Chem., 1999, 274, 9271.
- 31 K.W. Kim, S.W. Kim, K.S. Min, C.H. Kim and Y.C. Lee, *Gene*, 2001, **273**, 163.
- 32 X. Gu, U. Preuss, T. Gu and R.K. Yu, J. Neurochem., 1995, 64, 2295.
- 33 E. Bieberich, B. Freischütz, S. S. Liour and R. K. Yu, *J. Neurochem.*, 1998, **71**, 972.
- 34 R. K. Yu and E. Bieberich, Mol. Cell Endocrinol., 2001, 177, 19.

- 35 K. Nara, Y. Watanabe, I. Kawashima, T. Tai, Y. Nagai and Y. Sanai, *Eur. J. Biochem.*, 1996, **238**, 647.
- 36 A. Yamamoto, M. Haraguchi, S. Yamashiro, S. Fukumoto, K. Furukawa, K. Takamiya, M. Atsuta, H. Shiku and K. Furukawa, J. Neurochem., 1996, 66, 26.
- 37 R. K. Yu, L. J. Macala, T. Taki, H. M. Weinfield and F. S. Yu, J. Neurochem., 1988, 50, 1825.
- 38 J. L. Oblinger, D. K. Pearl, C. L. Boardman, H. Saqr, T. W. Prior, B. W. Scheithauer, R. B. Jenkins, P. C. Burger and A. J. Yates, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2006, **32**, 410.
- 39 S. Ruan and K. O. Lloyd, Cancer Res., 1992, 52, 5725.
- 40 E. Ruckhäberle, A. Rody, K. Engels, R. Gaetje, G. von Minckwitz, S. Schiffmann, S. Grösch, G. Geisslinger, U. Holtrich, T. Karn and M. Kaufmann, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2008, **112**, 41.
- 41 K. Nara, Y. Watanabe, K. Maruyama, K. Kasahara, Y. Nagai and Y. Sanai, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, **91**, 7952.
- 42 K. Sasaki, K. Kurata, N. Kojima, N. Kurosawa, S. Ohta, N. Hanai, S. Tsuji and T. Nishi, *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 15950.
- 43 K. Furukawa, M. Horie, K. Okutomi, S. Sugano and K. Furukawa, *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, **1627**, 71.
- 44 H. M. Dae, H. Y. Kwon, N. Y. Kang, N. R. Song, K. S. Kim, C. H. Kim, J. H. Lee and Y. C. Lee, *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 2009, **41**, 237.
- 45 M. Kozak, J. Cell Biol., 1989, 108, 229.
- 46 Harduin-Lepers, V. Vallejo-Ruiz, M. A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien, P. Delannoy, *Biochimie*, 2001, 83, 727.
- 47 N. Y. Kang, C. H. Kim, K. S. Kim, J. H. Ko, J. H. Lee, Y. K. Jeong and Y. C. Lee, *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, **1769**, 622.
- 48 F. Q. Wen, A. A. Jabbar, D. A. Patel, T. Kazarian and L. A. Valentino, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 1999, **19**, 519.
- 49 Y. Ohtani, Y. Tamai, Y. Ohnuki and S. Miura, Neurodegeneration, 1996, 5, 331.
- 50 S. Marconi, M. Acler, L. Lovato, L. De Toni, E. Tedeschi, E. Anghileri, S. Romito, C. Cordioli and B. Bonetti, *Mult. Scler.*, 2006, **12**, 302.
- 51 J. Portoukalian, G. Zwingelstein and J. F. Doré, *Eur. J. Biochem.*, 1979, 94, 19.
- 52 J. M. Carubia, R. K. Yu, L. J. Macala, J. M. Kirkwood and J. M. Varga, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, **120**, 500.
- 53 I. J. Thampoe, K. Furukawa, E. Vellvé and K. O. Lloyd, *Cancer Res.*, 1989, 49, 6258.
- 54 M. H. Ravindranath, T. Tsuchida, D. L. Morton and R. F. Irie, *Cancer*, 1991, 67, 3029.
- 55 S. Yamashiro, M. Okada, M. Haraguchi, K. Furukawa, K. O. Lloyd, H. Shiku and K. Furukawa, *Glycoconj. J.*, 1995, **12**, 894.
- 56 S. Birklé, L. Gao, G. Zeng and R. K. Yu, J. Neurochem., 2000, 74, 547.
- 57 W. G. Dippold, K. O. Lloyd, L. T. Li, H. Ikeda, H. F. Oettgen and L. J. Old, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980, 177, 6114.
- 58 J. Nakano, B. K. Raj, C. Asagami and K. O. Lloyd, J. Invest. Dermatol., 1996, 107, 543.
- 59 K. Hamamura, M. Tsuji, Y. Ohkawa, H. Nakashima, S. Miyazaki, T. Urano, N. Yamamoto, M. Ueda, K. Furukawa and K. Furukawa. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008, **1780**, 513.
- 60 K. Hamamura, K. Furukawa, T. Hayashi, T. Hattori, J. Nakano, H. Nakashima, T. Okuda, H. Mizutani, H. Hattori, M. Ueda, T. Urano, K.O. Lloyd and K. Furukawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005, **102**, 11041.

- 61 K. Furukawa, K. Hamamura, H. Nakashima and K Furukawa. *Proteomics.*, 2008, **8**, 3312.
- 62 J. Nakano, H. Yasui, K. O. Lloyd and M. Muto, J. Investig. Dermatol. Symp. Proc., 1999, 4, 173.
- 63 S. Birklé, G. Zeng, L. Gao, R. K. Yu and J. Aubry, *Biochimie*, 2003, 85, 455.
- 64 S. Kuphal, R. Bauer and A. K. Bosserhoff, *Cancer Metastasis Rev.*, 2005, 24, 195.
- 65 Y. Ohkawa, S. Miyazaki, K. Hamamura, M. Kambe, M. Miyata, O. Tajima, Y. Ohmi, Y. Yamauchi, K. Furukawa and K. Furukawa, J. Biol. Chem., 2010, 285, 27213.
- 66 J. Péguet-Navarro, M. Sportouch, I. Popa, O. Berthier, D. Schmitt and J. Portoukalian, *J. Immunol.*, 2003, **170**, 3488.
- 67 K. Bennaceur, I. Popa, J.A. Chapman, C. Migdal, J. Péguet-Navarro, J. L. Touraine and J. Portoukalian, *Glycobiology*, 2009, 19, 576.
- 68 C. P. Thomas, A. Buronfosse, V. Combaret, S. Pedron, B. Fertil and J. Portoukalian, *Glycoconj. J.*, 1996, **13**, 377.
- 69 C. P. Thomas, A. Buronfosse, J. Portoukalian and B. Fertil, *Br. J. Cancer*, 1997, **75**, 639.
- 70 R. Chammas, J. L. Sonnenburg, N. E. Watson, T. Tai, M. G. Farquhar, N. M. Varki and A. Varki, Cancer Res., 1999, **59**, 1337.
- 71 I. Popa, A. Pons, C. Mariller, T. Tai, J.P. Zanetta, L. Thomas and J. Portoukalian, *Glycobiology*, 2007, **17**, 367.
- 72 D. A. Cheresh, R. A. Reisfeld and A. P. Varki, Science, 1984, 225, 844.
- 73 G. Kohla, E. Stockfleth and R. Schauer, Neurochem. Res., 2002, 27, 583.
- 74 J. W. Liu, P. Sun, Q. Yan, A. S. Paller, P. Gerami, N. Ho, N. Vashi, I.C. Le Poole and X. Q. Wang, *Cancer Res.*, 2009, **69**, 8662.
- 75 N. Kanda, K. Nakai and S. Watanabe, J. Invest. Dermatol., 2001, 117, 284.
- 76 Y. Dong, K. Ikeda, K. Hamamura, Q. Zhang, Y. Kondo, Y. Matsumoto, Y. Ohmi, Y. Yamauchi, K. Furukawa, R. Taguchi and K. Furukawa, *Cancer Sci.*, 2010, **101**, 2039.
- 77 B. Berra, S. M. Gaini and L. Riboni. Int. J. Cancer, 1985, 36, 363.
- 78 N. Shinoura, T. Dohi, T. Kondo, M. Yoshioka, K. Takakura and M. Oshima, *Neurosurgery*, 1992, **31**, 541.
- 79 S. Ladisch, F. Chang, R. Li, P. Cogen and D. Johnson, *Cancer Lett.*, 1997, 120, 71.
- 80 S. Ruan, B. K. Raj and K. O. Lloyd, J. Neurochem., 1999, 72, 514.
- 81 S. Hettmer, S. Ladisch and K. Kaucic, Cancer Lett., 2005, 225, 141.
- 82 S. Hettmer, C. Malott, W. Woods, S. Ladisch and K. Kaucic, *Cancer Res.*, 2003, 63, 7270.
- 83 I. Y. Cheung, M. S. Lo Piccolo, B. H. Kushner and N. K. Cheung, J. Clin. Oncol., 2003, 21, 3853.
- 84 I. Y. Cheung, A. Sahota and N. K. Cheung, Cancer, 2004, 101, 303.
- 85 R. A. Kroes, H. He, M. R. Emmett, C. L. Nilsson, F. E. 3rd Leach, I. J. Amster, A. G. Marshall and J. R. Moskal, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010, **107**, 12646.
- 86 G. Zeng, D. D. Li, L. Gao, S. Birklé, E. Bieberich, A. Tokuda and R. K. Yu, *Biochemistry*, 1999, 38, 8762.
- 87 G. Zeng, L. Gao, S. Birklé and R. K. Yu, Cancer Res., 2000, 60, 6670.
- 88 E. Sottocornola, I. Colombo, V. Vergani, G. Taraboletti, B. Berra, *Invasion Metastasis*, 1999, 18, 142.
- 89 K. M. Hedberg, B. Dellheden, C. J. Wikstrand and P. Fredman, *Glycoconj. J.*, 2000, **17**, 717.

- 90 E. N. Noll, J. Lin, Y. Nakatsuji, R. H. Miller and P. M. Black, *Exp. Neurol*, 2001, 168, 300.
- 91 Y. Fujimoto, S. Izumoto, T. Suzuki, M. Kinoshita, N. Kagawa, K. Wada, N. Hashimoto, M. Maruno, Y. Nakatsuji and T. Yoshimine, *J. Neurooncol.*, 2005, 71, 99.
- 92 Y. Nakatsuji and R. H. Miller, Exp. Neurol., 2001, 168, 290.
- 93 T. N. Seyfried and P. Mukherjee, J. Oncol., 2010, Epub 2010 Jun 20. PMID:20634908
- 94 B. L. Mirkin, S. H. Clark and C. Zhang, Cell Prolif., 2002, 35, 105.
- 95 S. Yoshida, S. Fukumoto, H. Kawaguchi, S. Sato, R. Ueda and K. Furukawa, *Cancer Res.*, 2001, **61**, 4244.
- 96 D. A. Cheresh, J. Rosenberg, K. Mujoo, L. Hirschowitz and R. A. Reisfeld, *Cancer Res.*, 1986, **46**, 5112.
- 97 S. C. Grant, L. Kostakoglu, M. G. Kris, S. D. Yeh, S. M. Larson, R. D. Finn, H. F. Oettgen and N. V. Cheung, *Eur. J. Nucl. Med.*, 1996, 23, 145.
- 98 K. Ko, K. Furukawa, T. Takahashi, T. Urano, Y. Sanai, M. Nagino, Y. Nimura and K. Furukawa, *Oncogene*, 2006, 25, 6924.
- 99 W. Aixinjueluo, K. Furukawa, Q. Zhang, K. Hamamura, N. Tokuda, S. Yoshida, R. Ueda and K. Furukawa, *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 29828.
- 100 G. Marquina, H. Waki, L.E. Fernandez, K. Kon, A. Carr, O. Valiente, R. Perez and S. Ando, *Cancer Res.*, 1996, **56**, 5165.
- J. P. Oliva, Z. Valdes, A. Casaco, G. Pimentel, J. Gonzalez, I. Alvarez, M. Osorio, M. Velazco, M. Figueroa, R. Ortiz, X. Escobar, M. Orozco, J. Cruz, S. Franco, M. Díaz, L. Roque, A. Carr, A. M. Vázquez, C. Mateos, M. C. Rubio, R. Pérez and L. E. Fernández, *Breast Cancer Res. Treat.*, 2006, 96, 115.
- 102 K. Nohara, F. Wang and S. Spiegel, Breast Cancer Res. Treat., 1998, 48, 149.
- 103 E. Ruckhäberle, T. Karn, A. Rody, L. Hanker, R. Gätje, D. Metzler, U. Holtrich and M. Kaufmann, J. Cancer Res. Clin. Oncol., 2009, 135, 1005.
- 104 J. Carcel-Trullols, J. S. Stanley, R. Saha, S. Shaaf, M. S. Bendre, B. Monzavi-Karbassi, L.J. Suva and T. Kieber-Emmons, *Int. J. Oncol.*, 2006, 28, 1173.
- 105 A. Cazet, S. Groux-Degroote, B. Teylaert, K. M. Kwon, S. Lehoux, C. Slomianny, C. H. Kim, X. Le Bourhis and P. Delannoy, *Biol. Chem.*, 2009, 390, 601.
- 106 A. Cazet, J. Lefebvre, E. Adriaenssens, S. Julien, M. Bobowski, A. Grigoriadis, A. Tutt, D. Tulasne, X. Le Bourhis and P. Delannoy, *Mol. Cancer Res.*, 2010, 8, 1526.
- 107 P. D. Bos, X. H. Zhang, C. Nadal, W. Shu, R. R. Gomis, D. X. Nguyen, A. J. Minn, M. J. van de Vijver, W. L. Gerald, J. A. Foekens and J. Massagué, *Nature*, 2009, 459, 1005.
- 108 V. S. Shirure, K. A. Henson, R. L. Schnaar, L. Nimrichter and M. M. Burdick, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, 406, 423.
- 109 K. Mukherjee, A.K. Chava, C. Mandal, S.N. Dey, B. Kniep, S. Chandra and C. Mandal, J. Cell Biochem., 2008, 105, 724.
- 110 C. Mandal, C. Tringali, S. Mondal, L. Anastasia, S. Chandra, B. Venerando and C. Mandal, *Int. J. Cancer*, 2010, **126**, 337.
- 111 M. H. Ravindranath, S. Muthugounder, N. Presser, S. R. Selvan, A. D. Santin, S. Bellone, T. S. Saravanan and D. L. Morton, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, 353, 251.
- 112 N. Kojima and S. I. Hakomori, J. Biol. Chem., 1991, 266, 17552.
- 113 M. A. Lemmon and J. Schlessinger, Cell, 2010, 141, 1117.
- 114 P.C. Ma, G. Maulik, J. Christensen and R. Salgia, *Cancer Metastasis Rev.*, 2003, 22, 309.

- 115 L. Beviglia, K. Matsumoto, C. S. Lin, B. L. Ziober and R. H. Kramer, *Int. J. Cancer*, 1997, **73**, 301.
- 116 N. A. Cipriani, O. O. Abidoye, E. Vokes and R. Salgia, *Lung Cancer*, 2009, 63, 169.
- 117 A. Z. Lai, J. V. Abella and M. Park, Trends Cell. Biol., 2009, 19, 542.
- 118 S. Y. Park, S. J. Yoon, L. Freire-de-Lima, J. H. Kim and S. I. Hakomori, *Carbohydr. Res.*, 2009, **344**, 1479.
- 119 A. R. Todeschini, J. N. Dos Santos, K. Handa and S. I. Hakomori, *J. Biol. Chem.*, 2007, **282**, 8123.
- 120 E. A. Miljan and E. G. Bremer, Sci. STKE, 2002, 160, re15.
- 121 K. Kaucic, Y. Liu and S. Ladisch, Methods Enzymol., 2006, 417, 168.
- 122 S. J. Yoon, K. Nakayama, T. Hikita, K. Handa and S. I. Hakomori, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, **103**, 18987.
- 123 N. Kawashima, S. J. Yoon, K. Itoh and K. Nakayama, J. Biol. Chem., 2009, 284, 6147.
- 124 Y. Liu, R. Li and S. Ladisch, J. Biol. Chem., 2004, 279, 36481.
- 125 A. R. Todeschini, J. N. Dos Santos, K. Handa and S. I. Hakomori, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, **105**, 1925.
- 126 S. Fukumoto, T. Mutoh, T. Hasegawa, H. Miyazaki, M. Okada, G. Goto, K. Furukawa and T. Urano, *J. Biol. Chem.*, 2000, **275**, 5832.
- 127 Z. Lang, M. Guerrera, R. Li and S. Ladisch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2001, **282**, 1031.
- 128 A. M. Terando, M. B. Faries and D. L. Morton, Vaccine, 2007, 25 Suppl 2, B4.
- 129 A. N. Houghton, D. Mintzer, C. Cordon-Cardo, S. Welt, B. Fliegel, S. Vadhan, E. Carswell, M. R. Melamed, H. F. Oettgen and L. J. Old, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, 82, 1242.
- 130 M. L. Nasi, M. Meyers, P. O. Livingston, A. N. Houghton and P. B. Chapman, *Melanoma Res.*, 1997, **2**, 155.
- 131 S. Vadhan-Raj, C. Cordon-Cardo, E. Carswell, D. Mintzer, L. Dantis, C. Duteau, M. A. Templeton, H. F. Oettgen, L. J. Old and A. N. Houghton, J. Clin. Oncol., 1988, 6, 1636.
- 132 D. F. Bajorin, P. B. Chapman, G. Wong, D.G. Coit, J. Kunicka, J. Dimaggio, C. Cordon-Cardo, C. Urmacher, L. Dantes, M. A. Templeton, J. Liu, H. F. Oettgen and A. N. Houghton, *Cancer Res.*, 1990, **50**, 7490.
- 133 J. M. Kirkwood, R. A. Mascari, H. D. Edington, M. S. Rabkin, R. S. Day, T. L. Whiteside, D. R. Vlock and J. M. Shipe-Spotloe, *Cancer*, 2000, 88, 2693.
- 134 K. Shitara, Y. Kuwana, K. Nakamura, Y. Tokutake, S. Ohta, H. Miyaji, M. Hasegawa and N. Hanai, *Cancer Immunol. Immunother.*, 1993, **36**, 373.
- 135 A. M. Scott, F.T. Lee, W. Hopkins, J. S. Cebon, J. M. Wheatley, Z. Liu, F. E. Smyth, C. Murone, S. Sturrock, D. MacGregor, N. Hanai, K. Inoue, M. Yamasaki, M. W. Brechbiel, I. D. Davis, R. Murphy, A. Hannah, M. Lim-Joon, T. Chan, G. Chong, G. Ritter, E. W. Hoffman, A. W. Burgess and L. J. Old, J. Clin. Oncol., 2001, 19, 3976.
- 136 A. M. Scott, Z. Liu, C. Murone, T. G. Johns, D. MacGregor, F. E. Smyth, F. T. Lee, J. Cebon, I. D. Davis, W. Hopkins, A. J. Mountain, A. Rigopoulos, N. Hanai and L. J. Old, *Cancer Immun.*, 2005, 22, 3.
- 137 E. Yvon, M. Del Vecchio, B. Savoldo, V. Hoyos, A. Dutour, A. Anichini, G. Dotti and M. K. Brenner, *Clin. Cancer Res.*, 2009, 15, 5852.
- 138 A.S. Lo, Q. Ma, D.L. Liu and R. P. Junghans, *Clin. Cancer Res.*, 2010, 16, 2769.
- 139 P. B. Chapman, D. Wu, G. Ragupathi, S. Lu, L. Williams, W. J. Hwu, D. Johnson and P. O. Livingston, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 4717.

- 140 G. Ragupathi, P. O. Livingston, C. Hood, J. Gathuru, S. E. Krown, P. B. Chapman, J. D. Wolchok, L. J. Williams, R. C. Oldfield and W. J. Hwu, *Clin. Cancer Res.*, 2003, 9, 5214.
- 141 G. Ragupathi, M. Meyers, S. Adluri, L. Howard, C. Musselli and P. O. Livingston, *Int. J. Cancer*, 2000, **85**, 659.

Résumé

La G_{D3} synthétase (GD3S, ST8Sia I) est la seule α 2,8-sialyltransférase capable de synthétiser le disialoganglioside G_{D3} à partir du G_{M3}. Elle contrôle ainsi la biosynthèse des gangliosides des séries b- et c, tels que le G_{D3} et le G_{D2}. Les gangliosides des séries b- et c- sont principalement exprimés au cours de l'embryogenèse, dans le système nerveux chez l'adulte, et réapparaissent dans certaines tumeurs d'origine neuroectodermique. Ainsi, le G_{D3} et le G_{D2} sont des marqueurs oncofœtaux du mélanome et du neuroblastome où ils jouent un rôle clef dans la progression tumorale. Les disialogangliosides sont également surexprimés dans environ 50 % des carcinomes mammaires canalaires infiltrants. D'autre part, le GD2 et la GD3S ont récemment été décrits comme marqueurs des cellules souches de cancer du sein, critique pour l'initiation tumorale. De plus, une surexpression du gène ST8SIA1, codant la G_{D3} synthétase a été observée dans les tumeurs de sein négatives pour le récepteur aux œstrogènes (ER-). De manière à comprendre le rôle de la G_{D3} synthétase dans la progression du cancer du sein, un modèle de cellules de cancer du sein MDA-MB-231 exprimant la GD3S a été créé au laboratoire. Contrairement aux cellules contrôles, les cellules GD3S+ expriment des gangliosides complexes et sont capables de migrer et de proliférer en l'absence de facteur de croissance, du fait de l'activation constitutive du récepteur c-Met et des voies de signalisation intracellulaire MEK/ERK et PI3K/Akt.

Le premier objectif de ma thèse a été de déterminer les gangliosides impliqués dans activation de c-Met et le phénotype prolifératif des cellules MDA-MB-231 GD3S+. Des analyses de spectrométrie de masse ont montré que le G_{D2} et le G_{D3} sont les gangliosides majoritaires dans les cellules GD3S+ alors que les cellules contrôles accumulent principalement du G_{M3} et du G_{M2} . De plus, nous avons montré que le ganglioside G_{D2} induit spécifiquement l'activation de c-Met et le phénotype prolifératif dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+, probablement par une interaction spécifique entre c-Met et la partie oligosaccharidique du G_{D2} .

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à comprendre les mécanismes moléculaires responsables de la surexpression de *ST8SIA1* dans les tumeurs ER-. Par des expériences de 5'-RACE, nous avons décrit le transcrit majeur de la G_{D3} synthétase dans les tumeurs mammaires. De plus, nous avons caractérisé pour la première fois, le promoteur minimal essentiel à la transcription de *ST8SIA1* dans les cellules de cancer du sein. Enfin, nous avons montré que l'œstradiol réprime l'expression des ARNm de la GD3S dans les cellules MCF-7 (ER+) et dans les cellules Hs578T (ER-), préalablement transfectées avec un vecteur codant ER α . Le promoteur minimal de *ST8SIA1* est également réprimé par l'œstradiol dans les cellules de cancer du sein exprimant le récepteur ER α , montrant que la répression de *ST8SIA1* par l'œstradiol est dépendante du récepteur ER α .

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la forte expression de *ST8SIA1* dans les tumeurs ER-, suite à la perte de signalisation par ER α , pourrait augmenter l'expression des gangliosides complexes tels que le G_{D2} à la surface cellulaire, et ainsi contribuer à l'agressivité de ce soustype de tumeur.

Abstract

The G_{D3} synthase (GD3S, ST8Sia I) is the only α 2,8-sialyltransferase that synthesizes the disialoganglioside G_{D3} from G_{M3} . It is therefore the key enzyme for the biosynthesis of b- and c-series gangliosides, such as G_{D3} and G_{D2} . Essentially expressed during embryogenesis and in the central nervous system in adult, the expression of b- and c- series gangliosides increases in several diseases including neuro-ectoderm derived cancer. In particular, G_{D3} and G_{D2} are oncofetal markers in melanoma and neuroblastoma, where they play a key role in tumor progression. Disialogangliosides are also over-expressed in about 50 % of invasive ductal breast carcinoma. Moreover, G_{D2} and GD3S have been also recently identified as markers of breast cancer cell stems, critical for tumor initiation. Finally, clinical studies have showed a high expression of GD3S in Estrogen Receptor negative (ER-) breast tumors. In order to determine the role of G_{D3} synthase in breast cancer cell line. The resulting MDA-MB-231 GD3S+ cells displayed an increased migration and a proliferative phenotype in absence of growth factor that directly proceed from the constitutive activation of c-Met receptor and MEK/ERK et PI3K/Akt signaling pathways.

The first aim of my thesis was to determine the gangliosides involved in c-Met activation and proliferative phenotype of MDA-MB-231 GD3S+ cells. Mass spectrometry analysis revealed that G_{D2} and G_{D3} are the main gangliosides expressed in GD3S+ cells whereas control cells mainly accumulate G_{M2} and G_{M3} . We also demonstrated that G_{D2} is directly involved in the constitutive activation of c-Met in absence of the ligand HGF/SF, probably through specific interaction between c-Met and the oligosaccharide moiety of G_{D2} .

Secondly, we have undertaken the study of the molecular mechanisms responsible for *ST8SIA1* over-expression in ER- tumors. Thanks to 5'-RACE analysis, we described the main *ST8SIA1* transcript expressed in breast tumors. Moreover, we characterized for the first time the core promoter, essential for *ST8SIA1* transcription in breast cancer cells. Finally, we showed that estradiol represses endogenous GD3S mRNA expression in ER+ MCF-7 cells and in ER- Hs578T cells, previously transfected with ER α encoding vector. *ST8SIA1* core promoter is also down-regulated by estradiol in ER α -expressing breast cancer cells, showing an ER α -mediated repression of GD3S through estradiol.

Altogether, these results suggest that high expression of GD3S in ER negative tumours, due to the loss of ER α signalling, could increase complex gangliosides such as G_{D2} at the cell surface, and possibly enhance the aggressiveness of this tumour subtype.