

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE LILLE1

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE DE LILLE

pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université de Lille

par

Agata Steenackers

Etude du rôle de la GD3 synthétase et des gangliosides complexes dans la prolifération et la migration des cellules de cancer du sein

Soutenue le 28 novembre 2013 devant la commission d'examen :

Président :	Pr. Annick PIERCE	Université Lille 1
Rapporteurs :	Pr. Christelle BRETON	Université Grenoble 1
	Pr. Philippe BECUWE	Université Henri Poincaré Nancy 1
Examineurs :	Pr. Xuefen LE BOURHIS	Université Lille 1
	Dr. Jacques LE PENDU	Université Nantes
Directeur :	Pr. Philippe DELANNOY	Université Lille 1

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je voudrais remercier le Professeur **Philippe Delannoy** de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je sais que j'ai eu énormément de chance d'avoir intégré votre équipe, merci à vous de ne pas m'avoir facilité la tâche au début de mon intégration car vous me parliez constamment en français, mais également pour votre patience. C'est donc grâce à cela que je suis maintenant autonome dans mes travaux et que je possède le niveau de compréhension oral du français. Je vous remercie également de m'avoir permis de mener mon projet de thèse à terme, aussi bien par les discussions scientifiques échangées mais également par l'achat de produits parfois onéreux. Vous m'avez permis de collaborer avec d'autres équipes et de voyager pour présenter mes travaux afin d'en débattre scientifiquement, ce qui m'a permis d'évoluer et d'avoir une vision différente sur mon projet. Je souhaite tout simplement vous dire « Dziekuje Bardzo ! »

Je veux également remercier **Xuefen** d'avoir accepté d'être ma co-directrice de thèse. Vous avez également su m'accueillir au sein de votre laboratoire et toujours su trouver le temps nécessaire afin de m'orienter et me conseiller pour l'avancement de mon projet. Merci de vous être intéressée non seulement à mes travaux mais également à ma situation familiale. Merci pour l'ensemble des discussions que nous avons partagées.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury :

Les professeurs **Christelle Breton** et **Philippe Becuwe** pour l'honneur qu'ils me font d'être les rapporteurs de ma thèse.

Le professeur **Annick Pierce**, c'est un grand plaisir pour moi que vous ayez accepté la présidence de ce jury de thèse.

Le Docteur **Jacques Le Pendu**, je suis heureuse que vous ayez accepté d'être examinateur de ma thèse.

Jean-Claude Michalski, merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, merci pour votre gentillesse et votre rire communicatif.

Sophie, tu sais très bien ce que je pense, tu es l'amie que j'ai gagnée durant ma thèse et je sais que nous le resterons dans le futur et cela même si je ne serai plus présente au C9. Merci pour tous tes conseils concernant le Western blot et la préparation des lamelles pour microscopie confocale, bien sûr pour toutes les corrections et remarques apportées durant la rédaction de ma thèse. Tu as toujours su me donner le courage mais également ton épaule dans les moments difficiles. Toutes nos discussions m'ont permis de me projeter vers l'avenir autrement que ce que j'imaginai. Merci encore !!!! Les pauses café du matin vont me manquer énormément 😊.

Marie Bobowski, petite polonaise aussi mais qui ne le parle pas 😊, merci d'avoir partagé notre bureau pendant ces années, toutes les discussions et les conseils de biologie

moléculaire, merci pour les bons moments passés en soirée et de m'avoir accueillie chez toi ensuite, merci pour la mémorable randonnée en vélo dans Lille à 4h00 du matin mais également pour les congrès que nous avons suivis ensemble, tu es ma partenaire de chambre préférée !!!

Aurélié, merci de m'avoir intégrée de la meilleure façon possible dans mon projet de recherche, tu as toujours été très motivée et patiente envers moi dans mes débuts au laboratoire et en français, petite référence à ta thèse, je dis toujours autant « Ca m'énerve »

Florent, mon vrai ami, merci de m'avoir toujours écoutée, de m'avoir donné des conseils, tes humeurs bonnes et mauvaises vont me manquer beaucoup, merci également pour le temps passé à l'extérieur du laboratoire. La soirée de ta thèse n'est pas oubliable !!!

Cindy W, petite nouvelle thésarde recrutée dans l'équipe, merci pour ta gentillesse, toutes nos discussions et ton aide pour me faire comprendre les papiers administratifs qui m'énervent ! Le temps passé ensemble été très sympa, surtout d'avoir partagé le même vélo pour rentrer chez Marie, rien que d'y repenser je suis morte de rire. Bon courage à toi pour la suite.

Marie-Ange, une corse avec un nom polonais, merci pour ta disponibilité quand j'avais besoin de toi, tu es une personne avec un grand cœur qui est toujours prête à rendre service aux autres, merci beaucoup à toi.

Lucie et Dorothée, deux filles toujours souriantes, c'était pour moi un plaisir de vous voir chaque matin avec votre bonne humeur communicative, qui m'a toujours donné de bonnes énergies dans mon travail.

Anne, merci à toi qui a toujours trouvé le temps pour me donner de bons conseils scientifiques et le courage dans la dernière ligne droite.

Sylvain, merci pour tes conseils mais également pour la préparation d'échantillons pour le FACS, cela m'a vraiment aidée !

Sandy, j'espère que tu as été satisfaite d'avoir effectué ton stage dans notre équipe et d'avoir fait les manipulations avec moi. Je te souhaite le meilleur pour ton M2.

Nadège et Héla, avec moi nous étions la zumba team ! Merci de votre motivation pour faire du sport, toujours avec la bonne humeur, ce qui m'a permis de me changer les idées. Merci Nadège pour le covoiturage que nous avons effectué ensemble.

Hande, ma turque devenue maintenant française et partenaire d'escalade, merci pour avoir partagé ces années de M2 et de thèse ensemble, bien sûr le temps difficile passé à la bibliothèque ensemble pour la rédaction, merci pour ta gentillesse, les moments passés en Pologne. Je te souhaite le meilleur du fond du cœur. Bisous.

Mr Maes, merci pour ton humour assez spécial mais qui m'a quand même fait rire, parfois tu pourrais être plus sérieux ! 😊. Ca va me manquer que tu m'imites parler français, personne ne le fait mieux que toi, tu as un vrai talent, tu devrais songer à te reconverter. Merci, pour les bons moments passés ensemble à Valjoly et surtout la bataille de kayak.

Cindy, merci d'avoir partagé le box 1 en salle de culture, tu es une fille très gentille et travailleuse. Tu feras une très bonne maman, et je te souhaite bon courage.

Marlène, maman de la salle de culture, merci de m'avoir enseigné et donné des conseils sur comment nous occuper de nos petites cellules.

Dominique, merci pour ton sourire, tes compliments et le temps passé ensemble en culture, avec toutes les blagues que tu racontées le temps semblait moins long.

Martine, Gaëlle, Nadège, Yvon, merci à vous pour votre support administratif, qui est pour moi une vrai galère, désolée de ne jamais avoir respecté le temps pour les fournitures mais c'était toujours une urgence.

Je tiens à remercier d'autres membres du laboratoire :

Estelle, Adeline, vous êtes géniales mais aussi des supers fêtardes, **Yoann, Béatrice, Virginie, Remi, Jonathan, Jorick, Ludivine, Pierre, Anne-Sophie, Eudoxie, Steffi, Ugo, Malika, Karine, Vanessa, Tony, Ikram, Anne-Marie, Bernadette, Lan-Yi**, mais également beaucoup d'autres que j'aurais oubliés. Vous êtes tous très sympa, ce fut toujours un plaisir de vous voir pendant ces années et de discuter avec vous.

Les membres du SN3, **Robert-Allain, Elisa, Léo, Mathieu** pour vos conseils en biologie cellulaire et la mise au point de test de blessure, et m'avoir toujours fait de la place pour travailler dans votre laboratoire.

Nils, Alex, François et Juliette, une vrai petite équipe de basket que nous formons, j'ai adoré passer mon mercredi midi à jouer avec vous, vous êtes tous différents et adorables, Nils avec ta petite danse avant de shooter, François avec tes fesses en arrière, Alex avec ton genou en l'air, fais un peu attention. Juju tu n'as pas de mimique particulière mais heureusement que tu étais là avec moi pour amener un peu de délicatesse parmi ces brutes.

Suzelle et Jean-Pierre, merci beaucoup d'avoir gardé mes enfants pendant ma thèse, grâce à vous je ne me suis jamais sentie presser de rentrer à la maison après mes journées au laboratoire car je savais que mes enfants étaient entre de bonnes mains. Merci Suzelle pour les « gamelles » que je ramenait à la maison le soir, et merci à toi Jean-Pierre de me rappeler tout ce que je peux oublier.

Ewa (Ewka marchewka 😊), j'etes najwspanialsza siostra jaka sobie mozna wymarzyc !!!! Dziekuje Ci za to, ze zawsze moge na Tobie polegac. Mimo ze dzieli nas odleglosc zawsze

dodawalas mi slowa otuchy w trudnych chwilach, wiec dzieki za te wszystkie godziny spedzone przed skype ! Oczywiscie dziekuje za pomoc w angielskim !

Grzegorz (Grzesiu Czesiu) pewnie myslales, ze zapomniałam o Tobie ☺ Dziekuje za to jaki jestes : zawsze wesoly i otwarty na ludzi i chetny do pomocy ! Dziekuje, ze zawsze pamietasz o Kacperku i Ilyanie- uwielbiam Cie za to !!! Fajnie ze woda sodowa nie uderzyla Ci do glowy po tym awansie ☺.

Bozenka i Krzysiu, kochani Rodzice dziekuje Wam za to, ze zawsze we mnie wierzylicie i ze absolutnie zawsze moge na Was liczyc ! Tato dziekuje ze puscales mame na tak dlugo do Polski, zeby mogla zaopiekowac sie moimi « aniolkami » ale wiem ze sie nie zanudziles bo urzadziles pieknie mieszkanie ☺ Mamo BARDZO DZIEKUJE za pomoc i wytrwalosc i spokoj (chociaz z tym ostatnim to nie wiem jak bylo ☺) w opiece nad dziecmi podczas pisania pracy ! Dziekuje za WSZYSTKO !

Anna Masajada, kochana ciociu dziekuje Ci z calego serca za to, ze przyjezdzajac do Polski zawsze czuje sie jak w domu, dziekuje za pomoc w opiece nad dziecmi podczas wakacji, a wiem ze nie bylo lekko ☺.

Kacper et Ilyan mes deux petits diables d'amour, merci de toujours m'avoir empêchée de travailler à la maison lorsque j'en avais besoin, et de toujours jouer en silence, vive les bouchons d'oreilles !!!! Je vous aime énormément☺.

Florian tu es vraiment un mari génial, qui a toujours trouvé le temps pour m'aider et d'essayer de faire le mieux possible pour que je puisse travailler tranquillement, merci vraiment pour les corrections que tu as apportées durant ma rédaction même si tu n'es pas spécialisé dans ce domaine, mais maintenant je peux dire que toi aussi tu es un « Glycobiologiste » ☺. Bien sûr, merci pour m'avoir également permis d'avoir une vie d'étudiante et de supporter de m'entendre râler et d'être stressée même si ce n'était pas facile, merci pour tout.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au sein de :

- De l'Unité de « Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle » (Unité Mixte de Recherche 8576 du CNRS, Université Lille Nord de France, dirigée par le Docteur Jean-Claude Michalski), sous la direction du Professeur Philippe Delannoy,
- Du laboratoire « Signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein. Protéomique fonctionnelle » INSERM U908, Université Lille Nord de France, sous l'encadrement du Professeur Xuefen Le Bourhis.

L'ensemble de ces travaux a été financé par l'Université Lille Nord de France, l'Association de la Recherche 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 :

Hottin A, Wright DW, **Steenackers A**, Delannoy P, Dubar F, Biot C, Davies GJ, Behr JB. α -L-Fucosidase Inhibition by Pyrrolidine-Ferrocene Hybrids: Rationalization of Ligand-Binding Properties by Structural Studies. *Chemistry*. 2013, 15;19(29):9526-33

Martinez P, Vergoten G, Colomb F, Bobowski M, **Steenackers A**, Carpentier M, Allain F, Delannoy P, Julien S. Over-sulfated glycosaminoglycans are alternative selectin ligands: insights into molecular interactions and possible role in breast cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Jun 6.

Bobowski M, Vincent A, **Steenackers A**, Colomb F, Van Seuningen I, Julien S, Delannoy P. Estradiol represses the G_{D3} synthase gene *ST8SIA1* expression in breast cancer by preventing NF κ B binding to *ST8SIA1* promoter. *Plos One*. 2013, 23;8(4):e62559

Steenackers A, Vanbeselaere J, Cazet A, Bobowski M, Rombouts Y, Colomb F, Le Bourhis X, Guérardel Y, Delannoy P. Accumulation of Unusual Gangliosides GQ3 and GP3 in Breast Cancer Cells Expressing the GD3 Synthase. *Molecules*. 2012, **17**: 9559-72.

Colomb F, Krzewinski-Recchi MA, El Machhour F, Mensier E, Jaillard S, **Steenackers A**, Harduin-Lepers A, Lafitte JJ, Delannoy P, Groux-Degroote S. TNF regulates sialyl-Lewis(x) and 6-sulfo-sialyl-Lewis(x) expression in human lung through up-regulation of ST3GAL4 transcript isoform BX. *Biochimie*. 2012, **94**: 2045-53.

Hottin A, Dubar F, **Steenackers A**, Delannoy P, Biot C, Behr JB. Iminosugar-ferrocene conjugates as potential anticancer agents. *Org Biomol Chem*. 2012, **10**: 5592-7.

Bobowski M, Cazet A, **Steenackers A**, Delannoy P. Role of Complex Gangliosides in Cancer. *Carbohydr. Chem*. 2012, **37**, 1-20. Review.

Cazet A, Bobowski M, Rombouts Y, Lefebvre J, **Steenackers A**, Popa I, Guérardel Y, Le Bourhis X, Tulasne D, Delannoy P. The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase. *Glycobiology*. 2012, **22**: 806-16.

Steenackers A, Cazet A, Bobowski M, Rombouts Y, Lefebvre J, Guérardel Y, Tulasne D, Le Bourhis X, Delannoy P. Expression of G_{D3} synthase modifies ganglioside profile and increase migration of MCF-7 breast cancer cells. *C. R. Chimie* 2012, **15**: 3-14.

COMMUNICATION ORALE:

Steenackers A, Vanbeselaere J, Bobowski M, Colomb F, Le Bourhis X, Guérardel Y, Delannoy P.

Accumulation of unusual gangliosides in breast cancer cells expressing the GD3 synthase.
SIALOGLYCO 2012, 7th International Conference on Sialic Acids, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, September 9-12, 2012.

COMMUNICATION PAR AFFICHE:

Steenackers A, Cazet A, Bobowski M, Le Bourhis X, Delannoy P.

Effect of the expression of G_{D3} synthase on two different breast cancer cells lines MCF-7 and MDA-MB-231.

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

- **4^{èmes} Journées du Cancéropole Nord-Ouest**, May 5-6, 2011, Deauville, France

- **5^{ème} Colloque Glycosciences & Santé**, 6 Juin, 2011, Nantes, France.

Steenackers A, Cazet A, Bobowski M, Rombouts Y, Lefebvre J, Guérardel Y, Tulasne D, X Le Bourhis, Delannoy P.

Expression of GD3 synthase modifies the ganglioside profile and increases migration of MCF-7 breast cancer cells.

- **22th Joint Meeting of Glycobiology**, November 27-29, 2011, Lille, France

- **10th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium**, Den Haag, The Netherlands, March 31 – April 3, 2012

Steenackers A, Cazet A, Bobowski M, Vanbeselaere J, Rombouts Y, Colomb F, Guérardel Y, Le Bourhis X, Delannoy P.

Effect of the expression of GD3 synthase in MCF-7 breast cancer cells.

GFG 2012 – 24^{èmes} Journées du Groupe Français des Glycosciences, Domaine du ValJoly, 21-25 mai 2012.

Steenackers A, Vanbeselaere J, Bobowski M, Colomb F, Le Bourhis X, Guérardel Y, Delannoy P.

Accumulation of unusual gangliosides in breast cancer cells expressing the GD3 synthase.

SIALOGLYCO 2012, 7th International Conference on Sialic Acids, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, September 9-12, 2012.

Steenackers A, Vanbeselaere J, Bobowski M, Colomb F, Le Bourhis X, Guérardel Y, Delannoy P.

Accumulation des gangliosides inhabituels G_{Q3} et G_{P3} dans les clones MCF-7 exprimant la G_{D3} synthétase. **6^{èmes} Journées du Cancéropole Nord-Ouest**, May 15-17, 2013, Deauville, France

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION	9
I- Les glycosphingolipides	9
II- Les gangliosides	13
1- Structure et nomenclature de la famille ganglio-	13
2- Localisation subcellulaire	15
3- Biosynthèse des glycosphingolipides de la série ganglio-	17
4- Catabolisme des gangliosides	19
III- Mécanismes de régulation du métabolisme des gangliosides	22
1- Rôle des glycosyltransférases dans la régulation de la biosynthèse des gangliosides	22
a- Régulation transcriptionnelle	22
b- La disponibilité de substrat et l'organisation supramoléculaire sont des éléments de régulation des GTs	25
c- Modifications post traductionnelles	26
• N-glycosylation	26
• Phosphorylation	26
• Influence du pH	27
2- Métabolisme des gangliosides membranaires	27
3- La GD3 synthétase, carrefour de la biosynthèse des gangliosides complexes	28
IV- Rôles physiologiques des gangliosides	31
1 - Rôle fonctionnel des gangliosides dans le développement embryonnaire et le système nerveux central	31
1- La reconnaissance cellulaire dépendante des gangliosides	
a- Les gangliosides récepteurs pour les pathogènes	33

b -Les gangliosides du système nerveux central sont des récepteurs des glycoprotéines MAG	34
V- Rôles des gangliosides dans les pathologies	35
1- Rôle des gangliosides dans les tumeurs	36
a- Mélanome	36
b- Les tumeurs cérébrales	38
c- Les gangliosides dans les tumeurs pulmonaires	39
d- Les gangliosides complexes dans le cancer du sein	40
2- Gangliosides et modulation des signaux transmembranaires pendant la carcinogénèse	41
a- Régulation des RTK par les gangliosides	42
• Le récepteur EGFR et les gangliosides	42
• Récepteur Met et gangliosides	43
• VEGFR et les gangliosides	44
b- Intégrines et gangliosides	44
c- Interaction des gangliosides avec des protéines de la matrice extracellulaire	45
2- es gangliosides, cibles pour la thérapie des cancers	L
a- Anti-G _{D2} mAbs	47
b- Anti-G _{D3} mAbs	48
VI- Le cancer du sein	49
1- Les caractéristiques des tumeurs mammaires	49
a- Classification histologique	49
b- Classification anatomo-clinique	51
c- La classification moléculaire	52
2- Processus de la tumorigénèse	53
3- Formation de la tumeur primaire et événement génétique	54
a- Gènes suppresseurs de tumeurs	54

b- Activation d'oncogène	57
4- Régulation épigénétique	59
a- Méthylation de l'ADN	59
b- Hypo-acétylation	60
5- Invasion et métastases	60
a- Les gènes d'initiation du processus métastatique	60
b- Les gènes impliqués dans la dissémination	61
c- Les gènes impliqués dans la colonisation spécifique des tissus	62
• Gènes impliqués dans les métastases cérébrales	63
6- Les cellules souches de cancer du sein	64
VII- Contexte de la thèse	64
1- Modèle cellulaire MDA-MB-231 GD3S+	64
VIII- Objectifs de thèse	65
RESULTATS	68
1- Effet de l'expression de la GD3 synthétase dans les cellules MCF-7	68
2- Effet de l'expression des gangliosides dans les cellules MCF-7 doublement transfectées	82
3- Nouveau modèle cellulaire MDA-MB-231 sur-exprimant la GD3S	105
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	114
I- Effet de l'expression de la GD3S sur le développement de la tumeur mammaire	114
1- Rappel des résultats obtenus	116
2- L'expression de la GD3S dans les différentes lignées cellulaires	118
a- La GD3 synthétase contrôle l'expression des gangliosides complexes dans la membrane plasmique	116
b- Effet de l'expression de la GD3S dans les lignées cellulaires du cancer du sein sur la prolifération et la migration des cellules.	118
c- Modèle cellulaire MDA-MB-231 GD3S+ et activation spécifique des RTKs	120

d- Invasion et métastases des cellules MDA-MB-231 GD3S+	122
MATERIEL ET METHODES	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique

AGAT: Antigènes Glucidiques Associés aux tumeurs

ALDH: Aldéhyde déshydrogénase

AMPc: Adénosine MonoPhosphate cyclique

APP: Amyloid Precursor Protein

ARN: Acide Ribonucléique

A β : Protéine amyloïde β

BCSC: Cellules souches de cancer du sein

β 3Gal T4: G_{A1}/G_{M1a}/G_{D1b}/G_{T1c} synthétase

β 4GalNAc T1: G_{A2}/G_{M2}/G_{D2}/G_{T2} synthétase

BRCA1: Breast Cancer Suceptibility 1

BRCA2: Breast Cancer Suceptibility 2

Cer: Céramide

CERT: Ceramide Transport protein

c-Met: Tyrosine kinase receptor for hepatocyte growth factor

CMP-Neu5Ac : Cytidine monophosphate-N-acétylneuraminique

Cox-2: Cyclooxygénase-2

DCIS: Ductal Carcinoma *In Situ*

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

EGF: Epidermal Growth Factor

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EMT: Epithelial mesenchymal transition

ER: Estrogen Receptor

ERK: Extracellular Signal-Regulated Kinase

ER α : Estrogen Receptor alpha

FAK: Focal Adhesion Kinase

FGF: Fibroblast Growth Factor

FRET: Fluorescence Resonance Energy Transfer

Gal: Galactose

GalCer: Galactosylcéramide

GalNAc: N-acétylgalactosamine

GAβ: Protéine Aβ liée aux gangliosides

GD3S: GD3 synthétase

GD3S+: GD3 synthétase positif

GEM: Glycosphingolipids Enriched Microdomain

Glc: Glucose

GlcCer: Glucosylcéramide

GlcNAc: N-acétylglucosamine

GM2-AP: GM2-activator protein

GPI: Glycophosphatidylinositol

GSLs: Glycosphingolipides

GTs: Glycosyltransférases

HGF/SF: Hepatocyte Growth Factor/scatter factor

HPRT: Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase

IDC: Invasive Ductal breast Carcinoma

JNK: c-Jun NH2-terminal kinase

Kb: Kilobases

KO: Knock-Out

LacCer: Lactosylcéramide

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

NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer

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

PI3K: Phosphatidyl-Inositol 3-OH Kinase

PIP3: Phosphatidyl-Inositol (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

RB : Retinoblastoma protein

RI: Récepteur à l'insuline

RTKs: Récepteurs à activité tyrosine-kinase

SAPs: Sphingolipid activator proteins

SCID: Severe Combined Immunodeficiency

Siglecs: Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins

ST3Gal V: G_{M3} synthétase

ST8Sia I: G_{D3} synthétase

ST8Sia V: G_{T3} syntéthase

TAM: Tamoxifène

TGF-β: Transforming Growth Factor β

TNFα: Tumor Necrosis Factor

TNM: Tumor Node Metastasis

UDP-Glc: Uridine diphosphate - glucose

UGCG: UDP-Glc: céramide glucosyltransférase

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

Introduction

I- Les glycosphingolipides

Les glycosphingolipides (GSLs) ont été découverts par Ernst Klenk après avoir été isolés de tissu cérébral en 1942 (Morales et al., 2004). Les GSLs sont présents chez les eucaryotes mais également chez certaines bactéries ; dans le cerveau des vertébrés, ils représentent plus de 80% des glycoconjugués totaux (Ferguson et al., 2009). Les GSLs sont principalement localisés dans le feuillet externe de la membrane plasmique mais aussi dans les organites subcellulaires dans lesquels a lieu le métabolisme des GSLs, et également dans des vésicules. La composition des GSLs est caractéristique de chaque type cellulaire et change pendant la différenciation. Les GSLs sont des composés amphipathiques ancrés dans la membrane plasmique par un céramide, constitué d'un acide gras à longue chaîne relié par une liaison amide à une base sphingoïde. Par contre, leur partie hydrophile correspondant à une chaîne glycanique est exposée à la surface cellulaire. Leur grande hétérogénéité de structure n'est pas seulement liée à la variabilité de la composition glycanique, mais aussi au nombre de combinaisons possibles de la partie hydrophobe (plus de 300 chaînes oligosaccharidiques et plus de 60 bases sphingoïdes ont été caractérisées) (Degroote et al., 2004).

La principale base sphingoïde présente chez les mammifères est la sphingosine qui contient une double liaison en position C4-C5. D'autres bases sphingoïdes sont également retrouvées, telles que la sphinganine sans la double liaison en C4-C5, ou encore la phytosphingosine présente chez les végétaux qui porte un groupement hydroxyle sur le C4 (Kolter, 2011). La sphinganine est un intermédiaire dans la biosynthèse de la sphingosine et est retrouvée en très faible quantité dans les sphingolipides les plus complexes. La base sphingoïde seule est typiquement présente en très faible quantité car la majorité des bases est liée par une liaison amide avec un acide gras à longue chaîne pour former les céramides (Merrill, 2011). Les céramides les plus fréquemment rencontrés sont substitués par l'acide oléique (C18:1) mais également par l'acide gadoléique (C20:1) qui est présent en quantité considérable dans les gangliosides du système nerveux central. Les premières étapes de la biosynthèse des GSLs,

correspondant à la biosynthèse de la partie céramide, sont réalisées par des enzymes localisées dans le réticulum endoplasmique (RE).

Chez les mammifères, le céramide se situe au point de départ de la biosynthèse de 4 composés majeurs : deux phosphosphingolipides : la sphingomyéline (SM) et le céramide-1-phosphate, ainsi que 2 glycosphingolipides : le galactosylcéramide (GalCer) et le glucosylcéramide (GlcCer). Le céramide peut spontanément traverser la membrane du RE pour être converti en GalCer, par une galactosyltransférase (la GalCer synthétase) utilisant l'UDP-Gal qui est transporté dans le lumen du RE par le transporteur d'UDP-Gal 2 (UGT2) (Kabuss et al., 2005). Chez les mammifères, le GalCer est le lipide majeur dans la gaine de myéline entourant les axones des cellules neuronales (Degroote et al., 2004). Dans la lumière de l'appareil de Golgi, le GalCer peut être sulfaté par la galactosylcéramide sulfotransférase (GalCer sulfotransférase) ou galactosylé pour former le Gal α 1-4GalCer. Le GalCer peut aussi être sialylé par l' α 2,3-sialyltransférase ST3Gal V et former le ganglioside G_{M4} Neu5Ac α 2-3GalCer.

A partir du RE, le céramide peut être transporté *via* le flux vésiculaire, ou par la protéine CERT (Ceramide Transport Protein) vers l'appareil de Golgi où il peut être glycosylé par la GlcCer synthétase pour former le GlcCer (**Fig. 1**) (Hanada, 2010). Le GlcCer peut atteindre la face cytoplasmique d'autres membranes cellulaires, mais la majorité des molécules de GlcCer est déplacée vers la face cytoplasmique de RE par FAPP2, une protéine cytoplasmique impliquée dans le transport de lipides. Le GlcCer est ensuite transporté de l'autre côté de la membrane du RE par une flippase ATP-indépendante. Dans l'étape suivante, le GlcCer est transporté dans la lumière de l'appareil de Golgi par transport vésiculaire (Halter et al., 2007; Chalat et al., 2012). Dans l'appareil de Golgi, le GlcCer est galactosylé par la LacCer synthétase pour former le lactosylcéramide (Gal β 1-4GlcCer).

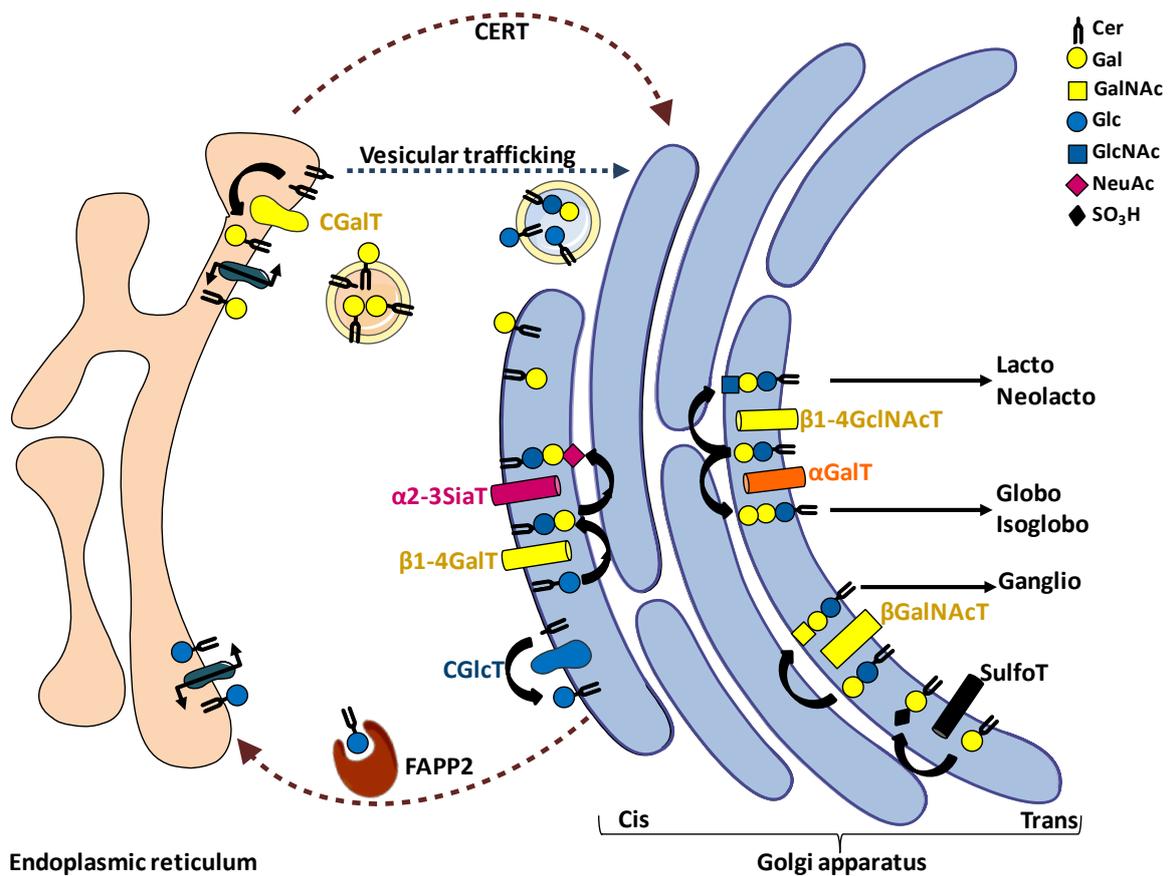


Figure 1 : Représentation schématique de la synthèse des GSLs. Le céramide est synthétisé dans le réticulum endoplasmique, et peut ensuite être converti en GalCer par la GalCer synthétase. Dans l'appareil de Golgi, le GalCer peut être sulfaté par la GalCer sulfotransférase ou galactosylé pour former le Gal α 1-4GalCer ou sialylé pour former le ganglioside G_{M4}. Le ceramide peut être transporté vers l'appareil de Golgi où il peut être glycosylé par la GlcCer synthétase. Après le transport de l'autre côté de la membrane, le GlcCer est galactosylé dans l'appareil de Golgi par la LacCer synthétase pour former le LacCer. Adapté de Degroote et al., 2004.

Les extensions du lactosylcéramide par d'autres monosaccharides génèrent des structures de « core », qui servent de base à la nomenclature des glycosphingolipides (**Tableau 1**). Ainsi, les GSLs de la série ganglio- sont basés sur la structure **Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β Cer**, la série néolacto- est basée sur la structure **Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β Cer**, la série lacto- sur **Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β Cer**, la série globo- sur **Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β Cer**, et la série isoglobo- sur **Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β Cer** (les différences clef au sein des structures de « core » sont indiquées en gras). 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 retrouvés au niveau des cellules hématopoïétiques. Au contraire, les glycolipides de la série lacto- sont prédomi-

nants dans les organes sécréteurs et ceux de la série globo-sont les plus abondants dans les érythrocytes.

Tableau 1 : Structures de « core » des principaux glycosphingolipides des vertébrés. Les signatures structurales clef définissant chaque famille sont soulignées. Adapté de Schnaar et al., 2009, Chapitre 10, Glycosphingolipids, Essential of Glycobiology.

Série	Structure	Abréviation
Ganglio	<u>GalNAcβ1-4Galβ1-4GlcβCer</u>	Gg ₃ Cer
	<u>Galβ1-3GalNAcβ1-4Galβ1-4GlcβCer</u>	Gg ₄ Cer
Néolacto	<u>Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcβCer</u>	nLc ₄ Cer
	<u>Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcβCer</u>	nLc ₆ Cer
Lacto	<u>GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcβCer</u>	Lc ₃ Cer
	<u>Galβ1-3GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcβCer</u>	Lc ₄ Cer
Globo	<u>Galα1-4Galβ1-4GlcβCer</u>	Gb ₃ Cer
	<u>GalNAcβ1-3Galα1-4Galβ1-4GlcβCer</u>	Gb ₄ Cer
Isoglobo	<u>Galα1-3Galβ1-4GlcβCer</u>	Iso- Gb ₃ Cer
	<u>GalNAcβ1-3Galα1-3Galβ1-4GlcβCer</u>	Iso- Gb ₃ Cer

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

- Les GSLs neutres qui ne contiennent pas de résidus glycaniques chargés mais uniquement des monosaccharides neutres, tels que le glucosylcéramide (GlcCer), le galactosylcéramide (GlcCer), le lactosylcéramide (LacCer) ou encore les GSLs des séries globo- et lacto-,
- Les sulfatides comprenant notamment le galactosylcéramide-sulfate (HSO₃-3GalCer) et le lactosylcéramide-sulfate (HSO₃-3LacCer),
- Les GSLs sialylés ou gangliosides dont la chaîne glycanique contient un ou plusieurs résidus d'acides sialiques. Cette famille de GSLs auxquels je me suis particulièrement intéressée sera décrite en détails dans la partie suivante.

l'élément précurseur pour la synthèse des chaînes sialylées des gangliosides. Adaptée de Tettamanti, 2004.

Des dérivés d'acides sialiques, tels que des dérivés O-acétylés peuvent également être détectés, la forme la plus fréquente étant l'acide 5-N-acétyl-9-O-acétylneuraminique (Neu5,9Ac₂). L'acétylation des résidus Neu5Ac du G_{D3} pour former le 9-OAc-G_{D3} peut être retrouvée dans certaines pathologies, telles que le cancer du sein (Marquina et al., 1996).

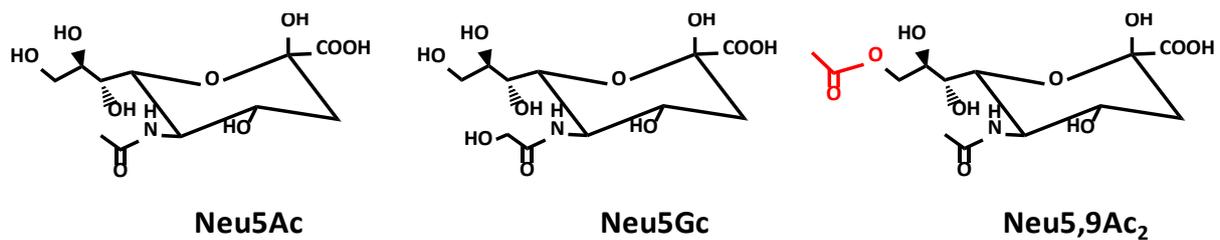


Figure 3 : Structure des acides sialiques retrouvés dans les gangliosides : l'acide N-acétyl-neuraminique (Neu5Ac), l'acide N-glycolyl-neuraminique (Neu5Gc) et l'acide N-acétyl-9-O-acétyl-neuraminique (Neu5,9Ac₂). Le Neu5Ac est l'acide sialique le plus courant chez l'homme alors que le Neu5Gc apparaît uniquement lors de pathologies. Adaptée de Schauer, 2009.

Dans la nomenclature officielle, recommandée par la commission de nomenclature biochimique (IUPAC-IUB, 1978) le monosaccharide de la structure glycanique qui porte le résidu d'acide sialique est indiqué par un chiffre romain (le monosaccharide le plus proche du céramide correspondant à « I ») et le point d'ancrage sur le carbone du monosaccharide accepteur par un chiffre arabe. Par exemple, le ganglioside G_{M1a} (Galβ1-3GalNAcβ1-4[Neu5Acα2-3]Galβ1-4Glcβ1-O-Cer) devient II₃Neu5Ac-Gg4Cer. Dans cette structure, le résidu de galactose le plus proche du céramide (II) porte un acide sialique en position C3 (II₃) et Gg4 présente la chaîne tétrasaccharidique de la série ganglio. Finalement, la classification proposée par Svennerholm (Svennerholm, 1964) est la plus couramment utilisée. Dans cette nomenclature, la structure précédente Galβ1-3GalNAcβ1-4(Neu5Acα2-3)Galβ1-4Glcβ1-O-Cer est désignée de façon simple G_{M1a} où G correspond à ganglioside, la deuxième lettre correspond au nombre de résidus d'acide sialique (G_M pour monosialoganglioside, G_D pour disialoganglioside, G_T pour trisialoganglioside) et le chiffre (1, 2, 3, etc.) correspond à l'ordre de migration du ganglioside en chromatographie sur couche mince.

2- Localisation subcellulaire

De façon générale, les différentes espèces de lipides sont distribuées de façon asymétrique dans les feuillettes de la membrane plasmique. En particulier, le cholestérol, les (glyco) sphingolipides (en particulier les gangliosides), sont enrichis dans des microdomaines du feuillet externe appelés radeaux lipidiques, avec des protéines spécifiques qui sont associées à ces domaines. Les radeaux lipidiques (ou rafts) contiennent du cholestérol et des sphingolipides à une concentration supérieure à 50% par rapport au reste de la membrane. De plus, les acides gras présents sur les lipides au niveau des radeaux lipidiques ont tendance à être plus saturés que dans le reste de la membrane, donc les chaînes de lipides ont tendance à être plus rigides et l'épaisseur de la membrane de ces domaines est augmentée. Leur insolubilité dans des détergents doux est un critère principalement utilisé pour définir les radeaux lipidiques de façon biochimique, qui sont souvent connus sous le nom de « Detergent-resistant membranes » (DRM) ou « glycolipids-enriched membranes » (GEMs) ou « detergent-insoluble glycolipids-enriched complexes » (DIGs) ou « low density Triton insoluble complex » (LDTIs) (Schuck et al., 2003; Gupta and Surolia, 2010). Les radeaux lipidiques sont associés avec des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire telles que les protéines à ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI), des protéines transmembranaires comme les tétraspandines ou les intégrines, des récepteurs aux facteurs de croissance, des protéines de signalisation de la famille des Src-tyrosine kinases (**Fig. 4**). Les radeaux lipidiques sont impliqués au niveau du réseau trans-golgien dans le transport de ces protéines vers la membrane plasmique (Surma et al., 2012). Dans les radeaux lipidiques, on retrouve également les cavéolines, impliquées dans le bourgeonnement de vésicules appelées cavéoles. Les cavéoles ont un diamètre moyen de 50 à 80 nm. Elles sont formées par des invaginations de la membrane plasmique et proviennent de domaines dépourvus de clathrine, mais enrichis en cavéoline et en certains GSLs comme le G_{M1} et le G_{M3} . Les cavéoles sont impliquées dans le processus d'endocytose.

Les fonctions des gangliosides au sein de ces microdomaines en conditions physiologiques et pathologiques seront développées dans le chapitre V.

Les gangliosides sont également des constituants établis de l'enveloppe nucléaire où ils ont un effet direct sur les interactions et la modulation des propriétés de canaux Ca^{2+} . Le groupe de Leeden a démontré l'interaction entre le G_{M1} et le canal échangeur sodium-calcium. Ce canal localisé dans la membrane nucléaire est impliqué dans la régulation du transfert de calcium du nucléoplasme vers le réticulum endoplasmique, ce qui suggère une fonction du G_{M1} dans le maintien de l'homéostasie calcique (Ledeen and Wu, 2008).

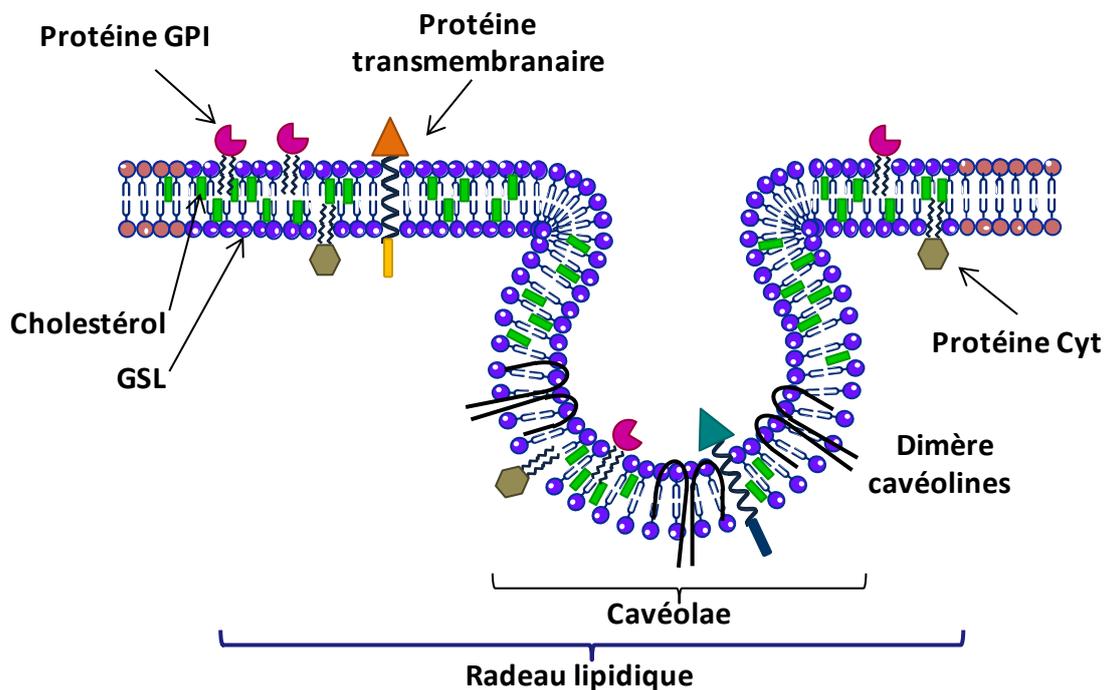


Figure 4 : Représentation schématique d'un radeau lipidique et d'une cavéole de la membrane plasmique. Les rectangles verts représentent les molécules de cholestérol qui permettent la formation de clusters de glycosphingolipides (GSLs, en bleu) au sein des microdomaines lipidiques. Ces clusters servent d'échafaudages pour l'assemblage des molécules de signalisation telles que les protéines à ancre glycoposphatidyl-inositol (en rose), les protéines cytosoliques (cyt) en marron et les protéines transmembranaires. Adaptée de Gupta et Surolia, 2010.

Le ganglioside G_{M1} est présent dans les GEM des MAMs (Mitochondria-associated ER membranes), sites de contact entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries permettant le contrôle du flux Ca^{2+} entre ces organites. L'accumulation du G_{M1} induit leur interaction avec le canal Ca^{2+} régulé par l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP3) et influence son activité. En conséquence, les ions Ca^{2+} vont être transportés à partir du RE vers la mitochondrie pour l'activation de voies apoptotiques mitochondrie-dépendantes (Sano et al., 2009).

De plus, le ganglioside G_{D3} qui est principalement localisé dans la membrane plasmique peut être déplacé depuis la membrane plasmique (et/ou depuis le réseau trans-golgien) vers la mitochondrie par un mécanisme microtubule-dépendant, avec implication de la protéine associée aux microtubules CLIPR59. Le transport du G_{D3} au niveau de la mitochondrie déclenche l'apoptose, par la voie CD95/FAS (Sorice et al., 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.

3- Biosynthèse des glycosphingolipides de la série ganglio-

Cette biosynthèse débute par la formation du lactosylcéramide qui est le précurseur de la série ganglio- présentée précédemment. Toutes les étapes suivantes de la biosynthèse des gangliosides sont effectuées dans la lumière de l'appareil de Golgi. Le LacCer peut être converti en un composé neutre ou acide de la série ganglio- des GSL. L'enzyme qui catalyse la synthèse du premier métabolite neutre GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer (G_{A2} ou asialo G_{M2} , la série O) est la β 4GalNAcT1, (β 1,4-N-acétyl-galactosaminyltransférase 1), ou GM2/GD2 synthétase, qui convertit également les gangliosides G_{M3} en G_{M2} , et G_{D3} en G_{D2} . Une autre voie du métabolisme du LacCer est sa sialylation par ST3Gal V (ou GM3 synthétase) en ganglioside G_{M3} . Les gangliosides G_{D3} et G_{T3} sont synthétisés par l'addition séquentielle de résidus d'acides sialiques sur le G_{M3} et le G_{D3} , respectivement par ST8Sia I (ou GD3 synthétase) et ST8Sia V (ou GT3 synthétase) (Yu et al., 2011). Les gangliosides G_{M3} , G_{D3} , et G_{T3} sont eux-mêmes les précurseurs de la synthèse des gangliosides plus complexes des séries a-,b- ou c par l'action respective de la β 4GalNAcT1, de la β 3GalT4 et des sialyltransférases ST3Gal II et ST8Sia V (Fig. 5). Les différentes sialyltransférases se distinguent par leur spécificité de substrat accepteur et par la liaison formée. Par exemple, les sialyltransférases ST3Gal I, ST3Gal II et ST3Gal V catalysent la formation d'une liaison en α 2,3 d'un résidu d'acide sialique sur un résidu de galactose terminal. Par contre, ST8Sia I et ST8Sia V participent à la synthèse de structures linéaires di ou tri sialylées en formant des liaisons en α 2,8 sur un autre résidu d'acide sialique (Tettamanti, 2004).

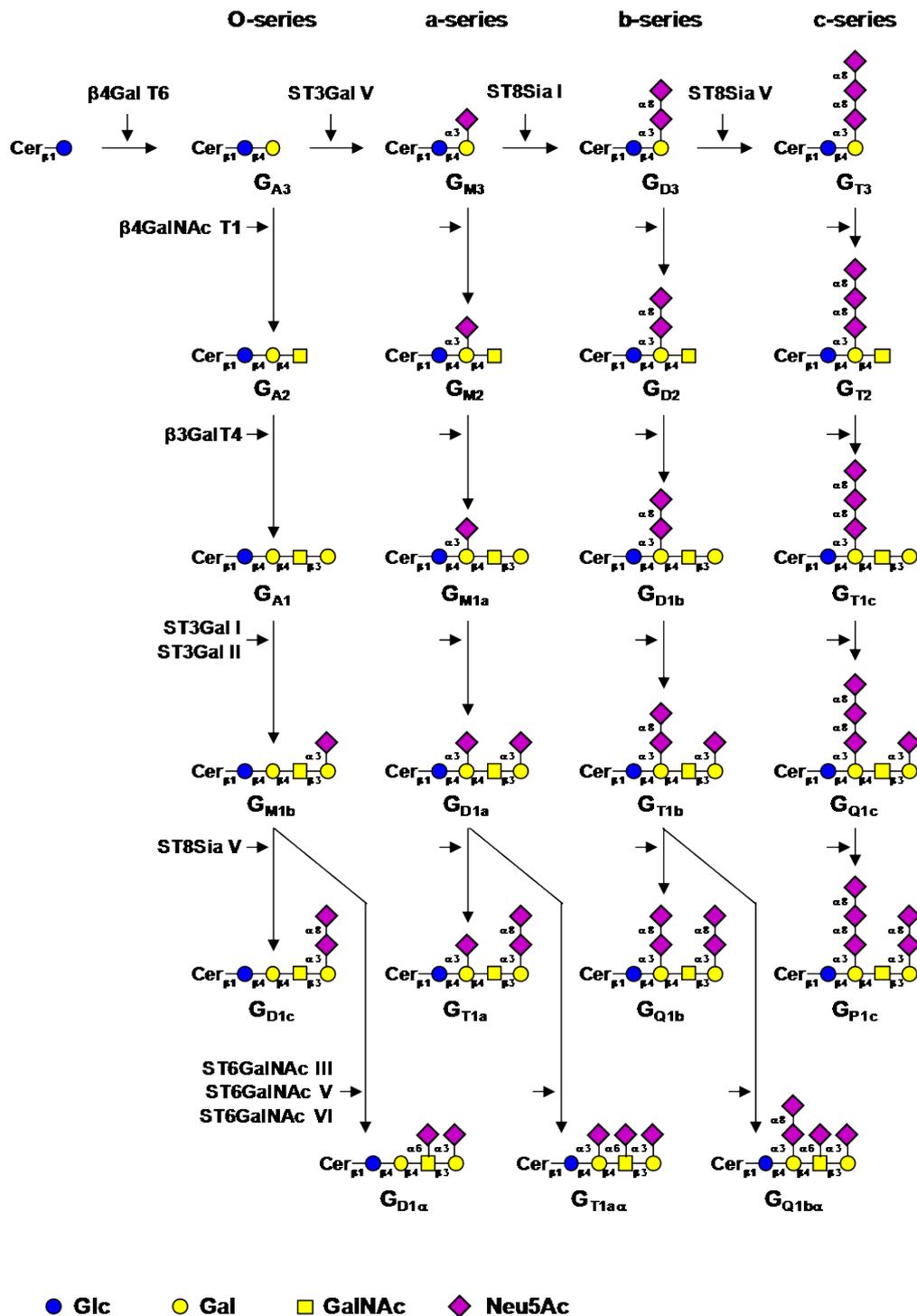


Figure 5 : Les voies de biosynthèse des gangliosides. Les gangliosides sont synthétisés par l'addition séquentielle de monosaccharides sur le céramide (Cer). L'action successive des sialyltransférases ST3Gal V (G_{M3} synthétase), ST8Sia I (G_{D3} synthétase) et ST8Sia V (G_{T3} synthétase) catalyse 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 ($\beta 4$ GalNAc T1), la galactosyltransférase ($\beta 3$ Gal T4) et des sialyltransférases (ST3Gal II ou ST3Gal III, et ST8Sia V). Les gangliosides α 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).

Par ailleurs, la GD3 synthétase peut catalyser la formation de G_{T3} mais est aussi capable de participer à la biosynthèse de gangliosides inhabituels présentant quatre ou cinq résidus d'acide sialique (Nakayama et al., 1996 ; Steenackers et al., 2012). Il est intéressant de noter que les gangliosides G_{M1b} , G_{D1a} , G_{T1b} sont des précurseurs des gangliosides de la série α comme le $G_{D1\alpha}$, le $G_{T1\alpha}$ et le $G_{Q1b\alpha}$, respectivement. Dans ces séries, un résidu d'acide sialique est porté en position C6 sur un résidu de GalNAc par l'action des $\alpha 2,6$ -sialyltransférases ST6GalNAc III et V.

4- Catabolisme des gangliosides

Le catabolisme des gangliosides commence par l'hydrolyse séquentielle des résidus de monosaccharides, à partir de l'extrémité non réductrice, par des glycosylhydrolases. Le processus de dégradation commence par un phénomène d'endocytose et un flux vers les endosomes/lysosomes (**Fig. 6**). Toutes les étapes enzymatiques nécessitent un pH acide à l'intérieur de ces organelles (Tettamanti, 2004). Le faible pH dans les endosomes (pH 5-6) et dans les lysosomes (pH 4,6-5) est généré par l'action des ATP-ases (Kolter, 2011). Une partie des gangliosides est redirigée vers la membrane plasmique, une autre rejoint l'appareil de Golgi, mais la majeure partie est acheminée vers les lysosomes, lieu de leur dégradation. La première étape de dégradation de structures contenant plusieurs résidus d'acides sialiques est réalisée par des sialidases, qui génèrent les mono-sialogangliosides G_{M1} , G_{M2} , ou du LacCer (à partir du G_{M3}). Quatre types de sialidases sont identifiés et caractérisés chez les mammifères: NEU1, NEU2, NEU3, NEU4, chacune d'elle possédant une localisation cellulaire distincte et différant ainsi fonctionnellement (Miyagi and Yamaguchi, 2012). Les sialidases NEU1,-2,-3 sont respectivement localisées dans les lysosomes, le cytosol et la membrane plasmique, où NEU3 est spécifique des gangliosides. NEU4 est retrouvée dans les lysosomes, les mitochondries et le réticulum endoplasmique. L'étape suivante de la dégradation est la transformation du G_{M1} en G_{M2} , et du G_{M2} en G_{M3} , par l'action d'une β -galactosidase et d'une β -N-acétyl-hexosaminidase, respectivement. Le G_{M3} peut alors être désialylé par la sialidase NEU1 pour former du LacCer qui est ensuite dégradé en céramide par l'action séquentielle d'une β -galactosidase et d'une β -glucosidase. Enfin, le céramide est hydrolysé par une céramidase acide en présence de la protéine Sap D pour libérer un acide gras et la base sphin-

goïde. Les GSLs à la chaîne glucidique courte (moins de quatre résidus de monosaccharides) sont dégradés en présence des « sphingolipid activator proteins » (SAPs) qui assistent les glycosidases dans l'interaction avec leur substrat. Cinq protéines non-enzymatiques sont connues à ce jour, les saposines-A, -B, -C, -D et la « GM2 protein activator » (GM2AP). Par exemple, GM2AP est essentiellement utilisée pour le catabolisme du G_{M2} en G_{A2} , mais stimule également la dégradation des gangliosides G_{M1} par la β -galactosidase (Wilkening et al., 2000).

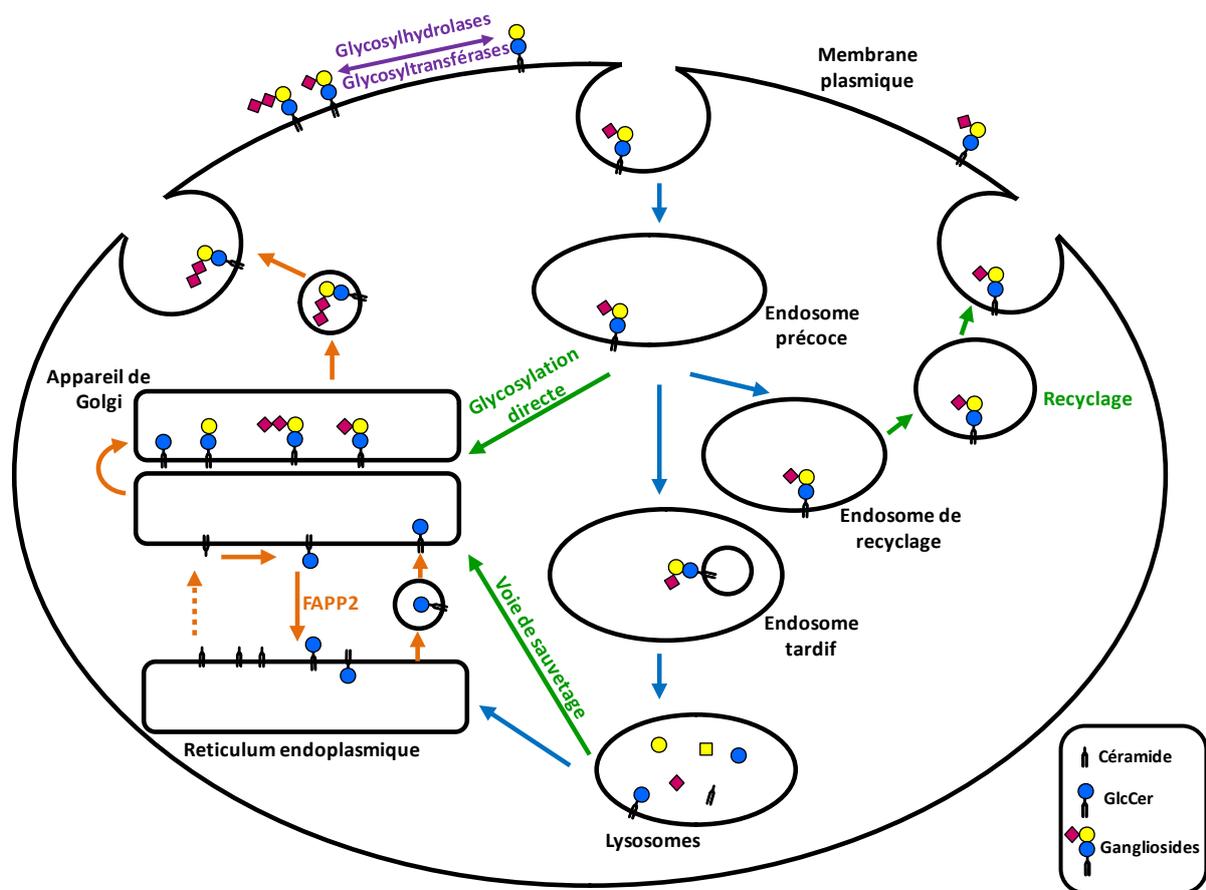


Figure 6 : Différentes voies métaboliques déterminent la composition en gangliosides à la surface cellulaire. Les flèches oranges correspondent à la voie de biosynthèse des gangliosides. Les flèches bleues représentent la voie de dégradation des gangliosides. Les événements métaboliques à la surface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

La dégradation des gangliosides étant un processus séquentiel, la déficience d'une seule étape peut causer l'accumulation des substrats dans le compartiment endo-lysosomal et l'apparition de pathologies (Kolter, 2011). Par exemple, l'hydrolyse du résidu de N-acétyl-

galactosamine terminal du G_{M2} pour produire le G_{M3} dans les lysosomes nécessite les produits de trois gènes différents (HEXA, HEXB, GM2A), et une mutation dans n'importe lequel de ces gènes peut induire l'accumulation de G_{M2} , principalement dans les cellules neuronales, et une pathologie de type maladie de surcharge lysosomale. La mutation des gènes HEXA ou HEXB, qui codent respectivement les sous-unités α ou β de l'hétérodimère constituant la β -hexosaminidase, ou de GM2A codant le cofacteur GM2AP, sont respectivement associées avec la maladie de Tay-Sachs, la maladie de Sandhoff et la déficience de GM2A (AB variant) (Sandhoff, 2012). Autre exemple, la maladie de Gaucher est causée par les mutations du gène GBA1, et entraîne une réduction de la dégradation des glucosylcéramides. Cela induit l'accumulation des molécules de GlcCer dans les lysosomes et dans les macrophages, et provoque des symptômes neurologiques sévères.

III- Mécanismes de régulation du métabolisme des gangliosides.

Les gangliosides sont exprimés de manière tissu-spécifique et les mécanismes de régulation de leur expression jouent un rôle important à la fois dans les conditions physiologiques et pathologiques, où ils sont impliqués dans les processus de différenciation, la prolifération, l'adhésion ou la migration des cellules. Pendant le développement embryonnaire, le niveau d'expression des gangliosides est modifié, en corrélation avec l'expression de certaines glycosyltransférases (GTs), enzymes impliquées dans leur biosynthèse (Yu et al., 2012 ; Ishii et al., 2007). L'équilibre entre la biosynthèse et le catabolisme des gangliosides est contrôlé par la régulation de la disponibilité des substrats donneur et accepteur, mais surtout par une régulation transcriptionnelle et post-traductionnelle des GTs impliquées dans leur biosynthèse. La dérégulation des mécanismes qui contrôlent l'expression des gangliosides provoque un changement de leur composition dans de nombreuses pathologies (Posse de Chaves and Sipione, 2010).

1- Rôle des glycosyltransférases dans la régulation de la biosynthèse des gangliosides

La biosynthèse des gangliosides est directement régulée par l'activité des GTs. Les GTs sont des protéines transmembranaires de type II. Elles sont constituées d'une courte région N-terminale, d'un domaine transmembranaire, d'une région « tige » et d'une grande région C-terminale contenant le domaine catalytique (**Fig. 7**). La régulation de l'activité des GTs est nécessaire pour le contrôle de la composition des gangliosides et par conséquent pour le fonctionnement correct des cellules. L'activité des GTs est contrôlée au niveau transcriptionnel, traductionnel, post-traductionnel mais aussi par leur localisation précise et leur organisation au sein de l'appareil de Golgi.

a- Régulation transcriptionnelle

Le niveau d'expression des gangliosides en surface des cellules est principalement contrôlé par le niveau d'expression des ARNm des gènes de GTs et en particulier de sialyltransférases,

de façon tissu et type cellulaire spécifique. Dans la littérature, de nombreux exemples montrent une corrélation entre le niveau des ARNm des enzymes impliquées dans la glycosylation et l'activité enzymatique, ce qui suggère que la glycosylation est dépendante de la régulation transcriptionnelle des enzymes impliquées. Par exemple, Rhuang et collaborateurs ont montré que la composition caractéristique des gangliosides est liée au niveau d'expression de certains gènes de GTs (en particulier la GM2/GD2 synthétase et la GD3 synthétase) dans les lignées cellulaires de neuroblastome et de mélanome (Ruan et al., 1999). De même, notre équipe a montré que la transfection de l'ADNc codant la GD3 synthétase (GD3S) dans les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 conduit respectivement à l'accumulation des gangliosides G_{D2} et G_{D1b} en surface des cellules (Cazet et al., 2010 ; Steenackers et al., 2012).

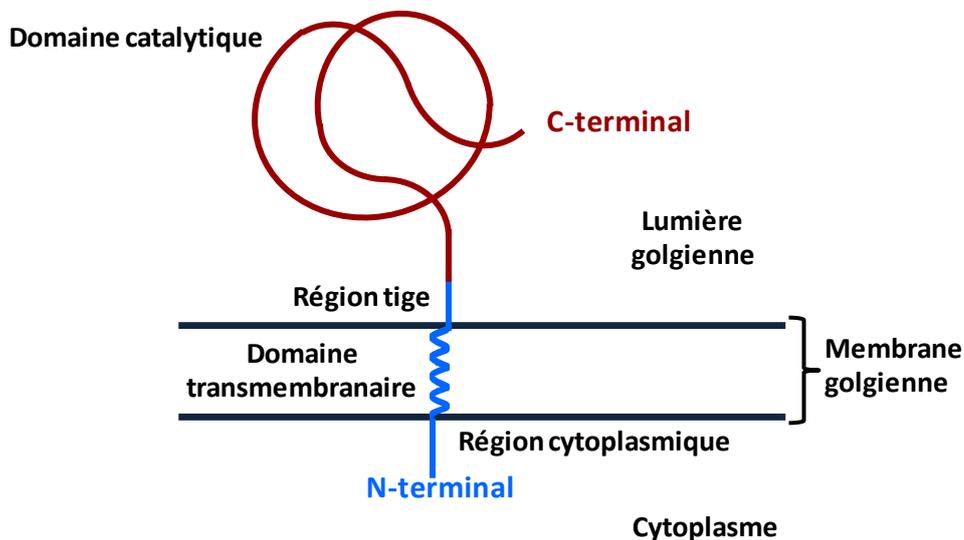


Figure 7 : Schéma de l'organisation protéique générale d'une glycosyltransférase golgienne de type II. A une courte région cytoplasmique N-terminale succède une unique région transmembranaire dans la membrane de l'appareil de Golgi. La région tige d'une taille variable précède, dans la lumière golgienne, la région catalytique C-terminale. Adapté de l'HDR du Dr M.A. Krzewinski-Recchi.

De nombreux promoteurs de gènes de GTs ont été identifiés, ce qui permet de mieux comprendre la réponse à différents signaux physiologiques et stimuli, dans des types cellulaires. Par exemple, l'analyse des gènes de sialyltransférases humaines *ST3GAL2* et *ST3GAL5* a montré l'existence de multiples exons non traduits en 5' et des sites d'initiation de la transcription (TSS : Transcription Start Site) hétérogènes, générant de multiples isoformes d'ARNm, qui peuvent différer dans l'efficacité de leur traduction ou leur stabilité. L'analyse des sé-

quences génomiques en 5' de ces gènes a permis l'identification de régions promotrices alternatives, pouvant être impliquées dans l'expression spécifique de ces gènes dans un type cellulaire donné, ou à différents moments de l'embryogenèse (Harduin-Lepers, 2010). Par contre, d'autres gènes de sialyltransférases impliquées dans la biosynthèse des GSLs comme *ST3GAL1*, *ST6GALNAC3*, *ST6GALNAC5*, *ST6GALNAC6*, *ST8SIA1* et *ST8SIA5* semblent posséder une région promotrice unique, générant une forme unique d'ARNm dans leur partie 5', avec parfois des phénomènes d'épissage alternatif, sous le contrôle de facteurs de transcription ubiquistes. Ils possèdent un patron d'expression caractéristique d'un type cellulaire ou d'un stade de développement donné grâce à l'implication de facteurs de transcription spécifiques (Harduin-Lepers, 2010).

Par ailleurs, l'organisation génomique et les promoteurs de six gènes impliqués dans la synthèse des gangliosides (GM2/GD2 synthétase, GD3 synthétase, GM3 synthétase, GM1/GD1b synthétase, glucosylcéramide synthétase, galactosylcéramide synthétase) ont été décrits. Les promoteurs de ces gènes de GTs possèdent une particularité commune, ils ne contiennent ni boîte TATA, ni boîte CAAT ; par contre, ils contiennent plusieurs sites de liaisons pour le facteur de transcription général SP1, à proximité des sites d'initiation de la transcription (Yu et al., 2004). L'implication de certains facteurs de transcription a été montrée dans la régulation transcriptionnelle de ces GTs impliquées dans la biosynthèse des GSLs. Par exemple, dans les lignées cellulaires de prostate, l'expression des gènes de sialyltransférases *ST3GAL1* et *ST3GAL2* impliquées dans la synthèse de G_{D1a} à partir de G_{M1} est contrôlée par le facteur de transcription NF- κ B, essentiellement par la sous unité RelB (Hatano et al., 2011). De même, dans notre laboratoire, il a été montré que le facteur NF- κ B est impliqué dans l'activation transcriptionnelle de la GD3S dans les lignées cellulaires de cancer du sein (Bobowski et al., 2013).

Un autre type de régulation de l'expression des gènes de GTs correspond aux phénomènes épigénétiques, qui peuvent être définis comme les modifications ou facteurs pouvant moduler l'expression des gènes sans modification de la séquence nucléotidique, par exemple la méthylation de l'ADN, ou des modifications des histones par acétylation. Peu de données sont disponibles sur la régulation épigénétique des GTs impliquées dans la biosynthèse des gangliosides. Suzuki et ses collaborateurs ont montré que le niveau d'expression des ARNm

de la GM2/GD2 synthétase et de la GD3 synthétase est fortement corrélé avec le niveau d'acétylation des histones H3 (Suzuki et al., 2011).

b- La disponibilité de substrat et l'organisation supramoléculaire sont des éléments de régulation des GTs

Le taux d'expression, la spécificité de substrat, les paramètres cinétiques et l'organisation supramoléculaire des GTs dans l'appareil de Golgi sont des facteurs très importants qui contrôlent la composition des gangliosides dans les cellules. Comme décrit précédemment (voir paragraphe « Biosynthèse des gangliosides »), certaines GT peuvent agir sur des substrats différents, donc la présence de substrats spécifiques détermine le profil des gangliosides dans les cellules. Les données de la littérature montrent que la transfection transitoire ou stable d'un ADNc codant une GT dans les différents modèles cellulaires induit une composition des gangliosides différente selon la lignée cellulaire utilisée. Par exemple, l'expression de la GD3S dans les cellules de hamster CHO-K1 après leur transfection stable par le vecteur qui contient la séquence codant la GD3 synthétase induit une accumulation des gangliosides G_{D3} et G_{T3} (Daniotti et al., 2002). Par contre, l'expression de la même enzyme dans la lignée neuronale PC12 provoque l'accumulation des gangliosides G_{D1b} et G_{T1b} (Fukumoto et al., 2000). De même, comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de la GD3S dans les lignées cellulaires de cancer du sein MCF-7 et MDA-MB2-231 induit l'expression de gangliosides, mais avec un profil différent selon la lignée cellulaire : dans les cellules MDA GD3S+, les auteurs ont détecté essentiellement le ganglioside G_{D2} , alors que les cellules MCF-7 GD3S+ expriment principalement le G_{D1b} (Cazet et al., 2010 ; Steenackers et al., 2012).

Enfin, la formation de complexes entre GTs contribue à la localisation précise de ces enzymes dans l'appareil de Golgi, mais aussi à leur activité enzymatique (Maccioni et al., 2011). Des études présentées par Giraudo et collaborateurs ont montré qu'il existe un complexe entre certaines GTs impliquées dans la biosynthèse des gangliosides, telles que la $\beta 4\text{GalNAcT1}$ (GM2/GD2 synthétase) et la $\beta 3\text{GalT4}$ (GM1a/GD1b synthétase). Ces enzymes catalysent deux étapes successives de la synthèse du G_{M1} à partir de G_{M3} . Les extrémités N-terminales de ces GTs sont impliquées dans leur interaction, comme le démontrent des expériences de FRET (fluorescence resonance energy transfer) (Giraudo et al., 2001). La forma-

tion de complexes entre GTs peut réguler positivement leur activité, par exemple pour les deux enzymes ST3Gal V et ST8Sia I impliquées respectivement dans la biosynthèse des gangliosides G_{M3} et G_{D3} , réalisées par l'addition successive de résidus d'acide sialique sur du LacCer. Dans les cellules CHO-K1 transfectées par un vecteur codant la GD3 synthétase, l'activité de la GM3 synthétase est 2,5 fois supérieure par rapport aux cellules sauvages qui n'expriment pas le GD3 synthétase (Spessott et al., 2012).

c- Modifications post traductionnelles

- **N-glycosylation**

Les GT sont des enzymes transmembranaires de type II qui présentent souvent plusieurs sites de N-glycosylation. Les modifications par glycosylation peuvent modifier leur localisation intracellulaire et leur activité (Haraguchi et al., 1995 ; Martina et al., 2000). Par exemple, la GM1 synthétase est une enzyme de 43 kDa portant un N-glycane. L'inhibition du processus de N-glycosylation par la tunicamycine ou par des mutations ponctuelles, induit la synthèse d'un polypeptide de 40 kDa ayant perdu son activité enzymatique et incapable de sortir du RE (Martina et al., 2000). De même, la GM2S présente trois sites de N-glycosylation, et la diminution de la glycosylation de l'un de ces trois sites induit une diminution significative de l'activité enzymatique, alors que la déglycosylation totale diminue de près de 90% son activité mais sans changement de localisation intracellulaire (Haraguchi et al., 1995). De plus, la N-glycosylation de la GD3S est nécessaire pour le maintien de son activité catalytique et pour sa sortie du RE vers l'appareil de Golgi (Martina et al., 1998).

- **Phosphorylation**

Plusieurs études ont montré la régulation de GTs par phosphorylation et par déphosphorylation, qui pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la biosynthèse des gangliosides. La régulation de plusieurs sialyltransférases, en particulier ST3Gal V et ST3Gal I, par phosphorylation par les protéines kinase PKC et PKA, a été démontrée. L'activation de ces protéines kinase dans des cellules de neuroblastome provoque une activité accrue de la GM2/GD2 synthétase et une diminution de l'activité des GM3 et GD1a synthétases (Gu et al., 1995; Bieberich et al., 1998). Par ailleurs, les travaux de Bieberich ont montré que la balance dynamique entre la phosphorylation et la déphosphorylation de la GalNAcT I et de

ST3Gal V régule la concentration des gangliosides G_{M1} pendant la différenciation neuronale des cellules NG108-15 (Bieberich and Yu, 1999).

- **Influence du pH**

Des modifications du pH dans l'appareil de Golgi pourraient être responsables d'une désorganisation et d'une structure anormale de l'appareil de Golgi, ainsi que de certaines anomalies de glycosylation (Kellokumpu et al., 2002). Ainsi, l' α 2,3-sialyltransférase ST3Gal I est anormalement localisée dans les endosomes dans des cellules traitées par la base faible chloroquine, alors que dans ces conditions la localisation subcellulaire et l'activité de l' α 2,6-sialyltransférase ST6Gal I sont peu affectées (Rivinoja et al., 2009). De plus, Iber et collaborateurs ont montré que la GD3S qui est une enzyme clef de la biosynthèse des gangliosides complexes (gangliosides de série b- et c) est plus active à pH 6,2 par rapport à la β 4GalNAcT I qui est la première enzyme de la biosynthèse des gangliosides de la série a (pH optimal 7,4) (Iber et al., 1990). Ces résultats montrent que des variations faibles du pH de l'appareil de Golgi, telles que celles détectées dans des cellules cancéreuses, pourraient modifier la glycosylation, en particulier des GSLs, en générant des modifications de localisation ou d'activité sélectives de certaines GTs.

2- Métabolisme des gangliosides membranaires

La composition des gangliosides est le résultat des différentes étapes de leur métabolisme, comprenant leur biosynthèse dans le RE et l'appareil de Golgi, le transport vésiculaire et leur catabolisme. De plus, il a été montré que le profil des GSLs peut être modifié directement au niveau de la membrane plasmique (Tettamanti, 2004 ; Gupta and Surolia, 2010b). En particulier, la sialidase membranaire Neu-3 peut modifier la composition des gangliosides de la membrane plasmique par la conversion d'espèces polysialylées en GM1, et du GM3 en LacCer (Sonnino et al., 2010). Il est intéressant de noter que Neu-3 module la composition des GSLs par des interactions en « trans » et est capable d'hydrolyser les substrats à la surface des cellules adjacentes (Papini et al., 2004). De plus, Neu-3 joue un rôle important dans certaines pathologies comme les cancers du rein de type RCC, où le niveau d'ARNm de Neu-3 est augmenté par rapport aux tissus sains. Les travaux présentés par Tringali et collaborateurs démontrent que l'inactivation de Neu-3 dans des cellules cancéreuses rénales induit un

changement de composition des gangliosides avec une augmentation du G_{D1a} qui induit essentiellement la diminution de la résistance au traitement par la molécule anticancéreuse étoposine, de l'invasion et de l'adhésion cellulaire, mais aussi la diminution du recyclage des intégrines $\beta 1$ vers la membrane plasmique et l'inhibition de la signalisation par la voie « focal adhesion kinase » (FAK)/ AKT (Tringali et al., 2012). De plus, d'autres équipes ont montré que Neu-3 est impliquée dans les mécanismes cellulaires de réponse au stress hypoxique. Les cellules musculaires en culture C2C12 qui sur-expriment Neu-3 dans des conditions hypoxiques présentent une augmentation de leur résistance à l'apoptose. Par contre, l'absence de cette enzyme rend les cellules plus sensibles à l'apoptose (Scaringi et al., 2013). D'autres glycosyl-hydrolases associées à la membrane ont été décrites. Notamment, l'association de Neu-3 à une β -galactosidase et une β -glucosidase membranaires (dérivant probablement des lysosomes), participent à la production de céramide à partir du G_{M3} dans des fibroblastes humains (Valaperta et al., 2006). Il est également intéressant de noter que la sialylation des glycolipides puisse survenir à l'extérieur des compartiments golgiens par des sialyltransférases qui sont localisées dans la membrane plasmique. Par exemple, il a été montré que la GD3 synthétase est capable de sialyler du G_{M3} pour en former du G_{D3} par des interactions en « cis » et « trans » à partir du substrat donneur CMP-Neu5Ac exogène ou endogène (Vilcaes et al., 2011). Finalement, la glycosylation et la déglycosylation au niveau de la membrane plasmique sont des processus rapides qui sont impliqués dans les changements de la composition des GSLs à la surface des cellules. Des gangliosides membranaires peuvent être internalisés par endocytose indépendamment des vésicules à clathrine mais principalement par les cavéoles. Après passage dans les endosomes, les gangliosides peuvent être recyclés directement à la membrane plasmique, ou transportés dans l'appareil de Golgi ou ils peuvent être reglycolysés ou dégradés dans les lysosomes. Les produits de dégradation peuvent quitter les lysosomes pour entrer dans le cytosol où ils peuvent être soit recyclés soit totalement dégradés.

3- La GD3 synthétase, carrefour de la biosynthèse des gangliosides complexes

Le ganglioside G_{D3} se situe à un carrefour métabolique dans la voie de biosynthèse des gangliosides. En effet, il peut être transformé en gangliosides complexes de la famille b- (G_{D2} ;

G_{D1b}) en c- (G_{T3}) ou en 9-O-acétyl-G_{D3}. La GD3S semble être la seule enzyme capable de catalyser le transfert d'un résidu d'acide sialique par une liaison α 2,8 sur le G_{M3} pour former le G_{D3}. De plus, la GD3S peut transférer un autre résidu d'acide sialique en α 2,8 sur le G_{D3} pour former le G_{T3} mais peut aussi peu former des structures oligosialylées avec quatre et cinq résidus d'acide sialique (Nakayama et al., 1996 ; Steenackers et al., 2012). Il est important de dire que les gangliosides complexes des séries b- et c- ne sont pas ou très faiblement exprimés dans les tissus sains adultes, alors qu'ils sont retrouvés dans les tissus en croissance, au cours du développement embryonnaire, ou en conditions pathologiques. La GD3S (ST8Sia I) est une enzyme de la famille des sialyltransférases appartenant à la famille 29 de la classification CAZY (Carbohydrate-Active-Enzymes) dans laquelle 20 sialyltransférases ont été répertoriées chez l'homme. La famille des α 2,8-sialyltransférases ST8Sia comprend 6 sialyltransférases. La séquence d'ADNc de la GD3 synthétase humaine a été clonée par 3 équipes différentes (Haraguchi et al., 1994),(Nara et al., 1994),(Sasaki et al., 1994). Le gène *ST8SIA1* est localisé sur le chromosome 12 et il est composé de 5 exons codants, séparés de régions introniques, l'ensemble étant étendu sur environ 135 kilobases (Kb) (**Fig. 8**) (Furukawa et al., 2003).

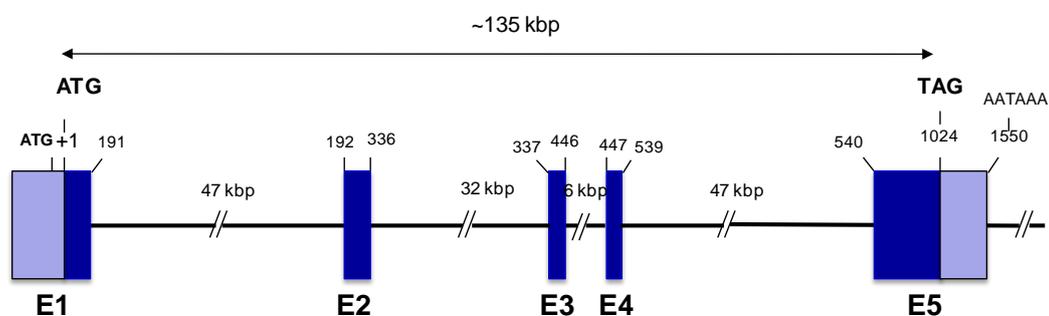


Figure 8 : Organisation génomique de la GD3 synthétase humaine. La région codante (carrés bleus foncés) s'étend sur environ 135 kb et contient 5 exons (E1 à E5). Les carrés bleus ciel indiquent les régions non codantes. La distance des introns en kb est indiquée. Tirée de thèse de Marie Bobowski, 2012.

ST8SIA1 possède deux codons d'initiation de la traduction sur l'exon E1 qui conduit à 2 isoformes protéiques de 356 et 341 acides aminés (Sasaki et al., 1994 ; Nakayama 1996). De plus, Sasaki et collaborateurs ont montré que la séquence codant la GD3S sans le premier codon d'initiation montre le même niveau d'expression que pour la séquence possédant les

2 ATGs (Sasaki et al., 1994). La différence de taille entre les deux isoformes est retrouvée au niveau de la région cytoplasmique N-terminale de l'enzyme. La région 5' non traduite de *ST8SIA1* a été décrite dans les cellules de mélanome, de glioblastome et de neuroblastome montrant des sites d'initiation de la transcription tous situés sur l'exon E1 entre 700 à 450 paires de base en amont de l'ATG (Furukawa et al., 2003 ; Dae et al., 2009 ; Kwon et al., 2009). L'étude de la séquence nucléotidique du promoteur de *ST8SIA1* montre l'absence de boîte TATA ou CCAAT, par contre plusieurs sites pour la fixation de facteurs de transcription généraux sont présents. Par exemple, dans les cellules de mélanome SK-Mel-2 et dans les cellules de neuroblastome SK-N-BE, le contrôle de l'expression du gène *ST8SIA1* est effectué par le facteur de transcription NF-KB qui conduit une augmentation de l'activité transcriptionnelle (Kang et al., 2007). Par contre, dans les cellules de glioblastome U-87MG et T98G, l'activité promotrice de *ST8SIA1* est contrôlée par les facteurs ELK1 et AREB6 (Dae et al., 2009).

IV- Rôles physiologiques des gangliosides

Les gangliosides sont principalement exprimés dans le système nerveux central mais aussi pendant l'embryogenèse. De nombreuses études ont montré leur fonction évidente dans la reconnaissance cellulaire, la modulation des signaux transmembranaires, la prolifération, la migration, la différenciation cellulaire (Kwak et al., 2011; Hakomori, 2008). Le profil des gangliosides est précisément défini de manière spatio-temporelle, et des changements de leur composition résultant d'une dérégulation de leur biosynthèse sont fréquemment observés en conditions pathologiques. Dans la suite de cette partie, nous nous sommes intéressés de plus près au rôle des gangliosides dans les conditions physiologiques.

1 - Rôle fonctionnel des gangliosides dans le développement embryonnaire et le système nerveux central

Les GSLs contenant des acides sialiques constituent un composant majeur dans les cellules neuronales et sont essentiels dans la fonction cérébrale et le développement. L'UDP glucose : céramide glucosyltransférase, ou GlcCer synthétase, catalyse l'étape initiale de la biosynthèse des GSLs, parmi lesquels les gangliosides. Il a été montré que des embryons de souris knock-out pour la GlcCer synthétase et donc n'exprimant aucun GSL dérivant du GlcCer meurent à 7,5 jours de développement, juste après le stade de gastrulation (Yamashita et al., 1999). Dans un autre modèle murin, suite à l'inactivation conditionnelle du gène *ugcg* codant la GlcCer synthétase, les souris présentent un dysfonctionnement post-natal du cervelet, des nerfs périphériques et de la structure des axones. L'ensemble de ces événements entraîne la mort des souris au bout de 3 semaines (Yamashita et al., 2005). Plusieurs études ont montré un changement drastique du niveau d'expression et de la diversité des gangliosides durant le développement embryonnaire mais également des GTs impliquées dans leur biosynthèse (Yu et al., 2009; Yu et al., 2012 ; Yu et al., 2011). Par contre, les enzymes clés comme la GlcCer synthétase, la GM3S, et la GD3S ne sont pas exprimées de manière différentielle durant le développement (Ngamukote et al., 2007) (**Fig. 9**). Chez la souris, les premiers stades du développement embryonnaire (E12-E14) sont caractérisés par l'expression

des gangliosides G_{D3} et G_{M3} , alors qu'après E16 le niveau d'expression de ces gangliosides diminue nettement et d'autres gangliosides tels que le G_{M1} , G_{D1a} , G_{D1b} , G_{T1b} augmentent (**Fig. 9**). Par ailleurs, les souris GalNAcT I (-/-) (GM2/GD2 synthétase) présentent le même niveau de concentration de gangliosides dans le cerveau, mais seuls les gangliosides G_{M3} et G_{D3} sont présents, les gangliosides G_{D1a} et G_{T1b} étant par contre absents. Le développement et la structure globale des tissus chez les souris GalNAcT I (-/-) sont normaux. Par contre, après 3 mois, une dégradation axonale et une démyélinisation sont détectées (Chiavegatto et al., 2000). Finalement, les gangliosides jouent un rôle important pendant le développement embryonnaire mais sont aussi essentiels dans le maintien de l'intégrité de l'architecture et des fonctions du système nerveux central.

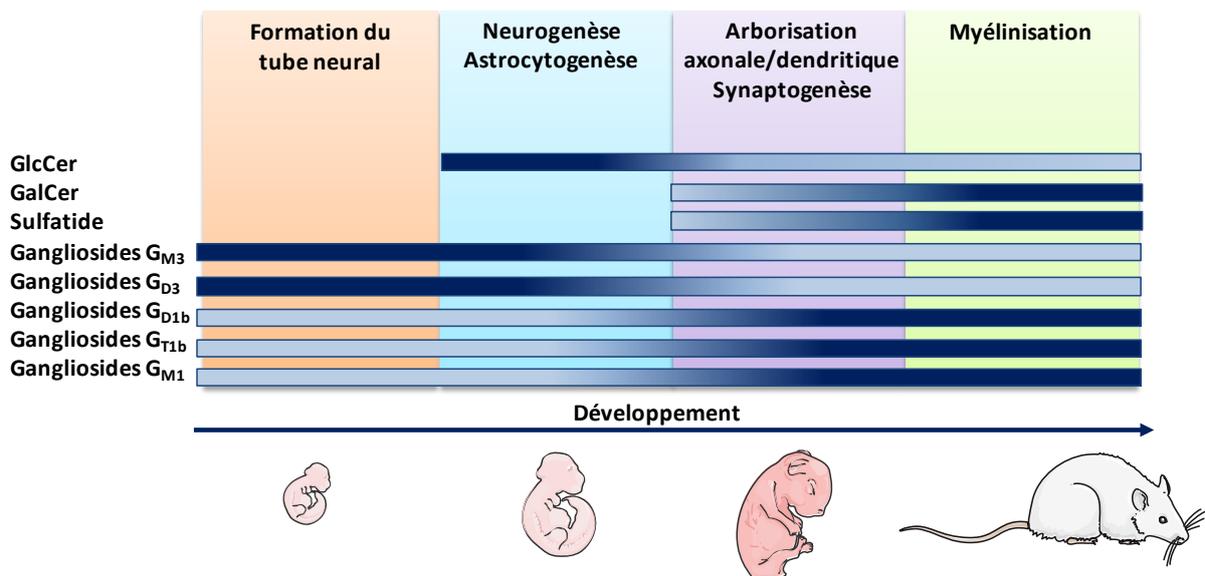


Figure 9 : Changements de la composition en gangliosides dans le cerveau murin lors du développement.

2- La reconnaissance cellulaire dépendante des gangliosides

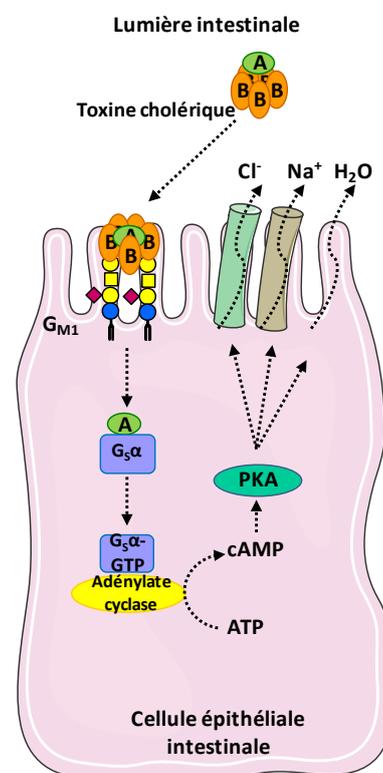
Les gangliosides localisés dans la membrane plasmique ont des fonctions dans la reconnaissance cellule-cellule et cellule-matrice. Les gangliosides interagissent avec les protéines membranaires comme les intégrines, les récepteurs aux facteurs de croissance, pour former des domaines glycosynaptiques contrôlant l'adhésion, la motilité et la croissance cellulaire,

et constituent également des récepteurs pour les pathogènes et les toxines (Regina Todeschini and Hakomori, 2008).

a- Les gangliosides récepteurs pour les pathogènes

Les gangliosides ont été caractérisés depuis de nombreuses années comme des sites d'attachement pour certains virus et bactéries, et de certaines toxines. L'interaction la plus connue est celle du ganglioside G_{M1} , qui se lie avec la toxine cholérique de *Vibrio cholerae*, une bactérie intestinale qui entraîne une déshydratation rapide (Fishman, 1982). La toxine cholérique consiste en une simple sous-unité A et en 5 sous-unités B identiques. La première étape de fixation de cette exotoxine est une interaction des sous-unités B avec le G_{M1} . Ces interactions induisent un changement de conformation et de dissociation de la sous-unité A de la toxine qui pénètre dans les cellules intestinales. Cette sous-unité va entraîner l'activation de la protéine $G_s\alpha$, l'augmentation d'AMPc et l'activation de la protéine kinase A (PKA) et de canaux ioniques, conduisant à la sécrétion de sels et d'eau dans la lumière intestinale (Fishman, 1982) (**Fig. 10**). D'autres toxines bactériennes peuvent également se lier aux gangliosides, telles que la neurotoxine botulique A qui est synthétisée par *Clostridium botulinum*, et qui se fixe sur le ganglioside G_{T1b} (Yowler et al., 2002).

Figure 10 : Effet de la reconnaissance de la toxine cholérique par le ganglioside G_{M1} sur une cellule intestinale humaine. La sous-unité B de la toxine cholérique, produite par la bactérie *Vibrio cholerae*, interagit spécifiquement avec le ganglioside G_{M1} , exprimé au niveau des villosités des cellules intestinales. Ceci induit un changement de conformation de la toxine, une dissociation et l'entrée de la sous-unité A au sein de la cellule. Cette sous-unité va entraîner l'activation de la protéine $G_s\alpha$, l'augmentation d'AMPc, suivie de l'activation de la protéine kinase A (PKA), induisant une activation des canaux ioniques (Adapté de la thèse de A. Cazet, 2010).



b -Les gangliosides du système nerveux central sont des récepteurs des glycoprotéines MAG

La MAG (Myelin-associated-glycoprotéine) ou Siglec 4 est un membre de la famille des Siglec (Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins) qui fonctionne pour maintenir la stabilité de la gaine de myéline des axones et assure le contrôle de la régénération des nerfs après blessure. Cependant, la stabilité de la myéline et le fonctionnement axonal sont aussi dépendants des gangliosides G_{D1a} et G_{T1b} , deux gangliosides majeurs de la membrane axonale (Schnaar, 2010). Il a été montré que la MAG se fixe avec une forte affinité sur la séquence glycanique terminale Neu5Ac α 2-3GalNAc des gangliosides G_{D1a} et G_{T1b} (Fig. 11).

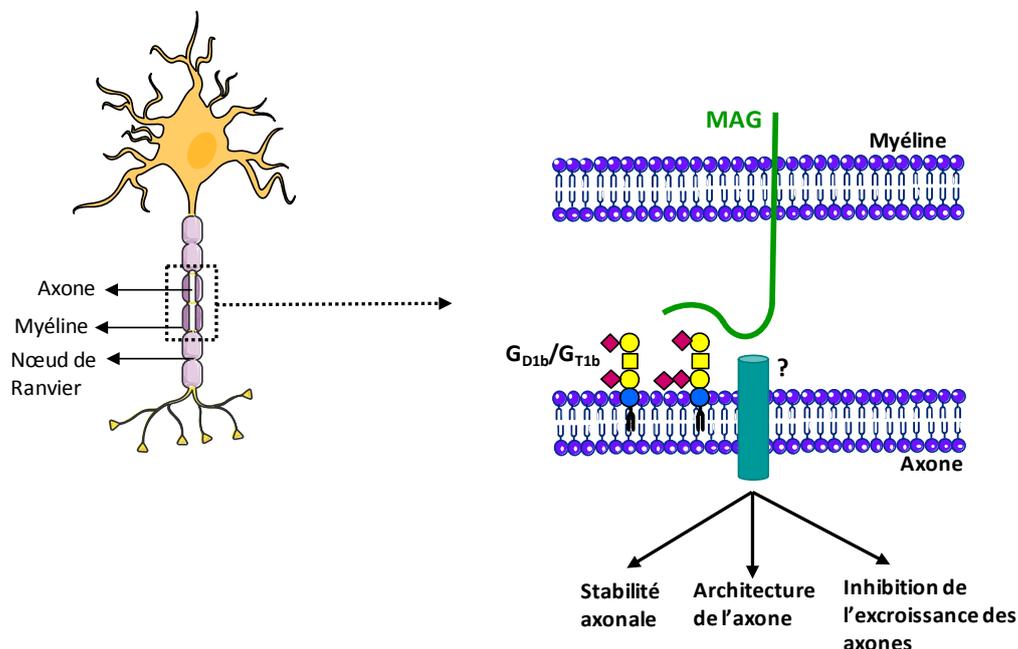


Figure 11 : Représentation schématique de l'interaction entre la protéine MAG (Myelin Associated Glycoprotein) et les gangliosides G_{D1a} et G_{T1b} . Les interactions spécifiques entre le récepteur MAG, exprimé par la myéline, et les gangliosides G_{D1a} et G_{T1b} des axones sont essentielles pour maintenir l'intégrité du système nerveux central. Les voies de signalisation intracellulaires qui découlent de cette interaction restent encore mal connues (Tirée de Schnaar, 2010)

Chez la souris, l'absence de la GM2/GD2 synthétase induit un changement de composition des GSL et l'expression du G_{M3} et G_{D3} . Chez ces souris, on observe une dégradation axonale, une démyélinisation des systèmes nerveux central et périphérique et des problèmes moteurs (Chiavegatto et al., 2000 ; Pan et al., 2005). De plus, les souris knock-out pour MAG présentent un phénotype similaire, ce qui suggère que l'interaction entre MAG et les gangliosides G_{D1a} et G_{T1b} est nécessaire dans la stabilité myéline-axone (Pan et al., 2005).

V- Rôles des gangliosides dans les pathologies

L'expression des gangliosides complexes (gangliosides de série b et c) est limitée dans les tissus sains adultes, par contre ils sont particulièrement abondants au niveau des tissus en croissance et au cours du développement embryonnaire. Une dérégulation de l'expression des gangliosides est observée dans différentes conditions pathologiques telles que l'athérosclérose (Wen et al., 1999), les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Ariga et al., 2008), la maladie de Creutzfeldt-Jacob (Ohtani et al., 1996) et dans certains cancers (Furukawa et al., 2006). Par exemple, dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, le profil des gangliosides est modifié. En particulier, il a été montré une augmentation du ganglioside G_{M1} (Molander-Melin et al., 2005). Ce ganglioside se lie à la protéine $A\beta$, induisant le changement de leur conformation. Le complexe $GA\beta$ formé du fait de l'interaction entre le G_{M1} et les protéines $A\beta$ provoque la formation de fibrilles amyloïdes cytotoxiques, ce qui est un facteur critique dans le développement de cette maladie (Okada et al., 2007; Yanagisawa, 2007; Yanagisawa, 2011). Un autre exemple est la maladie d'Huntington, caractérisée par l'augmentation du nombre de résidus de glutamine dans la partie N-terminale d'une protéine appelée huntingtine, codée par le gène HTT (également appelé HD). Dans ce cas, les neurones présentent une sensibilité accrue à l'apoptose, et la voie de signalisation PI3K/AKT est altérée. Une dérégulation de la synthèse des gangliosides a été détectée, avec une diminution de l'expression du G_{M1} (Maglione et al., 2010) Des études récentes ont montré que l'augmentation de niveau du G_{M1} dans les lignées cellulaires neuronales HD induit l'activation de voies de signalisation impliquées dans la survie et la protection contre l'apoptose, mais augmente également la phosphorylation de la protéine huntingtine mutée et corrige le déficit moteur dans un modèle de souris transgénique HD (Maglione et al., 2010 ; Di Pardo et al., 2012)

Le rôle des gangliosides complexes dans le processus carcinogénèse est bien documenté, les gangliosides tels que le G_{D3} , G_{D2} et G_{T3} sont considérés comme des marqueurs oncofœtaux de cancers d'origine neuro-ectodermique comme le mélanome et le neuroblastome. Nous nous intéresserons en particulier dans cette introduction aux fonctions des gangliosides dans l'acquisition du phénotype cancéreux qui seront développées dans la partie suivante.

1- Rôle des gangliosides dans les tumeurs

a- Mélanome

Les gangliosides sont des antigènes associées aux tumeurs dans les cancers d'origine neuroectodermique. En particulier, le G_{D3} est considéré comme un antigène associé au mélanome. Ce disialoganglioside est fortement exprimé dans les tissus et les lignées cellulaires de mélanome. Par contre, son expression est insignifiante dans les mélanocytes normaux (Carubia et al., 1984; Portoukalian et al., 1979). De même, il a été montré que le niveau d'expression de la GD3 synthétase est lié avec la composition des gangliosides à la surface cellulaire et les propriétés malignes des cellules de mélanome (Ruan et al., 1999). Par exemple, la sur-expression de la GD3S dans un modèle de cellules de mélanome SK-Mel-28-N1 G_{D3} négative (G_{D3}^-) augmente les capacités invasives de ces cellules (Hamamura et al., 2005). La phosphorylation de trois protéines : la paxilline, p130Cas et la kinase d'adhésion focal FAK (Focal Adhesion Kinase) est également impliquée dans les phénomènes de prolifération, d'invasion et de motilité cellulaires. De plus, le traitement des cellules SK-Mel-28 avec un siRNA contre l'une de ces trois protéines induit la suppression des propriétés invasives des cellules G_{D3}^+ . L'ensemble de ces résultats suggère que ces protéines fonctionnent comme des effecteurs pour la signalisation du G_{D3} , en corrélation avec les propriétés invasives des cellules (Hamamura et al., 2005 ; 2008). Ainsi, l'équipe de Furukawa a montré que la protéine Yes de la famille des kinases Src peut être co-immunoprécipitée avec p130Cas ou FAK dans les cellules G_{D3}^+ et que ce complexe est impliqué dans les phénomènes de prolifération et d'invasion (**Fig. 12**). De plus, la protéine Yes a été localisée dans les radeaux lipidiques dans les cellules G_{D3}^+ , et dans ces cellules, la co-immunoprecipitation de Yes avec Fak ou p130Cas est plus importante par rapport aux cellules G_{D3}^- (Hamamura et al., 2011). Une inhibition stable de la GD3S par shRNA induit une diminution de l'activation de Yes avec une réduction du phénotype invasif. Ces résultats suggèrent que le G_{D3} est impliqué dans la régulation des kinases de la famille Src (Hamamura et al., 2011). En parallèle, plusieurs études démontrent que le G_{D3} est impliqué dans l'invasion tumorale, en agissant comme un médiateur de la formation de métastases au travers d'interactions directes avec les protéines de la matrice extracellulaire, ou indirectes par l'intermédiaire des intégrines. Ainsi, le G_{D3} favorise l'adhérence de cellules de mélanome à la fibronectine, à la laminine et au collagène de type I ou IV (Nakano et al., 1999 ; Birklé et al., 2003; Kuphal et al., 2005). Dans ce contexte, Ohkawe et ses colla-

borateurs ont montré que les cellules SK-Mel-28 N1 G_{D3}+ adhèrent plus fortement au collagène de type I par rapport au contrôle.

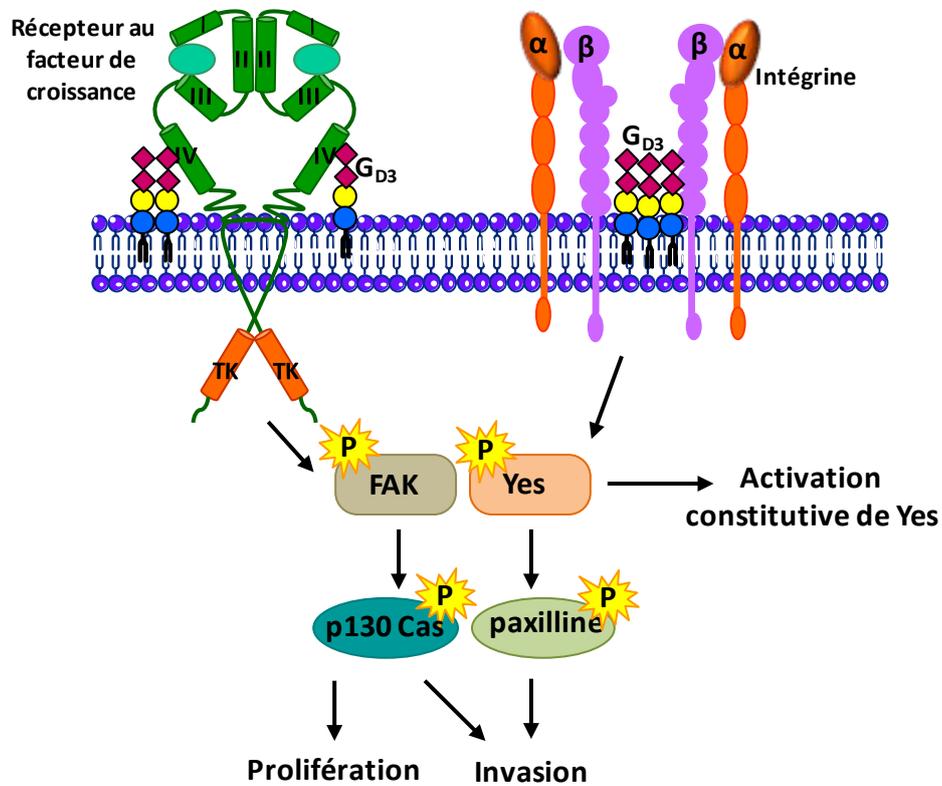


Figure 12 : Représentation schématique du rôle du ganglioside G_{D3} sur les propriétés biologiques de cellules tumorales de mélanome. L'expression du G_{D3} augmente la croissance, la migration et l'invasion des cellules de mélanome, en modulant l'activation de récepteurs aux facteurs de croissance ou des intégrines. Les phénomènes de prolifération et d'invasion sont également associés avec des molécules adaptatrices telles que FAK, Yes, p130Cas et la paxilline. Image adaptée de Furukawa *et al.*, 2006.

De plus, le niveau d'expression de l'intégrine β1 est beaucoup plus élevé dans des radeaux lipidiques dans lesquels le G_{D3} et l'intégrine β1 ont été co-localisés. La formation de ce complexe induit une augmentation d'activation des protéines FAK et l'activation des voies de signalisation ILK-AKT (Integrin-Linked kinase-AKT). Cet événement est associé avec une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules SK-Mel-28 N1 G_{D3}+ (Ohkawa *et al.*, 2010). L'équipe de Furukawa a également montré que la cavéoline-1 (composant de radeaux lipidiques) est impliquée dans la régulation de la distribution du G_{D3} dans la lignée cellulaire de mélanome SK-Mel-28. La sur-expression de la cavéoline-1 dans les cellules SK-

Mel-28 induit la diminution de leur prolifération et de leur migration, mais aussi une réduction du niveau de phosphorylation de p130Cas et de la paxilline par rapport au contrôle. De plus, dans les cellules CAV-1⁺, le G_{D3} n'est plus concentré dans les radeaux lipidiques mais réparti uniformément dans la membrane (Nakashima et al., 2007). De même, l'augmentation d'expression des gangliosides G_{D1b}, G_{T1b} et G_{M1} dans la lignée cellulaire de mélanome SK-Mel-28 après la transfection d'un vecteur contenant l'ADNc de la β3GalT4 (GM1/GD1b synthétase) induit la diminution d'expression des gangliosides G_{M3}, G_{M2}, G_{D2} et G_{D3}. Ces changements sont associés avec la réduction de la prolifération et de l'invasion, avec une diminution du niveau de phosphorylation de p130Cas et de la paxilline (Dong et al., 2010).

b- Les tumeurs cérébrales

Les gangliosides G_{D3} et G_{D2} sont sur-exprimés dans les astrocytomes, les médulloblastomes, les méningiomes et les neuroblastomes (Berra et al., 1985; Shinoura et al., 1992; Ladisch et al., 1997). Les travaux présentés par Ruan et collaborateurs montrent une bonne corrélation entre le profil de gangliosides, l'expression des ARNm et l'activité enzymatique des GTs impliquées dans leur biosynthèse dans des lignées cellulaires de neuroblastome humain (Ruan et al., 1999). De même, l'analyse du niveau d'expression des ARNm des GTs dans les biopsies de patients atteints de gliome à différents stades a montré que la GD3S et la GD2S peuvent être utilisées comme valeurs pronostiques. Ainsi, une forte expression de la GD3S est associée avec une faible expression de la GD2S, avec une corrélation positive à la survie globale des patients. L'expression de la GM2/GD2 synthétase peut également être utilisée comme marqueur pronostique pour les neuroblastomes de grade IV qui engendrent des métastases au niveau de la moelle osseuse (Oblinger et al., 2006; Cheung et al., 2003; Cheung et al., 2004). Par contre, une forte expression du G_{D2} dans le neuroblastome est associée avec une expression très faible voire nulle des gangliosides de série b, comme les G_{D1b}, G_{T1b} et G_{Q1b}, en corrélation avec un phénotype biologique agressif du neuroblastome et un mauvais pronostic de survie (Hettmer et al., 2005 ; Hettmer et al., 2003). De récentes études ont montré que l'α2,6-sialyltransférase ST6GalNAc V qui catalyse la formation des gangliosides α par le transfert en α2,6 d'un résidu d'acide sialique sur le résidu de GalNAc présente un très faible

niveau d'expression dans les gliomes et les lignées cellulaires de gliomes. La transfection stable de ST6GalNAc V dans la lignée cellulaire de gliome U373MG induit la production de $G_{M2\alpha}$; Neu5Ac α 2-6GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc-Cer (ainsi que l'inhibition de l'invasion *in vitro*, mais aussi l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* (Kroes et al., 2010). Le rôle des gangliosides complexes comme le G_{D3} et G_{D2} est évident dans le phénotype prolifératif et invasif dans les cellules de neuroblastome ou de gliome. De ce contexte, il a été montré que l'inhibition par une stratégie de knock-down de la GD3S, de la biosynthèse du G_{D3} ou du 9-O-acétyl- G_{D3} dans les cellules de neuroblastome F11, s'accompagne d'une diminution de la croissance et de la migration cellulaire *in vitro* mais aussi de la croissance tumorale et de la formation de métastases dans un modèle de xénogreffe chez souris Nude (Zeng et al., 1999; Zeng et al., 2000). De même, l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti- G_{D3} dans la lignée cellulaire de gliome TP483 et D54MG, inhibe spécifiquement leur croissance (Hedberg et al., 2000). Enfin, plusieurs approches expérimentales ont montré que le ganglioside G_{M3} est impliqué dans l'inhibition de l'angiogenèse par des effets autocrine et paracrine sur le VEGF et les récepteurs associés. Il a également été montré que les tumeurs de cerveau qui expriment fortement le G_{M3} présentent un phénotype moins vascularisé (Seyfried and Mukherjee, 2010). De plus, la prolifération des cellules de neuroblastome est réduite en présence des gangliosides G_{M3} , G_{M1} , G_{D1b} et G_{T1b} , par inhibition de la phosphorylation de l'EGFR (Mirkin et al., 2002).

c- Les gangliosides dans les tumeurs pulmonaires

L'équipe de Furukawa a analysé l'expression des gangliosides dans 44 lignées cellulaires de cancer du poumon. Cette analyse a montré que les gangliosides de la série-a comme le G_{M2} et le G_{M1} sont exprimés dans presque toutes les lignées cellulaires. Par contre, une forte expression du G_{D2} (ganglioside de la série-b) été caractérisée pour la lignée de cancer du poumon à petites cellules (Yoshida et al., 2001). Le niveau d'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides comme la GD3S et la GM2/GD2 synthétase présente une bonne corrélation avec l'expression des gangliosides de la série-b (Yoshida et al., 2001). L'expression du G_{D2} été également associée avec l'acquisition de la malignité par transfection d'un vecteur codant la GD3S dans la lignée de cancer du poumon à petites cel-

lules SK-LC-17 qui n'exprime pas les gangliosides de la série-b. Cette transformation provoque l'accumulation du G_{D2} et du G_{D3} , avec une diminution d'expression des gangliosides de la série-a. Le changement de profil gangliosidique est lié avec l'augmentation de la prolifération et de l'invasion de ces cellules (Yoshida et al., 2001). L'inhibition de l'expression des gangliosides de série-b par ARN interférence ciblant la GD3 synthétase réduit la prolifération cellulaire *in vitro* mais aussi la croissance tumorale dans un modèle de souris immunodéprimées (Ko et al., 2006). De plus, l'incubation des cellules SK-LC-17 GD3S+ avec l'anticorps anti G_{D2} induit l'inhibition de la prolifération par un mécanisme dépendant des voies de signalisation ERK/MAPK et p38/MAPK (Yoshida et al., 2001 ; Aixinjueluo et al., 2005). Dans les cellules transfectées, l'induction de l'apoptose après incubation avec l'anticorps anti- G_{D2} a été détectée, mais également l'inhibition du processus de l'apoptose par l'inhibiteur Caspase z-VAD, ce qui suggère que l'apoptose provoquée par l'anticorps anti- G_{D2} passe par la voie dépendante de la caspase 3. Aixinjueluo et ses collaborateurs ont montré que l'anticorps anti- G_{D2} induit l'apoptose par un changement de conformation des intégrines, une déphosphorylation des protéines FAK, et l'activation de la protéine p38 (Aixinjueluo et al., 2005). De plus, les anticorps anti- G_{M3} ou anti- G_{D3} ne provoquent pas l'apoptose, ce qui indique un rôle spécifique du G_{D2} dans le phénotype invasif des cellules SCLC (Yoshida et al., 2001).

d- Les gangliosides complexes dans le cancer du sein

Les conséquences de la sur-expression de la GD3S et des gangliosides complexes dans le processus de cancérisation du mélanome et du neuroblastome sont bien documentées. Par contre, moins de données sont disponibles concernant l'expression des AGAT dans les tumeurs mammaires. Une étude clinique a permis de montrer que le niveau global des gangliosides est plus élevé dans les carcinomes canaux infiltrants que dans les tissus mammaires normaux. Ces résultats ont été obtenus par des techniques d'immuno-détection et de spectrométrie de masse. De plus, une augmentation significative du niveau d'expression du G_{M3} , G_{D3} , O-acétyl- G_{D3} , et du G_{T3} a été décrite dans les CCI, par rapport à l'expression dans les tissus normaux (Marquina et al., 1996). Récemment, deux études cliniques ont montré que l'expression du gène *ST8SIA1*, codant l'enzyme GD3S qui contrôle la biosynthèse des gangliosides complexes, est augmentée dans les tumeurs mammaires ER- et corrélée à un grade histologique élevé des patientes (Ruckhäberle et al., 2008 ; Ruckhäberle et al., 2009). Par contre, une expression élevée de *ST8SIA1* dans les tumeurs ER+ serait associée à

une augmentation de la survie globale des patientes. Une étude présentée par Carcel-Trullols et collaborateurs montre que les cellules cancéreuses MDA-MB-231-MET qui ont été sélectionnées à partir de métastases osseuses sur-expriment le gène *ST8SIA1* (Carcel-Trullols et al., 2006). Dans notre laboratoire, nous avons également montré en utilisant le modèle cellulaire de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 que la GD3S joue un rôle important dans l'invasion (Cazet et al., 2010), ce modèle cellulaire utilisé pendant ma thèse sera développé dans la partie suivante. De plus, il a été montré que le ganglioside G_{D2} est identifié dans une petite fraction des lignées cellulaires du cancer du sein et dans des échantillons de tumeurs mammaires de patientes. Ces cellules G_{D2} positives sont aussi $CD44+$ et $CD24-/low$ et sont capables de former des mammosphères et d'initier les tumeurs. En outre, la GD3S est nécessaire pour les propriétés invasives des cellules BCSC. Une diminution d'expression de la GD3S par shRNA réduit le pourcentage de cellules MDA-MB-231 $G_{D2}+$ avec pour conséquence une diminution de l'invasion. L'injection de cellules MDA-MB-231-GD3S shARN chez des souris abolit la formation de tumeurs par rapport aux cellules contrôles (Battula et al., 2012).

2- Gangliosides et modulation des signaux transmembranaires pendant la carcinogénèse

Les gangliosides sont associés à de nombreux processus biologiques comme la croissance, la différenciation ou la liaison de toxines. De nombreuses études montrent que ces processus peuvent être modifiés par les gangliosides qui interagissent avec de nombreuses protéines comme les intégrines, les tétraspanines, les récepteurs aux facteurs de croissance. L'inhibition ou l'activation de ces protéines transmembranaires peut être régulée par l'interaction directe ou indirecte avec des gangliosides (Miljan and Bremer, 2002).

a- Régulation des RTK par les gangliosides

Les récepteurs tyrosine kinase (RTK) sont des protéines clefs qui sont impliquées dans la régulation des processus cellulaires comme la prolifération, la différenciation, la migration, le contrôle du cycle cellulaire. Il existe 58 RTKs chez l'humain et tous présentent une organisation structurale similaire, avec le domaine de liaison au ligand extracellulaire, un domaine

transmembranaire unique, et une région cytoplasmique qui contient des protéines à activité tyrosine kinase (Lemmon and Schlessinger, 2010). Généralement, les RTKs sont activés par la liaison du ligand, qui induit leur dimérisation ainsi que leur autophosphorylation. Depuis des années, il est mentionné dans la littérature que l'activité des récepteurs aux facteurs de croissance peut être modulée par les gangliosides (**Fig. 13**) (Miljan and Bremer, 2002 ; Weis and Davis, 1990).

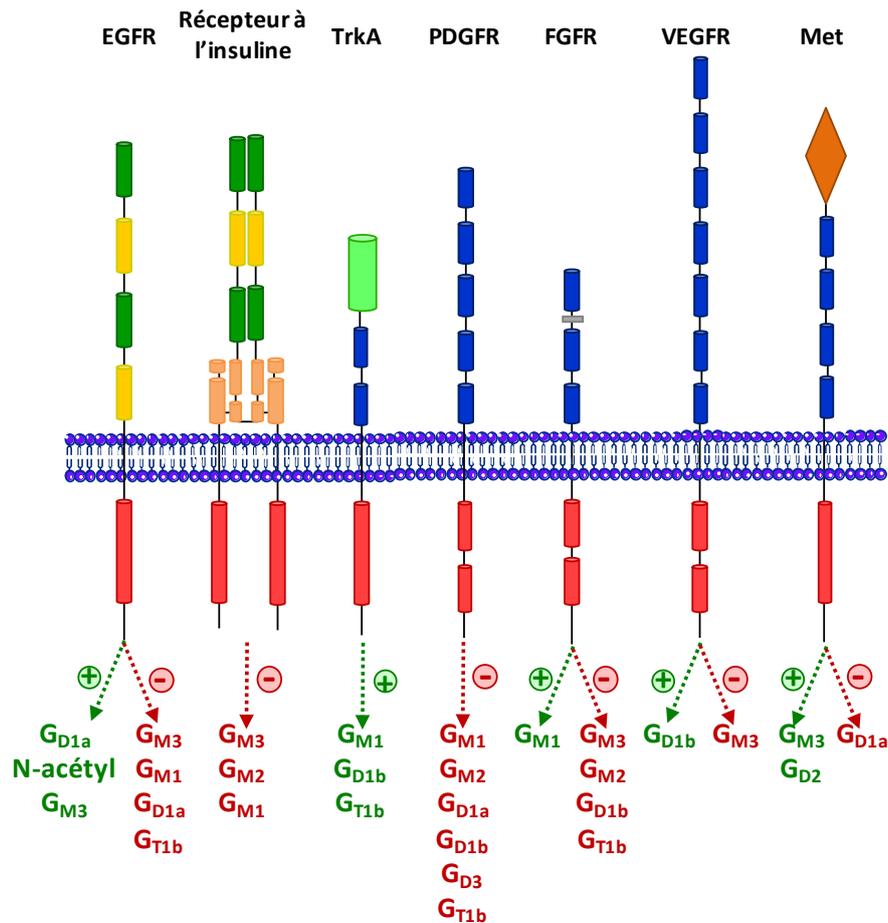


Figure 13: Régulation de l'activité de récepteurs à activité tyrosine kinase par les gangliosides. De nombreuses études ont permis de montrer à la fois une inhibition (rouge) ou une activation (vert) de la signalisation relayée par les RTKs, dépendamment des gangliosides exprimés, du type cellulaire, et des conditions expérimentales utilisées. On peut distinguer 3 mécanismes permettant aux gangliosides de moduler l'activité des RTKs : un mécanisme dépendant de l'interaction ganglioside/ligand (ex. FGF et G_{M1}) ; une régulation de la dimérisation du récepteur, comme c'est le cas du G_{M3} et de l'EGFR et une régulation de l'activité en fonction de la mobilité et de la localisation au sein des raideaux lipidiques (récepteur à l'insuline et G_{M3}). Adapté de (Miljan and Bremer, 2002 ; Lemmon and Schlessinger, 2010)

- **Le récepteur l'EGFR et les gangliosides**

L'EGFR est une protéine N-glycosylée qui possède 11 sites de N-glycosylation potentiels dans son domaine extracellulaire (Stroop et al., 2000). Plusieurs études ont montré que le ganglioside G_{M3} est capable de se lier spécifiquement au domaine extracellulaire de l'EGFR et d'inhiber sa dimérisation et son autophosphorylation (Miljan and Bremer, 2002 ; Kawashima et al., 2009). Il a également été montré que l'inhibition de l'activité tyrosine kinase était dépendante des interactions entre les résidus de GalNAc des chaînes N-glycanniques du récepteur et la partie glycanique du G_{M3} (Yoon et al., 2006 ; Kawashima et al., 2009). De même, de récentes études montrent l'effet inhibiteur du G_{M3} sur l'activation de l'EGFR dans les cellules cancéreuses hépatiques murines Hca-F25 (Huang et al., 2013). Dans les cellules HcaP à faible potentiel métastatique, le ganglioside majeur est le G_{M3} . Par contre, les lignées cellulaires HcaF à fort potentiel métastatique expriment majoritairement le G_{M2} . De plus, l'inhibition de l'expression du G_{M3} par l'inhibiteur de la biosynthèse des glycolipides PPMP provoque une augmentation de la migration des cellules HcaP par activation de l'EGFR et des voies de signalisation PI3K/AKT. Au contraire, l'augmentation de G_{M3} dans les cellules HcaF par ajout exogène de ce ganglioside induit l'inhibition de la migration et la mortalité des cellules (Huang et al., 2013). Le récepteur EGFR peut être régulé positivement par les gangliosides. Par exemple, l'augmentation de la quantité de G_{D1a} dans des cellules NHDF (Normal Human Dermal Fibroblast) induit la dimérisation de l'EGFR et son autophosphorylation, mais aussi l'activation des voies intracellulaires des MAPK. L'activation de ce récepteur a été observée en l'absence de facteurs de croissance (Liu et al., 2004).

- **Récepteur Met et gangliosides**

Le récepteur à activité tyrosine kinase Met est un récepteur pour « l'hepatocyte growth factor (HGF) /scatter factor (SF) », actif pendant le développement mais il est aussi connu comme un récepteur impliqué dans la migration des cellules, leur prolifération et l'invasion dans le cancer (Ponzo and Park, 2010). Il a été montré que certains gangliosides sont impliqués dans la régulation de ce récepteur. Par exemple, l'expression de la GD3S dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 induit une accumulation du ganglioside G_{D2} à la membrane plasmique avec une activation constitutive du récepteur c-Met. L'activation de ce récepteur provoque la prolifération et la migration des cellules MDA-MB-231 en l'absence

de facteurs de croissance (Cazet et al., 2010, 2012). De plus, l'inhibition de la GM2/GD2 synthétase par siRNA réduit l'activation de c-Met et inverse le phénotype prolifératif (Cazet et al., 2012). De récentes études ont montré que le G_{M3} est aussi impliqué dans la régulation du récepteur c-Met. Dans des lignées cellulaires cancéreuses hépatiques murines, l'augmentation de la quantité de G_{M3} (par ajout exogène) renforce la phosphorylation de c-Met et l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT, avec stimulation de la migration. La diminution de l'expression du G_{M3} provoque l'inhibition de la phosphorylation de ces récepteurs et de l'activation des voies de signalisation associées (Li et al., 2013). De plus, le G_{D1a} peut réguler l'activation de c-Met dans la lignée cellulaire murine d'ostéosarcome FBJ-LL (Zhang et al., 2011).

- **VEGFR et les gangliosides**

Le VEGFR (Vascular endothelial growth factor receptor) est un facteur angiogénique important en conditions physiologiques mais également impliqué dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales pendant l'angiogenèse en conditions pathologiques. Il a été montré que certains gangliosides peuvent réguler l'activation de ce récepteur. Par exemple, le G_{M3} inhibe le processus d'angiogenèse par l'inhibition des voies de signalisation induites par le VEGF, par l'interaction directe avec le récepteur VEGFR2 (Chung et al., 2009). De même, les tumeurs de cerveau présentant une forte expression du G_{M3} sont généralement moins vascularisées par rapport aux tumeurs avec une faible expression du G_{M3} (Seyfried and Mukherjee, 2010). De plus, le ganglioside G_{D1b} induit la dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur VEGFR dans les cellules endothéliales avec une activation des voies de signalisation qui induisent la prolifération et la migration (Seyfried and Mukherjee, 2010).

b- Intégrines et gangliosides

Hakomori a proposé le terme de « Glycosynapse » qui définit une région dans la membrane plasmique (microdomaine) impliquée dans l'adhésion glycanne-dépendante (par interaction GSL-GSL ou par modulation de protéines impliquées dans l'adhésion, telles que les intégrines, par les GSLs). Les glycosynapses de type 3 sont des microdomaines non cavéolaires

caractérisés par la présence de tétraspanines, telles que CD9, CD81 et CD82 (Regina Todeschini and Hakomori, 2008). Les tétraspanines sont des protéines membranaires comportant 4 domaines transmembranaires qui interagissent à la fois avec les GSL et les intégrines (Pri-netti et al., 2009). Le ganglioside G_{M3} forme avec les intégrines et CD9 un complexe qui est présent dans la lignée cellulaire cancéreuse de vessie non invasive KK47 ; par contre la lignée correspondante YTS1 présentant un phénotype invasif exprime beaucoup plus faiblement le G_{M3} . L'inhibition de l'expression du G_{M3} dans les cellules KK47 par le PPMP induit l'activation de la protéine kinase c-Src et l'augmentation de la mobilité des cellules. Par contre, l'addition exogène de G_{M3} dans les cellules YTS1 induit la stabilisation du complexe tétraspanines/intégrines, la localisation de la protéine Csk dans les glycosynapses, et l'inactivation de c-Src, ce qui inhibe la motilité cellulaire (**Fig. 14**) (Mitsuzuka et al., 2005).

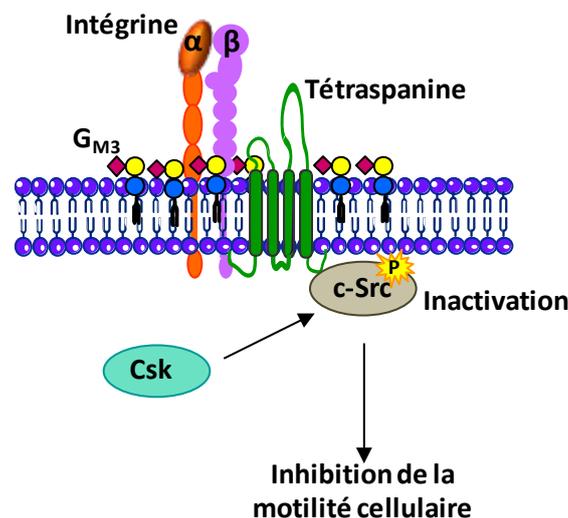


Figure 14 : Rôle du G_{M3} dans la signalisation par les intégrines. La formation d'un complexe G_{M3} /intégrine/tétraspanine CD9 au sein des glycosynapses induit le recrutement de la protéine Csk. Cette protéine provoque l'inhibition de la protéine c-Src réduisant ainsi la motilité cellulaire.

c- Interaction des gangliosides avec des protéines de la matrice extracellulaire

Plusieurs études ont montré que les gangliosides sont impliqués dans l'interaction avec les protéines de la matrice cellulaire comme le collagène, la fibronectine ou la laminine, soit par une interaction directe, soit par un mécanisme dépendant des intégrines (Nakano et al., 1999 ; Kazarian et al., 2003 ; Ichikawa et al., 2009). Par exemple, dans les cellules neuronales il a été montré que la laminine 1 se lie au G_{M1} par l'intermédiaire de la chaîne glycanique,

et cette interaction provoque une relocalisation du récepteur NGF-TrkA et de la $\beta 1$ intégrine. Ce complexe induit la signalisation intracellulaire Lyn-Akt et MAPK qui stimule la croissance neuronale (Ichikawa et al., 2009). De plus, les mêmes auteurs ont montré que l'interaction laminine 1 - G_{M1} est spécifique et suggère que la conformation du G_{M1} joue un rôle important. Le résidu d'acide sialique est nécessaire mais aussi le résidu de Gal à l'extrémité 5' de la partie glycanique du G_{M1} (**Fig. 15**). D'autres études montrent clairement le rôle des gangliosides dans le processus d'adhésion par interaction avec la matrice extracellulaire. Par exemple, dans les cellules de neuroblastome LA-N1, l'incubation avec le PDMP (un inhibiteur de la synthèse des gangliosides) diminue l'adhésion au collagène (Kazarian et al., 2003). De même, Nakano et collaborateurs montrent qu'après l'incubation des cellules de mélanome SK-Mel-28 qui présentent une forte expression de G_{D3} avec un anticorps monoclonal anti- G_{D3} , l'attachement des cellules sur le collagène de type IV, la fibronectine et la laminine est inhibée (Nakano et al., 1999).

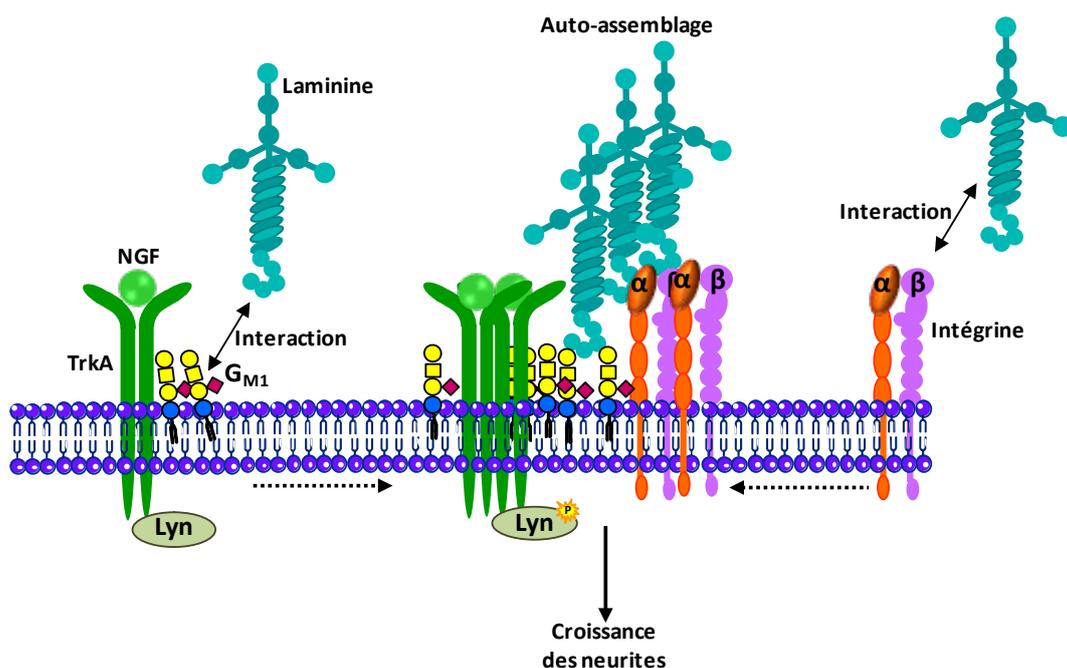


Figure 15 : Représentation schématique de l'interaction entre la laminine et le ganglioside G_{M1} au sein des radeaux lipidiques. La laminine 1 se lie directement au G_{M1} et induit son agrégation, augmentant ainsi la concentration de TrkA dans les radeaux lipidiques et l'activation de molécules répondant au NGF (Nerve Growth Factor) telles que Lyn. Le clustering du G_{M1} et de la laminine induit également la relocalisation et l'enrichissement des intégrines au sein des radeaux lipidiques. Ces microdomaines enrichis en G_{M1} , TrkA, intégrines et molécules de signalisation constituent des plateformes fonctionnelles pour les voies de signalisation qui déclenchent la croissance des neurites (Adapté de Ichikawa et al., 2009).

3- Les gangliosides, cibles pour la thérapie des cancers

Le changement d'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides et la modification de leur profil à la surface cellulaire est observé dans la carcinogenèse, conduisant à l'apparition d'antigènes glucidiques associés aux tumeurs (AGAT). Comme nous l'avons vu, plusieurs gangliosides associés aux tumeurs ont une origine embryonnaire et sont exprimés à un faible niveau dans les tissus normaux. Un changement d'expression des gangliosides est lié avec la prolifération des tumeurs, l'invasion et l'angiogenèse. De ce fait, les gangliosides constituent une cible de premier intérêt dans la thérapie anticancéreuse. Par contre, bien que les AGAT rendent les cellules de cancer légèrement antigéniques, ils sont médiocrement immunogéniques. De multiples signaux semblent nécessaires pour activer une forte réponse immunitaire cellulaire contre ces antigènes *via* les lymphocytes T. Dans ce contexte, des outils thérapeutiques innovants sont en cours de développement, basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-gangliosides, et ont atteint le stade des essais cliniques pour différents types de cancers comme le mélanome, le neuroblastome, et le cancer du poumon à petites cellules.

a- Anti-G_{D2} mAbs

Le ganglioside G_{D2} est un disialoganglioside qui est exprimé dans les tumeurs d'origine neuro-ectodermique comme le neuroblastome, le mélanome mais aussi le gliome et le cancer du poumon à petites cellules. Il a été montré qu'un anticorps anti-G_{D2} peut inhiber le processus de prolifération, de migration et d'invasion dans des modèles cellulaires de cancer du poumon à petites cellules SK-LC-17 (Aixinjueluo et al., 2005). De nombreux anticorps anti-G_{D2} ont été développés pour une utilisation thérapeutique, et ont été testés dans le mélanome et le neuroblastome (Durrant et al., 2012). Les premières études ont reporté que l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-G_{D2} L27 chez les patients atteints de mélanome entraîne une régression des tumeurs exprimant le G_{D2} (Irie and Morton, 1986). D'autres anticorps ont été évalués, comme les anticorps 3F8 et 14.G2a, mais ces derniers se sont avérés

toxiques du fait de l'expression du G_{D2} au niveau des nerfs périphériques et des mélanocytes de la peau (Rabu et al., 2012). L'équipe de Brenner a développé une autre stratégie vaccinale et mis au point un modèle de lymphocytes T capable de fixer spécifiquement le G_{D2} . Ces cellules effectrices expriment un récepteur chimérique composé d'un domaine extracellulaire reconnaissant le G_{D2} (dérivé de l'anticorps anti- G_{D2} sc14.G2a) et du domaine intracellulaire des molécules de co-stimulation CD28 et OX40 (Yvon et al., 2009 ; Cartellieri et al., 2010). L'expression du G_{D2} à la surface des cellules primaires de mélanome permet une reconnaissance du récepteur chimérique, une activation des lymphocytes T par les molécules CD28 et OX40, puis leur prolifération et la production des cytokines (IFN- γ , IL-2, TNF- α et IL-5) entraînant une cytotoxicité contre les cellules tumorales (Yvon et al., 2009). De récentes études montrent que cette stratégie peut induire un réel bénéfice chez les patients atteints d'un neuroblastome actif avec une survie plus longue (Louis et al., 2011).

b- Anti- G_{D3} mAbs

Le disialoganglioside G_{D3} est fortement exprimé dans le mélanome et dès les années 80, des essais de biothérapie avec l'anticorps R24 qui reconnaît spécifiquement le G_{D3} ont été réalisés (Dippold et al., 1980; Houghton et al., 1985). L'anticorps R24 entraîne *in vitro* une toxicité dépendante du complément et une cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, et bloque la croissance du mélanome dans des modèles animaux (Nasi et al., 1997). Par contre, l'anticorps R24 utilisé seul ou en combinaison avec des cytokines ou des agents chimiques thérapeutiques, présente des résultats limités chez les patients. Les principaux effets secondaires reportés après l'utilisation du R24 sont l'urticaire, un prurit, et une hypertension qui limite la dose maximale acceptée (Bajorin et al., 1992; Kirkwood et al., 2000). Dans ce contexte, des anticorps chimériques KM87 et KW-2871 ont été développés. Après injection de KM871, une réduction significative de la croissance tumorale chez les souris Nude a été détectée (Scott et al., 2001). Des résultats préliminaires semblent indiquer que l'anticorps KM871, stable *in vivo*, présente un potentiel thérapeutique intéressant (Scott et al., 2005). De plus, l'anticorps KW-2871 est actuellement soumis à une étude de phase II chez les patients avec un mélanome métastatique (Rabu et al., 2012).

VI- Le cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent dans la population féminine. Récemment, le taux de métastases et la mortalité chez les patientes atteintes de cancer du sein ont diminué à la suite d'un pronostic précoce par mammographie et l'amélioration des traitements, notamment systémiques (chimiothérapie, hormonothérapie, thérapies ciblées). Cependant, 15 à 20% des patientes présentent une pathologie agressive et développent des métastases distantes 3 ans après la détection initiale de la tumeur primaire ; la mise en place d'approches thérapeutiques plus efficaces dépend donc d'une meilleure connaissance des sous-types tumoraux.

1- Les caractéristiques des tumeurs mammaires

Il existe plusieurs types de classification, basées sur différents critères (histologiques ou moléculaires).

a- Classification histologique

Cette classification est basée sur l'observation de biopsies au microscope. Les adénocarcinomes mammaires représentent environ 95% de tumeurs malignes, qui se développent à partir des cellules épithéliales, soit des cellules des canaux (carcinome canalaire), soit à partir de cellules des lobules (carcinome lobulaire) (**Fig. 16**). Toutefois, les cancers du sein peuvent être classés en carcinomes *in situ* (non invasifs) et en carcinomes infiltrants (invasifs) (Malhotra et al., 2010). Les carcinomes *in situ* dans lesquels la prolifération maligne des cellules épithéliales s'effectue dans la lumière du canal galactophore ou dans les lobules sont respectivement appelés canaux (CCIS), et lobulaires (CLIS). Le carcinome canalaire *in situ* est considérablement plus fréquent que le type lobulaire. Les carcinomes infiltrants, qui ont la propriété d'envahir les tissus adjacents, évoluent localement et en métastasants. Ce type de cancer représente un groupe hétérogène avec plusieurs sous-types histologiques. La der-

nière édition de la World Health Organization présente 17 types histologiques distincts (Weigelt et al., 2010). Le carcinome canalaire infiltrant (IDC) est le plus fréquent des sous-types et représente 65 à 80 % de toutes les lésions invasives (Weigelt et al., 2010).

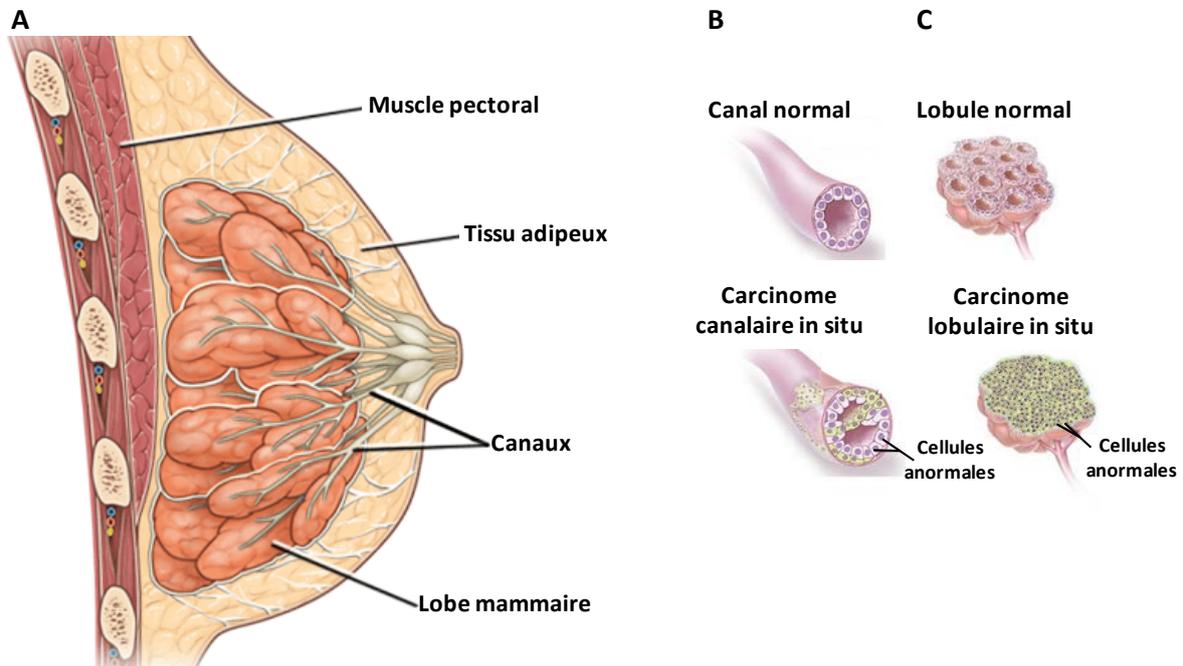


Figure 16 : Les carcinomes canaux et les carcinomes lobulaires. A : Structure de la glande mammaire. B et C : Représentations schématiques des structures canalaire (B) et lobulaire (C) dans lesquelles la majeure partie des tumeurs de sein se développent.

Les IDC peuvent être ensuite sous-classifiés par l'observation microscopique des cellules cancéreuses. Il existe 3 grades de cancer du sein :

- **Grade 1** – Cellules bien différenciées, de bon pronostic
- **Grade 2** – Cellules moyennement différenciées, de moyen pronostic
- **Grade 3** – Cellules faiblement différenciées, de mauvais pronostic.

Cette classification est basée sur le niveau de :

- La formation de tubes évaluant le pourcentage de tumeurs qui forment des structures canaux,
- Le pléomorphisme nucléaire évaluant 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 répllication anormale où

les mécanismes qui contrôlent les chromosomes et l'expression des gènes sont altérés,

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

b- Classification anatomo-clinique

La classification anatomo-clinique ou classification TNM (Tumor Node Metastasis) est un système de classification utilisé couramment par les cliniciens, et qui peut contribuer à évaluer le pronostic de la maladie et à déterminer le traitement à prescrire. Le système est basé sur 3 caractéristiques :

1- La taille de la tumeur primaire (**T**). Elle est notée de **T0** à **T4** pour les tumeurs les plus étendues.

2- Si le cancer a atteint ou non les ganglions lymphatiques (**N**). Noté de **N0** à **N3** pour les métastases dans les ganglions lymphatiques supraclaviculaires ipsilatéraux.

3- Distance pour d'éventuelles métastases (**M**), où **M0** correspond à l'absence de métastase et **M1** à leur présence.

Ces trois points de classification permettent également d'établir le stade du cancer du sein de 0 à IV.

- **Stade 0** : Le cancer *in situ*
- **Stade I** : Taille de la tumeur \leq à 2 cm, absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional.
- **Stade II** : La tumeur de 2 à 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.

Ce type de classification est insuffisant pour adopter un traitement spécifique. Ce système ne présente pas d'informations sur d'autres paramètres importants tels que le statut des récepteurs ER (Estrogen receptor) et du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique

humain HER2 Une classification des cancers du sein en sous types moléculaires a donc été développée.

c- La classification moléculaire

L'analyse du transcriptome sur puces à ADN a prouvé l'hétérogénéité des tumeurs, démontrant par le profil d'expression des gènes et l'expression immunohistochimique des ER, des récepteurs de la progestérone (PR) et de HER2 que le cancer du sein peut être classifié en 5 sous-types (Prat and Perou, 2011; Sørlie et al., 2001), (**Tableau 2**). Cette classification moléculaire est basée sur les types histologiques, le grade des tumeurs, le statut ganglionnaire et par la présence de marqueurs tels que les récepteurs ER et plus récemment HER2

- **Le type luminal** : il est le sous-groupe le plus représenté correspondant à des cancers généralement de bas grades qui expriment les récepteurs hormonaux (œstrogènes et progestérone) et les cytokératines (CK) 8/18. Ce groupe peut être subdivisé en deux sous-types :

1- **Luminal A** : ER+ et/ou PR+, HER2- de grade faible et bon pronostic (de 19 à 39 % des cancers du sein) avec une forte expression du récepteur aux œstrogènes.

2- **Luminal B** : ER+ et/ou PR+, HER+ est le sous-type avec le pronostic le moins favorable qui représente 10 à 23 % des cancers du sein. Ce groupe est caractérisé par une forte expression des gènes de prolifération cellulaire et anti-apoptotiques par rapport au sous type A.

- **HER2+/ERBB2+** (4 à 10 % des cancers du sein). Ces tumeurs sur-expriment le gène ERBB2 codant le récepteur à l'activité tyrosine kinase Her2 mais présentent aussi une expression élevée de l'EGFR et du FGFR. Ce sont des tumeurs à mauvais pronostic, dans lesquelles la protéine p53 est mutée dans 75 % des cas.

- **Basal-like** : ER-, PR-, HER-, CK5/6+ (15 à 20 %). Ces types de tumeurs sont souvent d'un grade histologique élevé et sont caractérisés par l'absence d'expression de récepteurs hormonaux aux œstrogènes et de la progestérone ainsi que du récepteur à l'activité tyrosine kinase Her2 (ERBB2). De plus, ces types de cancers présentent une forte expression des gènes de prolifération cellulaire, tels que le récepteur aux facteurs de croissance EGFR et des cytokératines 5/6. Des mutations des gènes p53 et BRCA1 ont été décrites dans 82 % des cas.

- **Claudin low** : c'est un sous-type de cancer comme le sous-type « basal-like » qui est caractérisé par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et du récepteur HER2. Par contre, ce sous-type présente une faible expression des gènes impliqués dans l'adhésion cellule épithéliale - cellule épithéliale tels que les gènes de la E-cadhérine, des claudines 3, 4, et 7. (Prat et al., 2010). De récentes études ont montré que ce sous-type est en général associé avec un grade élevé (Lu et al., 2013).

Tableau 2. La classification moléculaire du cancer du sein (adapté de Holliday and Speirs, 2011).

Classification	Caractéristique	Exemple de lignée cellulaire
Luminal A	ER+, PR+/-, HER2-, Ki67↓ Réponse à l'hormono-thérapie, mais aussi forte réponse à la chimiothérapie	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER+, PR+/-, HER2+, Ki67↑ Réponse généralement à l'hormono-thérapie, mais réponse variable pour la chimiothérapie. Les tumeurs HER2+ répondent au trastuzumab (herceptine).	BT474, 2R-75
HER2	Ki67↑, réponse au trastuzumab, mais aussi à la chimiothérapie.	SKBR2, MDA-MB-453
Basal-like	ER-, PR-, HER2-, EGFR+, CK5/6+, Ki67↑ Pas de réponse à l'hormono-thérapie, mais souvent répondant à la chimiothérapie.	MDA-MB-468, SUM 190
Claudin low	ER-, PR-, HER2- Faible expression de la E-cadhérine, des claudines 3, 4, et 7. Réponse intermédiaire à la chimiothérapie	BT549, MDA-MB-231, HS578T, SUM 1315.

- **Normal-like** ou « non classifié ». Ces tumeurs peuvent être ER+ ou ER-, elles 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.

2- Processus de la tumorigenèse

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 alternations génétiques. La transformation de la cellule est suivie de son expansion clonale et de sa croissance en masse tumorale ou cancer primaire. Les cellules cancéreuses envahissent ensuite progressivement les tissus adjacents au niveau local puis se disséminent dans l'organisme par rupture de la membrane basale pour former les métastases. (Fig. 17).

3- Formation de la tumeur primaire et événement génétique

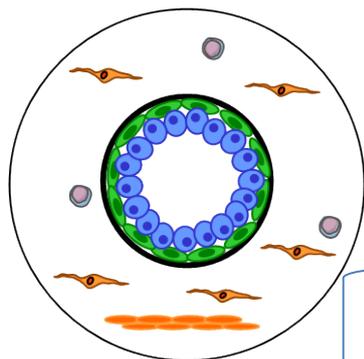
Le cancer du sein est une pathologie hétérogène avec différents sous-types et des résultats cliniques variables. Il a été montré que la progression du cancer du sein est liée à l'accumulation de mutations génétiques qui conduisent à des fonctions cellulaires aberrantes. Les altérations génétiques correspondent à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs ou au contraire à l'activation d'oncogènes.

a- Gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeur peuvent être divisés en 3 groupes. Les garants de la stabilité du génome (tels que TP53, BRCM/2), les inhibiteurs de la croissance cellulaire (tels que RB, PTEN) et les modulateurs du microenvironnement tumoral (tel que CDH1). Dans cette partie, nous présenterons les gènes plus fréquemment mutés dans le cancer du sein.

- **RB**

Le gène *RB* est le premier gène suppresseur de tumeur identifié à l'origine dans le rétinoblastome. Des études ultérieures ont mis en évidence la perte d'hétérozygotie, des mutations et une diminution de l'expression de RB dans différents cancers humain (Lai et al., 2012). La protéine RB intervient dans le contrôle de la transition G1/S du cycle cellulaire. Une expression aberrante de RB a été démontrée dans 20-30% 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 (Sherr and McCormick, 2002).



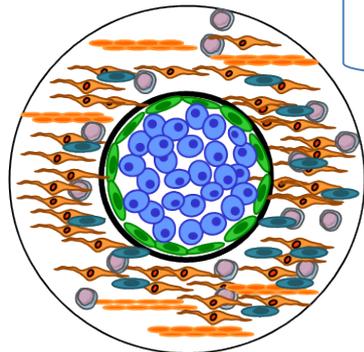
Normal

Les canaux mammaires normaux sont constitués de la membrane de base et d'une couche intérieure épithéliale luminale sur une couche externe de cellules myoépithéliales. Les cellules qui composent le stroma comprennent divers types de cellules tels que les leucocytes, fibroblastes, myofibroblastes, cellules endothéliales.



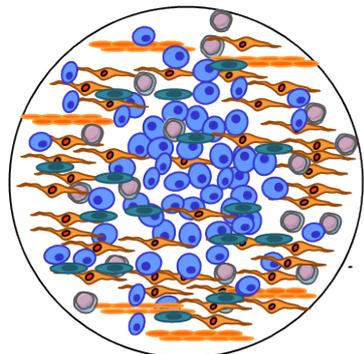
Hyperplasie : Correspond à une prolifération des cellules épithéliales des canaux galactophores ou du lobule mammaire, liée à des modifications génétiques.

Hyperplasie atypique : Les cellules continuent le processus de modification histologique et la prolifération. Ce stade est noté comme des lésions précancéreuses.



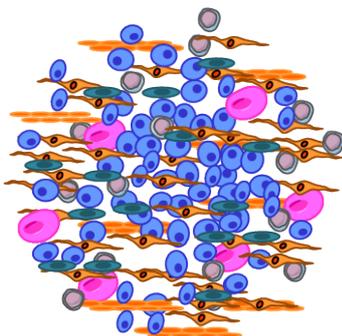
DCIS

Le carcinome *in situ* : Les cellules épithéliales cancéreuses prolifèrent uniquement au niveau local, dans la lumière des canaux, sans franchir la membrane basale. Les cellules myoépithéliales présentent des altérations épigénétiques et phénotypiques et leur nombre diminue, par contre le nombre de fibroblastes, de myofibroblastes, de lymphocytes et de cellules endothéliales augmente pendant la progression de la tumeur.



IDC

Carcinome ductal invasif : cette étape est caractérisée par la perte des cellules myoépithéliales et l'intégralité de la membrane basale qui permet aux cellules tumorales d'envahir les tissus conjonctifs.



Métastases

Les métastases : les cellules néoplasiques essaient à partir de la tumeur primaire via les voies lymphatiques ou sanguines et colonisent ainsi un ou des organes distants.

- Leucocyte
- Fibroblaste
- Cellule myoépithéliale
- Cellule épithéliale luminale
- Cellule d'organe distant
- Myofibroblaste
- Cellule endothéliale

Figure 17 : Les différentes étapes de la cancérisation dans le cas d'un carcinome canalaire mammaire (Adapté de Polyak and Kalluri, 2010).

- **TP53**

TP53 est un autre gène suppresseur de tumeurs, communément muté dans le cancer du sein (25 % des tumeurs mammaires). En particulier, la mutation de *TP53* est exceptionnellement fréquente dans un cancer triple négatif et associée à un mauvais pronostic de survie des patientes (Olivier et al., 2006). La protéine P53 joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation des lésions moléculaires ou encore l'induction de l'apoptose. La protéine P53 est inhibée par la protéine MDM2 par interaction protéine-protéine, et par la E3 ubiquitine ligase spécifique de P53 qui induit son ubiquitinylation puis sa dégradation protéasomale (Levine and Oren, 2009). 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 a été montré que la mutation de TP53 est associée à une résistance à la chimiothérapie (Bertheau et al., 2008).

- **PTEN**

La protéine PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) participe à la régulation du cycle de division cellulaire en déphosphorylant les phosphatidyl-inositol triphosphates (PIP3). L'absence de PTEN entraîne une réduction de déphosphorylation du PIP3 en PIP2. L'augmentation du niveau de PIP3 induit la prolifération des cellules et la migration des cellules par l'activation constitutive des protéines Akt (Lai et al., 2012). De plus, les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+ et déficientes en PTEN présentent une faible réponse au Trastuzumab par rapport aux patientes avec une expression normale de PTEN (Nagata et al., 2004).

- **BRCA1/BRCA2**

La protéine BRCA joue un rôle important dans la réparation des cassures de l'ADN double brin par recombinaison homologue. La majorité des cancers du sein présentant une mutation germinale de BRCA1 présente un phénotype triple-négatif. Des stratégies thérapeutiques bloquant les mécanismes de réparation de l'ADN sont développés. Par exemple, l'*Olaparib* qui est un inhibiteur de poly-(ADP-ribose)-polymérase (PARP1) est une enzyme impliquée dans la réparation des cassures de l'ADN simple brin. En l'absence de PARP1, les cassures « simple brin » deviennent « double brin » et ces dernières ne sont pas réparées en

présence d'une déficience BRCA1, avec pour conséquence un arrêt de la réplication (Bundred et al., 2013).

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. Ce sont des facteurs de croissance (HGF/FS), des récepteurs aux facteurs de croissance (EGFR, c-Met), des protéines de voies de signalisation (Ras, Src), des acteurs de la survie cellulaire (Bcl-2), des régulateurs du cycle cellulaire (cycline D1, cdk) ou encore des facteurs de transcription (c-Myc, Rel). Dans le cancer du sein, les oncogènes sont principalement activés par l'amplification génique.

- **c-ERBB2**

cERBB2 est un gène amplifié dans le cancer du sein. Le récepteur transmembranaire ERBB2 est impliqué dans l'activation des voies de signalisation Ras/MAPK et PI3K/Akt qui conduisent à une division cellulaire. La sur-expression du récepteur ERBB2 intervient dans 25 à 30 % des cas de cancer du sein. La sur-expression de ce récepteur induit sa dimérisation et sa transphosphorylation constitutive, puis favorise la prolifération et la formation de la tumeur primaire ainsi qu'une résistance aux traitements hormonaux et à la chimiothérapie (Owens et al., 2004; Sergina and Moasser, 2007). Donc, par son implication dans la tumorigenèse, le récepteur HER2 constitue une cible de premier intérêt dans la thérapie anticancéreuse. Le *Trastuzumab* est un anticorps monoclonal recommandé comme traitement de première ligne pour des patientes avec des tumeurs métastatiques HER2⁺. Ce traitement peut être utilisé seul ou en combinaison avec l'hormono-thérapie ou la chimiothérapie. Par contre, cette thérapie peut être limitée pour cause d'intolérance. Par exemple, un dysfonctionnement cardiaque a été reporté chez 27 % des patientes. Afin d'améliorer les traitements, de nouveaux agents sont en cours d'essais cliniques (Awada et al., 2012) (**Fig. 18**).

- **MYC**

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. Le gène suppresseur de tumeurs *BRCA1* inhibe l'activité transcriptionnelle de *MYC*, donc la perte de *BRCA* accompagnée d'une sur-expression de *MYC* provoque le développement de cancer de type basal (Xu et al., 2010).

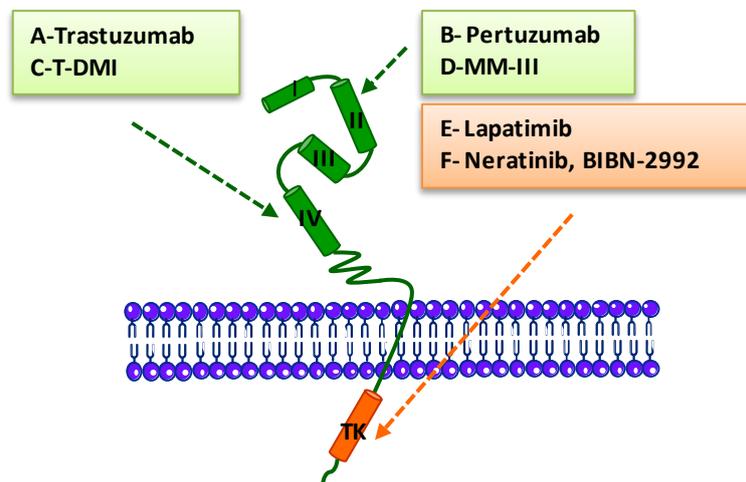


Figure 18 : Approches thérapeutiques visant à inhiber la croissance tumorale mammaire en ciblant la signalisation du récepteur HER2.

A : L'anticorps *Trastuzumab* se lie directement au domaine IV de la partie extracellulaire du récepteur. **B : *Pertuzumab*** : Anticorps monoclonal qui se lie à un site différent du *Trastuzumab*. Il bloque la dimérisation du récepteur par la fixation au domaine II. **C : T-DMI** : anticorps conjugué à une drogue, le T-DMI est constitué de l'anticorps monoclonal *Trastuzumab*, lié à un agent cytotoxique, la mertansine. **D : MM-III** : Nouvel anticorps monoclonal qui empêche la dimérisation des récepteurs. **E : *Lapatinib*** : Inhibiteur intracellulaire des domaines tyrosine kinase de HER1 et HER2, qui conduisent à l'inhibition des voies de signalisation qui contrôlent la prolifération cellulaire. **F : *Neratinib* et BIBN-2992 (*Afatinib*)** : Autres inhibiteurs à activité tyrosine kinase des récepteurs HER1, HER2 et HER4 pour Neratinib, et de HER1 et HER2 pour BIBN-2992.

- **CCDN1**

Le gène *CCDN1* (*PRDA1*) code pour la cycline D1 qui régule le passage G1/S et G2/M du cycle cellulaire. La cycline D1 est sur-exprimée dans 50% des carcinomes mammaires, en présence ou en l'absence d'amplification génique. 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 sur son promoteur, la régulation de *CCDN1* par l'œstradiol semble se faire indépendamment des récepteurs aux œstrogènes (Roy and Thompson, 2006).

4- Régulation épigénétique

La progression du cancer du sein est le résultat d'accumulation d'anomalies génétiques correspondant à l'activation des oncogènes et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. Il a été montré récemment que des modifications épigénétiques peuvent également conduire à une instabilité chromosomique et à des réarrangements responsables de la carcinogénèse. Les modifications épigénétiques sont des altérations de l'expression des gènes dues principalement à des modifications de l'acétylation des histones et de la méthylation de l'ADN au niveau des régions promotrices des gènes. Ces altérations ne sont pas dues à des modifications de la séquence des nucléotides dans les gènes (Connolly and Stearns, 2012).

a- Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN est effectuée par des ADN méthyl-transférases (DNMTs) qui ajoutent un groupement méthyl (-CH₃) au cycle pyrimidine de la cytosine pour former la méthylcytosine. La méthylation est effectuée sur la cytosine qui précède une guanine dans une séquence d'ADN appelée îlot CpG. Ce processus joue un rôle important dans l'hyperméthylation des gènes suppresseurs de tumeurs (Herman and Baylin, 2003). Les gènes hyperméthylés dans le cancer du sein peuvent être impliqués dans l'apoptose (RASSF1A, HOXA5, TNIST1), le contrôle de prolifération cellulaire (CCND2, p16, BRCA1, RAR β), la croissance (ER α , PGR), ou l'invasion (CDH1). Il est intéressant de noter que le gène ESR1 codant pour le récepteur α aux œstrogènes (ER α), possède 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⁺ (à 35%), il a été montré que 100% des tumeurs ER⁻/PR⁻ et 70% des tumeurs ER⁺/PR⁻ sont méthylées au niveau du promoteur du gène ESR1 (Lapidus et al., 1998). De plus, des études sur la lignée cellulaire du cancer du sein montre que la méthylation du promoteur pour l'ESR est associée avec la diminution d'expression des ARNm et protéines ER α , et un traitement de déméthylation induit la transcription du gène ER α (Yoshida et al., 2000). Dans ce contexte, des inhibiteurs des enzymes impliquées dans la méthylation des gènes ESR1 et PR, comme la 5-azacytidine, sont en cours d'essais cliniques chez des patientes atteintes de cancer du sein.

b- Hypo-acétylation

L'hypo-acétylation des histones consiste en l'élimination d'un groupement acétyl par les « histone déacétylases » HDAC, conduisant à la répression transcriptionnelle de gènes. Au cours de la carcinogenèse mammaire, une réduction de l'acétylation des histones et une expression aberrante d'HDAC ont été observées (Connolly and Stearns, 2012). Depuis quelques années, 11 différentes HDACs ont été identifiées. La sur-expression des HDACs peut provoquer l'hypo-acétylation des histones (H4, H3, H2A, H2B) mais également des protéines non-histones (α -tubuline, p53) (Suzuki et al., 2009). Les études présentées par Suzuki et collaborateurs ont montré que la diminution de la forme acétylée de l'histone H4 est associée avec la transition de la forme normale de l'épithélium vers le DCIS (Suzuki et al., 2009). Enfin, plusieurs inhibiteurs des HDAC ont été développés, comme par exemple l'acide subéryloylanilide hydroxamique (SAHA ou vorinostat) qui est en cours d'études cliniques et montre des résultats prometteurs (Connolly and Stearns, 2012).

5- Invasion et métastases

La métastase est un processus complexe à étapes successives qui fait intervenir une série d'interactions dynamiques entre les cellules tumorales et les cellules hôtes, ce qui permet aux cellules tumorales de quitter le site primaire et d'établir une lésion distante (Eckhardt et al., 2012). Dans le processus métastatique, on peut distinguer plusieurs étapes où chaque étape est associée avec une altération génétique spécifique. Trois classes de gènes impliqués dans le processus métastatique ont été identifiées : les gènes initiateurs de la métastase, les gènes de la dissémination et ceux impliqués dans la colonisation spécifique des tissus (Nguyen et al., 2009).

a- Les gènes d'initiation du processus métastatique

Les gènes qui sont impliqués dans la première étape de métastase sont exprimés dans les cellules cancéreuses mais également dans les cellules myoépithéliales, fibroblastiques, endothéliales et immunitaires. Ces gènes permettent aux cellules de proliférer de façon illimitée,

de franchir la membrane basale et d'envahir le stroma sous-jacent. Ensuite, ils favorisent la transition épithélium-mésenchyme (EMT), la migration et l'invasion cellulaire. L'étape initiale est la diminution des interactions cellules-cellules, qui vont par contre interagir avec la matrice extracellulaire. Il a été montré que les protéines impliquées dans le maintien des jonctions cellules-cellules comme la E-cadhérine sont impliquées dans ce processus, la diminution de leur expression étant associée avec les métastases du cancer du sein (Scully et al., 2012). Dans ce contexte, il a été montré que la sur-expression du facteur de transcription Twist 1 codé par le gène *TWIST1*, induit la répression transcriptionnelle du gène de la E-cadhérine (Yang et al., 2004).

b- Les gènes impliqués dans la dissémination

La dissémination des cellules cancéreuses est une étape incluant l'intravasation et la survie des cellules cancéreuses dans le système de circulation (vaisseaux lymphatiques ou sanguins) et l'extravasation depuis le vaisseau jusqu'aux tissus d'organes distants. Le gène *KAI1* (CD82) codant pour un membre de la famille des tétraspanines est un suppresseur de la croissance des tumeurs et des métastases. Les données d'expression de ce gène par microarray montrent que le niveau d'expression du gène *KAI1* est associé avec le processus de métastase, et que la perte de son expression favorise la dissémination tumorale (Christgen et al., 2009). D'autres gènes comme *COX2* (Cyclo-oxygénase), *MMP1* et *MMP2* (métalloprotéases) sont nécessaires pour favoriser l'extravasation des cellules cancéreuses (Nguyen et al., 2009).

c- Les gènes impliqués dans la colonisation spécifique des tissus

La dernière étape de la formation des métastases est l'attachement au niveau des cellules endothéliales vasculaires et l'extravasation depuis les vaisseaux jusqu'au tissu. Plusieurs études récentes ont montré que l'expression de certains gènes est associée avec la métastase spécifique vers certains organes. Des études de microarrays ont mis en évidence trois groupes de gènes responsables de métastases dans les os, les poumons et le cerveau (Lorusso and Rüegg, 2012) (**Fig. 19**).

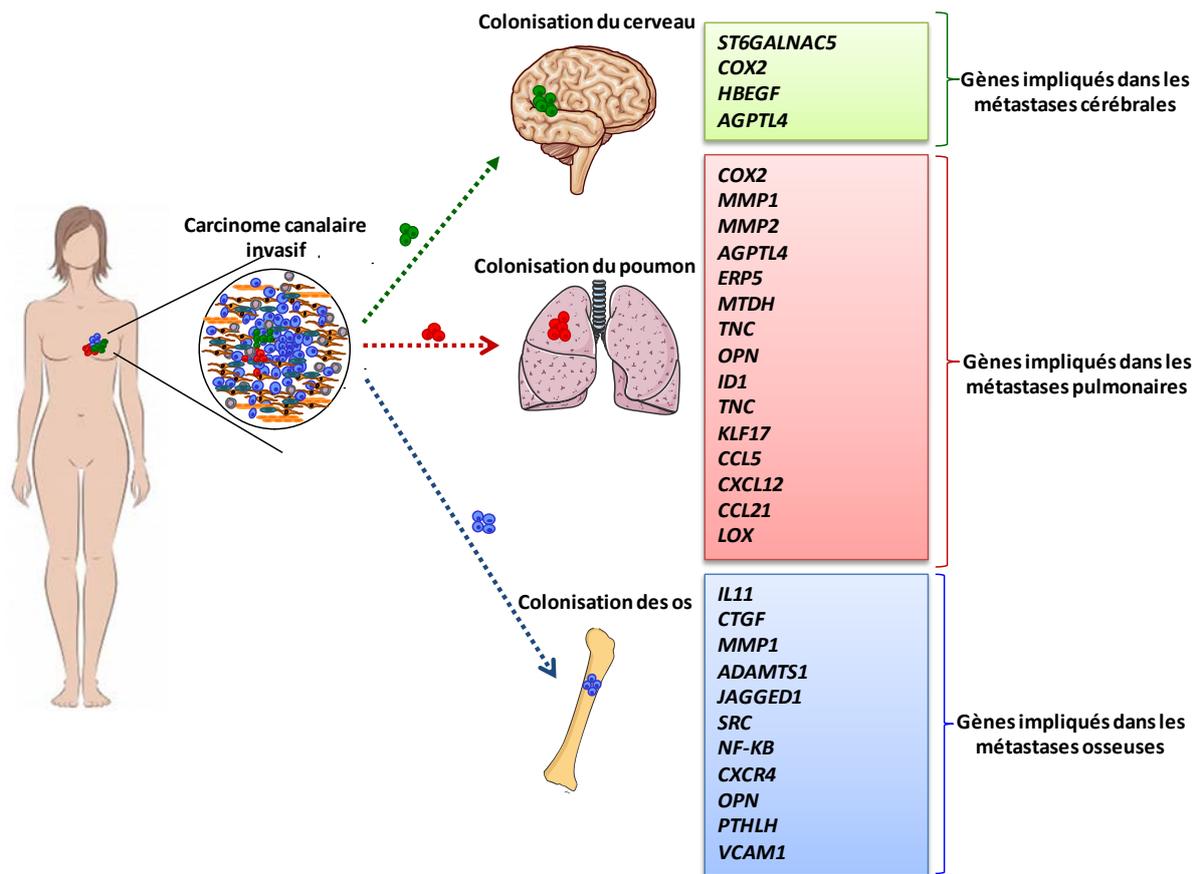


Figure 19 : Gènes impliqués dans les métastases organe-spécifiques du cancer du sein, dans les os, le poumon et le cerveau. Dans le cas d'une métastase, les cellules cancéreuses essaient à partir de la tumeur primaire via la circulation sanguine et infiltrent des organes distants par l'acquisition de propriétés particulières. En effet, la structure fenêtrée des capillaires sinusoides de la moëlle osseuse est plus permissive à l'extravasation des cellules cancéreuses que les capillaires continus des capillaires pulmonaires. Les capillaires cérébraux sont beaucoup plus difficiles à pénétrer, en raison de la structure particulière de la barrière hémato-encéphalique (Adapté de Lorusso and Rüegg, 2012).

- **Gènes impliqués dans les métastases cérébrales**

Les métastases cérébrales affectent environ 10-15% des patientes atteintes de cancer du sein au stade métastatique. Le processus de métastase dans les tissus cérébraux nécessite un phénomène d'extravasation au niveau des capillaires c'est-à-dire le passage spécifique au travers de la barrière hémato-encéphalique (Bos et al., 2009). L'analyse de l'expression génique des cellules qui présentent un grand potentiel métastatique révèle l'existence d'une signature des métastases cérébrales. Dix-sept gènes sont associés avec les métastases cérébrales chez des patientes atteintes de cancer du sein. Dans ce groupe, certains gènes comme

COX2 (cyclo-oxygénase), *ANGPTL4* (Angioproten like 4), *HBEGF* (Heparin-binding EGF-like growth factor) favorisent l'extravasation pulmonaire (Bos et al., 2009). Par contre, le gène de sialyltransférase *ST6GALNAC5* impliqué dans la biosynthèse des gangliosides α est exprimé spécifiquement dans les cellules métastatiques cérébrales. La néo-expression de ce gène par les cellules mammaires cancéreuses favorise l'adhérence de cellules au niveau des cellules endothéliales cérébrales et leur passage au travers la membrane hémato-encéphalique (Bos et al., 2009). Ces résultats ont montré que le processus de glycosylation des cellules joue un rôle important dans le développement des métastases et la colonisation spécifique des organes.

6- Les cellules souches de cancer du sein

Une cellule souche (CS) est définie comme une cellule indifférenciée se caractérisant par la capacité à engendrer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et à se maintenir par auto-renouvellement. Les différents types de cellules souches rencontrées au cours du développement et chez l'adulte sont à l'origine de toutes les cellules de l'organisme et permettent le renouvellement de certains tissus chez l'adulte. Il existe des points communs entre les cellules souches somatiques et les cellules initiatrices de tumeurs ou cellules souches de cancer. Les deux types de cellules possèdent la capacité de se renouveler de façon illimitée. Les cellules souches de cancer correspondent à une petite population qui donne naissance à de nombreuses cellules tumorales. De plus, ces cellules sont souvent résistantes aux thérapies anti-tumorales conventionnelles (radiothérapie, chimiothérapie). Les cellules souches de cancer du sein (BCSC : Breast Cancer Stem Cell) sont caractérisées par une forte expression de CD44 (CD44⁺) et une faible expression de CD24 (CD24^{-/low}) et expriment fortement l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH⁺). De plus, les voies de signalisation telles que les voies Wnt, Notch, Hedgehog et du TGF- β sont spécifiquement activées dans les BCSC. Il a également été montré que les phénotypes CD44⁺/CD28^{-/low} et ALDH1 sont associés avec les sous-types moléculaires « basal-like », un grade de tumeur élevé et un mauvais pronostic (Bane et al., 2013). Enfin, de récentes études présentées par Battula et collaborateurs montrent que le ganglioside G_{D2} est impliqué dans la formation des mammosphères. Ces cellules expriment également CD44 et présentent une faible expression de CD28. Le G_{D2}

est donc considéré comme un nouveau marqueur spécifique des BCSC (Battula et al., 2012).

VII. Contexte de la thèse

1. Modèle cellulaire MDA-MB-231 GD3S+

Les études menées dans notre laboratoire ont montré les effets de la sur-expression de la GD3 synthétase sur les propriétés des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231. Cette lignée cellulaire, ainsi que d'autres lignées cellulaires de sein (MCF-7, T47-D, BT-20), présente un profil d'expression de gangliosides limité. Les gangliosides principalement observés à la surface des cellules MDA-MB-231 sont des gangliosides de la série a- (G_{M3} , G_{M2} , G_{M1}), le ganglioside majeur étant le G_{M2} . Les gangliosides complexes des séries b- et c- n'ont été détectés dans aucune des lignées cancéreuses mammaires testées. Ce profil d'expression est corrélé avec l'expression transcriptionnelle des glycosyltransférases impliquées dans leur biosynthèse. Dans les cellules MDA-MB-231, le taux d'ARNm codant la GM3 synthétase est élevé, alors que celui de la GD3 synthétase est très faible. Aurélie Cazet et collaborateurs ont créé un modèle cellulaire dérivé des cellules MDA-MB-231 (de type « claudin low »), transfectées stablement par un vecteur codant la GD3S. Deux clones de cellules MDA-MB-231 GD3S+ ont été obtenus par sélection clonale. Contrairement aux cellules contrôles, les clones de cellules MDA-MB-231 GD3S+ expriment des gangliosides de la série b- (G_{D3} et G_{D2}) ainsi que des gangliosides de la série c- (G_{T3}) (Cazet et al., 2009). L'analyse des glycolipides de ces clones par spectrométrie de masse a montré que le G_{D2} était le ganglioside majoritairement exprimé (Cazet *et al.*, 2012). Le changement de profil des GSLs acides dans les clones est associé à une prolifération et une migration accrues des cellules MDA-MB-231 GD3S+ dans des conditions de sevrage (Cazet *et al.*, 2009). L'agressivité accrue de ces cellules a également été démontrée *in vivo* lors d'expériences chez des souris immunodéprimées. Des tumeurs primaires palpables apparaissent au bout d'une semaine lorsque les souris ont été inoculées avec les clones d'intérêt, alors qu'elles n'apparaissent qu'au bout de 4 semaines pour des cellules MDA-MB-231 contrôles (Cazet *et al.*, 2010). Des analyses du profil d'expression de récepteurs à activité tyrosine kinase par phospho-array et par Western-blotting ont montré que les cellules MDA-MB-231 GD3S+ présentent une activation constitutive et spécifique du récepteur c-Met, en l'absence de son ligand HGF/SF et une activation des voies de signalisation intracellulaires MEK/ERK et PI3K/AKT, ce qui pourrait expliquer

leur phénotype particulier (**Fig. 20**) (Cazet *et al.*, 2010). De plus, des expériences de compétition à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie saccharidique du G_{D2} permettent d'inhiber la prolifération des cellules MDA-MB-231 $GD3S^+$, alors que l'incubation avec un anticorps anti- G_{D3} n'a aucun effet.

Ces résultats suggèrent que la structure oligosaccharidique du G_{D2} est essentielle dans la spécificité d'activation du récepteur c-Met, indépendamment de son ligand HGF.

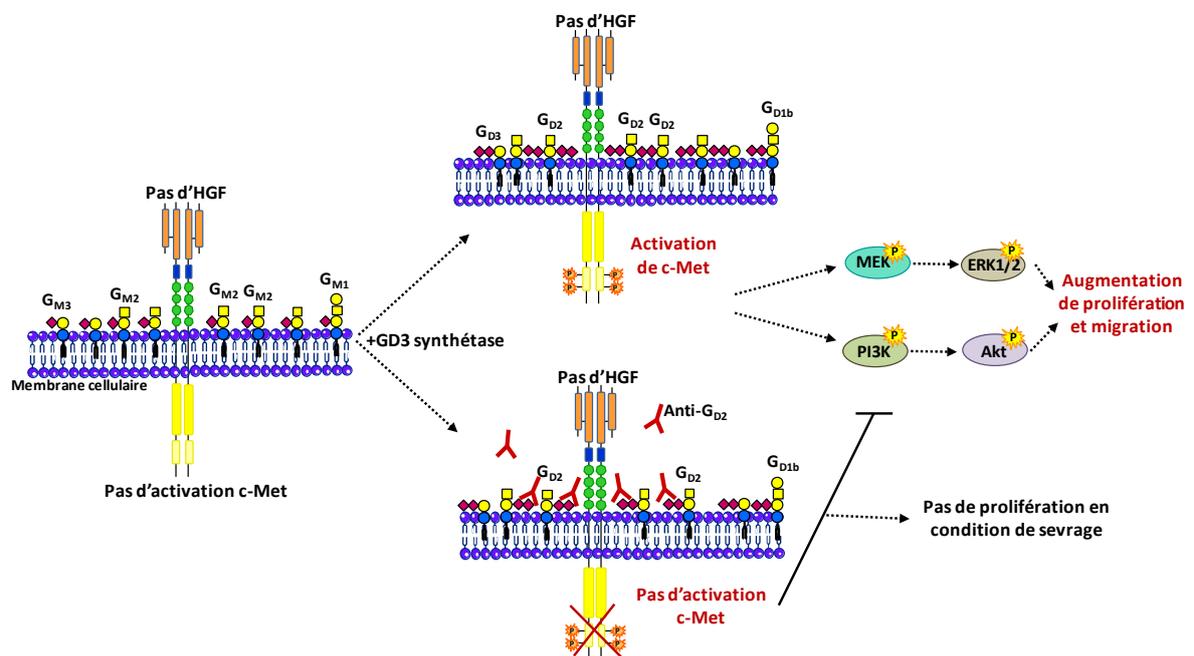


Figure 20 : Modèle de l'activation du récepteur c-Met par le ganglioside G_{D2} dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 sur-exprimant la $GD3S$. Par un mécanisme encore inconnu, la présence de G_{D2} à la surface des cellules MDA-MB-231 $GD3S^+$ induit l'activation du récepteur c-Met, en l'absence d'HGF. L'activation des voies de signalisation MEK/ERK et PI3K/Akt induit une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules $GD3S^+$. L'incubation des cellules MDA-MB-231 $GD3S^+$ avec un anticorps anti- G_{D2} a montré une forte diminution de la prolifération et de l'activation de 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.

VIII. Objectifs de thèse

De nombreuses études montrent que les anomalies d'expression des gangliosides complexes sont impliquées dans l'évolution des tumeurs. En parallèle, notre équipe a montré les conséquences de l'expression de la $GD3S$ sur la prolifération et migration des cellules cancé-

reuses mammaires MDA-MB-231. Au vu des résultats obtenus sur ce modèle cellulaire, il nous est apparu important d'étudier les effets de l'expression de cette enzyme dans d'autres lignées cellulaires afin de déterminer si le phénotype observé dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ pouvait être généralisé.

1. Quel est l'effet de l'expression de la GD3 synthétase dans les cellules MCF-7 ?

Notre choix s'est porté sur la lignée cellulaire de cancer du sein MCF-7 qui exprime le récepteur aux œstrogènes. Dans un premier temps, nous avons transfecté stablement les cellules MCF-7 par le vecteur pcDNA3-ST8Sia I contenant la séquence d'ADNc de la GD3 synthétase humaine. Ensuite, nous avons effectué une sélection clonale et nous avons caractérisé les clones par des techniques de cytométrie de flux, qPCR, de microscopie confocale et de spectrométrie de masse.

Dans un second temps, en utilisant notre nouveau modèle cellulaire MCF-7 GD3S+ qui présente une expression accrue des gangliosides des séries b (G_{D1b}) et c (G_{T3}) à la surface cellulaire par rapport aux cellules wild type (WT), nous avons effectué des expériences de prolifération et de migration.

2. La quantité de gangliosides peut-elle jouer un rôle dans le phénotype prolifératif des cellules MCF-7 ?

Les résultats obtenus par spectrométrie de masse ont montré que les cellules MCF-7 expriment une proportion importante de globosides. Le LacCer étant le précurseur commun pour les séries globo et ganglio, nous avons tenté d'augmenter la proportion de gangliosides en transfectant stablement les cellules MCF-7 par le vecteur d'expression pcDNA-ST3Gal V. Le gène *ST3GAL5* code l'enzyme ST3Gal V ou GM3S catalysant la conversion du LacCer en G_{M3} qui est faiblement exprimé dans les cellules MCF-7. Ensuite, pour augmenter la proportion des gangliosides des séries b et c, nous avons induit par transfection l'expression stable de la GD3S dans les cellules MCF-7 GM3S⁺.

Après sélection clonale, nous avons caractérisé les clones par qPCR, cytométrie de flux, et spectrométrie de masse. De plus, nous avons analysé les propriétés prolifératives de ces

clones et nous avons analysé le profil de phosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase, afin de comparer les propriétés des cellules MCF-7 GD3S+ à celles des cellules MDA-MB-231 GD3S+ caractérisées par Cazet et collaborateurs.

3. Quel est le mécanisme d'activation de c-Met par les gangliosides dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ ?

En parallèle, nous avons continué à travailler sur les cellules MDA-MB-231 GD3S+ afin d'étudier le mécanisme d'activation de c-Met par le G_{D2}. Malheureusement, le modèle cellulaire créé par Cazet et collaborateurs ne présentait plus le même phénotype, avec perte de la prolifération en absence de sérum et de la phosphorylation constitutive de c-Met. Nous avons donc exprimé la GD3S dans les cellules MDA-MB-231 et sélectionné des nouveaux clones que nous avons analysés par qPCR et cytométrie de flux. Enfin, dans les nouveaux clones obtenus, nous avons analysé le profil de phosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase et de kinases intracellulaires. Nous avons également analysé les propriétés prolifératives et migratoires des nouveaux clones par les tests classiques de prolifération, migration et blessure.

Résultats

1. Effet de l'expression de la GD3S synthétase dans les cellules MCF-7

Les résultats présentés dans ce premier chapitre montrent les effets de l'expression de la GD3S dans les cellules de cancer du sein MCF-7 de type « luminal A ». Pour analyser les conséquences de l'expression de la GD3S, nous avons tout d'abord exprimé stablement cette enzyme dans les cellules MCF-7 qui présentent un très faible niveau d'expression des transcrits de cette enzyme (Cazet *et al.*, 2009). Après trois semaines de sélection en présence de généticine, nous avons obtenu une population polyclonale de cellules résistantes. Cependant, les analyses en cytométrie de flux ont montré que cette population présentait un profil d'expression des gangliosides très hétérogène. Nous avons donc effectué une sélection clonale et sélectionné 43 clones qui ont été caractérisés par qPCR, cytométrie de flux, et microscopie confocale. Nous présentons ici les deux clones sur-exprimant le G_{D1b} et le G_{T3} à la surface cellulaire. L'expression des gangliosides des séries b et c- s'accompagne d'une diminution de l'expression des gangliosides de la série a, tels que le G_{M2} et le G_{M1} . Nous avons analysé les effets de l'expression de la GD3S sur la prolifération et la migration des cellules MCF-7 et démontré que les clones MCF-7 GD3S+ présentent une augmentation de migration sans modification de la prolifération.

L'analyse de la composition des gangliosides dans les clones MCF7 GD3S+ par spectrométrie de masse confirme que le G_{D1b} est le ganglioside majoritairement exprimé dans les cellules MCF-7. De plus, nous avons montré que ces cellules expriment une quantité importante de globosides par rapport aux cellules MDA-MB-231 GD3S+. Ces résultats montrent que la sur-expression de la GD3S induit un changement de profil des gangliosides dans les deux lignées cancéreuses mammaires testées ; par contre, le phénotype induit par l'expression de la GD3S est dépendant de la lignée cellulaire. Ces résultats ont été publiés en 2012 dans les *Comptes Rendus de Chimie*.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Comptes Rendus Chimie

www.sciencedirect.com



Full paper/Mémoire

Expression of G_{D3} synthase modifies ganglioside profile and increases migration of MCF-7 breast cancer cells

Agata Steenackers^{a,b,c,1}, Aurélie Cazet^{a,b,c,1}, Marie Bobowski^{a,b,c}, Yoann Rombouts^{a,b,c}, Jonathan Lefebvre^{a,d}, Yann Guérardel^{a,b,c}, David Tulasne^{a,d}, Xuefen Le Bourhis^{a,e}, Philippe Delannoy^{a,b,c,*}

^a University Lille Nord de France, 59000 Lille, France

^b USTL, UGSF, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

^c UMR CNRS 8576, Structural and Functional Glycobiology Unit, University of Sciences and Technologies of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

^d UMR 8161, CNRS, institut de biologie de Lille, institut Pasteur de Lille, 59021 Lille, France

^e USTL, Inserm U908, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2011

Accepted after revision 19 May 2011

Available online 24 June 2011

Keywords:

Gangliosides

G_{D3} synthase

Breast cancer

C-Met

MCF-7

ABSTRACT

B- and c-series of gangliosides are over-expressed in neuro-ectoderm-related cancers, including breast cancer. It has been shown that G_{D3} ganglioside is over-expressed in about 50% of invasive ductal breast carcinoma and the G_{D3} synthase (GD3S) gene displays higher expression among estrogen receptor (ER) negative breast tumors. We previously showed that GD3S expression in MDA-MB-231 breast cancer cells induces the expression of G_{D2} and increased cell proliferation and migration via a G_{D2}-dependent activation of c-Met receptor. Here, we show that in ER-positive MCF-7 breast cancer cells, GD3S expression resulted in an increase of G_{D1b}, which was associated with a decrease of G_{M1a} and G_{M2}. Meanwhile, GD3S expressing MCF-7 cells exhibited an increased migration without any modification of proliferation rate. Therefore, GD3S expression can result in different modifications of both ganglioside profiles and cell phenotypes depending on breast cell types.

© 2011 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

R É S U M É

Les gangliosides des séries b- et c- sont surexprimés dans différents cancers d'origine neuro-ectodermique, dont le cancer du sein. Il a été montré que le ganglioside G_{D3} est surexprimé dans environ 50 % des carcinomes canauxaux infiltrants et le gène de la G_{D3} synthétase (GD3S) est surexprimé dans les tumeurs estrogène-récepteur négatives. Nous avons précédemment démontré que l'expression de la GD3S dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 induisait l'expression du G_{D2} et augmentait la

Abbreviations: β3Gal T4, GM1a/GD1b synthase; β4GalNAc T1, GM2/GD2 synthase; BSA, Bovine Serum Albumin; Cer, ceramide; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; EDTA, Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid; EGFR, Epithelial Growth Factor Receptor; ER, Estrogen Receptor; ERK, Extracellular Signal-Regulated Kinase; FBS, Fetal Bovine Serum; FITC, Fluorescein Isothiocyanate; GD3S, GD3 synthase; GSL, glycosphingolipid; HPRT, Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase; LacCer, Lactosylceramide; mAb, monoclonal Antibody; MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption-ionization time-of-flight; MEK, Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase/ERK kinase; MTS, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; PBS, Phosphate Buffered Saline; PI3K, Phosphoinositide-3 Kinase; PR, Progesterone Receptor; QPCR, Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction; RTK, Receptor Tyrosine-Kinase; SDS-PAGE, Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; ST3Gal V, GM3 synthase; ST8Sia I, GD3 synthase; ST8Sia V, GT3 synthase.

* Corresponding author.

E-mail address: philippe.delannoy@univ-lille1.fr (P. Delannoy).

¹ The two first authors have equally participated to this work.

prolifération et la migration cellulaires par l'activation G_{D2} -dépendante du récepteur c-Met. Nous montrons ici que l'expression de la GD3S dans les cellules MCF-7 provoque une accumulation du G_{D1b} associée à une diminution du G_{M1a} et du G_{M2} . Parallèlement, les cellules MCF-7 GD3S positives montrent une augmentation de migration sans modification de la prolifération. Ce résultat montre que les modifications du profil gangliosidique et du phénotype induites par l'expression de la GD3S sont dépendantes du type cellulaire.

© 2011 Académie des sciences. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

1. Introduction

Gangliosides, the GSL carrying one or more sialic acid residues, are essentially located in the outer part of the plasma membrane in microdomains named “glycosynapses”, where they can interact with transmembrane receptors or signal transducers involved in cell proliferation and intracellular signaling [1,2].

GSL from ganglio-series are usually classified in four series according to the presence of 0 to 3 sialic acid residues linked to LacCer: β -Galp-(1→4)- β -GlcP-Cer (LacCer, G_{A3}). The transfer of sialic acid residues is catalyzed in the Golgi apparatus by specific sialyltransferases (namely G_{M3} synthase, GD3S and G_{T3} synthase, respectively) that exhibit a high specificity toward their respective glycolipid substrates [3]. Thus, G_{A3} , G_{M3} (α -Neup5Ac-(2→3)- β -Galp-(1→4)- β -GlcP-Cer), G_{D3} (α -Neup5Ac-(2→8)- α -Neup5Ac-(2→3)- β -Galp-(1→4)- β -GlcP-Cer) and G_{T3} (α -Neup5Ac-(2→8)- α -Neup5Ac-(2→8)- α -Neup5Ac-(2→3)- β -Galp-(1→4)- β -GlcP-Cer) initiate 0-, a-, b- and c-series gangliosides and the biosynthesis of these compounds determines 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 corresponding sialyltransferases, and the expression of b- and c- series gangliosides is strictly controlled by ST8Sia I, also named GD3S. Afterwards, further monosaccharides, including GalpNAc, Galp and Neup5Ac, can be transferred in a stepwise manner by other glycosyltransferases [4].

Normal human tissues usually express a-series gangliosides, mainly G_{M1a} , whereas complex gangliosides from b- and c-series are essentially found during embryogenesis, in developing tissues and are mostly restricted to the nervous system in adult [5]. Complex gangliosides expression also increases in different pathological conditions including cancers, such as melanoma [6], neuroblastoma [7], or small cell lung carcinoma [8]. In particular, disialogangliosides (G_{D3} and G_{D2}) play a key role in proliferation and migration of neuro-ectoderm-derived tumor cells [9] and are used as targets for development of anti-cancer vaccines [10]. In breast cancer, G_{D3} and 9-O-acetyl- G_{D3} are over-expressed in about 50% of invasive ductal carcinoma [11] and *ST8SIA1*, the gene that encodes GD3S, displays higher expression among ER negative breast cancer tumors [12,13]. We have previously shown that GD3S expression in the ER-negative MDA-MB-231 cells results in the accumulation of b- and c- series gangliosides [14] and mass spectrometry analysis of permethylated GSL has shown that G_{D2} is the main

ganglioside expressed at the cell surface of MDA-MB-231 GD3S+ clones (unpublished data). The expression of G_{D2} is associated with an increased cell migration and with a proliferative phenotype of MDA-MB-231 GD3S+ clones in absence of serum or exogenous growth factors [14]. We have also shown that the proliferative capacities of MDA-MB-231 GD3S+ clones in serum-free conditions directly proceed from the specific and constitutive activation of c-Met receptor and the downstream MEK/ERK and PI3 K/Akt signaling pathways [15]. Moreover, GD3S expression also stimulates primary tumor growth in severe immunodeficient mice [15]. Here, we describe the effect of GD3S expression in MCF-7 cells, a usual model of ER-positive breast cancer cells in culture. We show by mass spectrometry that the MCF-7 GD3S+ cells accumulate di- and trisialogangliosides, mainly G_{D1b} . Moreover, the MCF-7 GD3S+ clones showed an increased migration without any change in proliferation compared to control cells.

2. Material and methods

2.1. Antibodies and reagents

Anti- G_{M3} GMR6 (mouse IgM) and anti- G_{D2} (mouse IgG3) S220-51 mAbs were purchased from Seikagaku Corp. (Tokyo, Japan). Anti- G_{D3} R24 mAb was purchased from AbCam (Cambridge, UK). Anti- G_{D1b} GGR12 mAb (mouse IgG2b) [16] was kindly provided by Pr. Ronald L. Schnaar (Depart. of Pharmacology and Neuroscience, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA). Anti- G_{T3} A2B5 mAb [17] was kindly provided by Pr. Jacques Portoukalian (Depart. of Transplantation and Clinical Immunology, Claude Bernard University and Edouard Herriot Hospital, Lyon, France). FITC-conjugated cholera toxin B-subunit from *Vibrio cholerae* was from Sigma-Aldrich (Lyon, France) and FITC-conjugated sheep anti-mouse IgG was from GE Healthcare (Templemars, France). Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L), Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgM and FITC-conjugated anti-mouse IgM were purchased from Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Mouse mAb directed against the cytoplasmic region of human c-Met was purchased from Invitrogen, and rabbit polyclonal antibody against phosphorylated tyrosine 1234 and 1235 of the c-Met kinase domain was purchased from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti-rabbit and anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase were purchased from GE Healthcare.

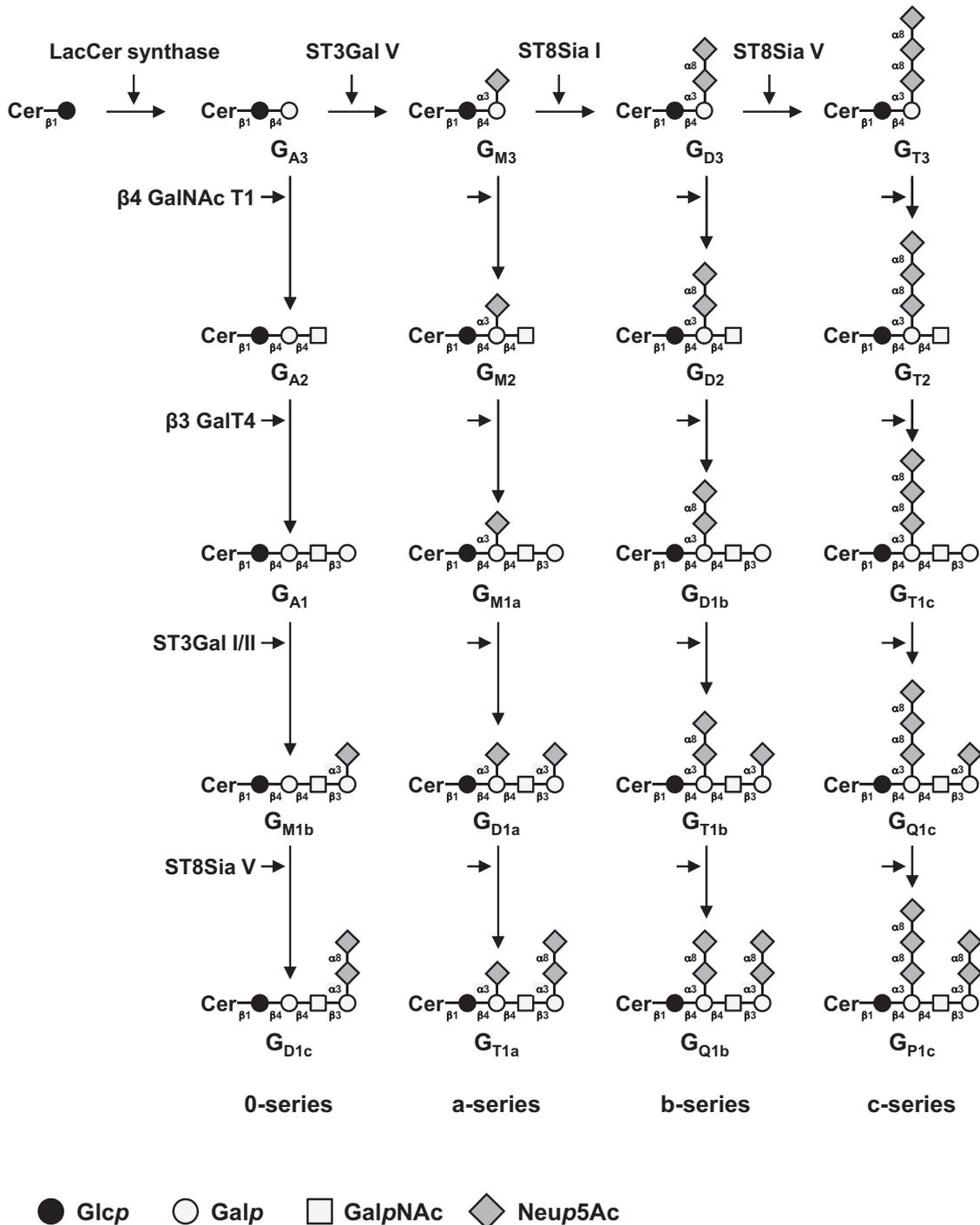


Fig. 1. Biosynthesis of gangliosides. The action of ST3Gal V (G_{M3} synthase), ST8Sia I (G_{D3} synthase) and ST8Sia V (G_{T3} synthase) leads to the biosynthesis of the precursors of a-, b- and c-series gangliosides, respectively. The 0-series gangliosides are directly synthesized from lactosylceramide (G_{A3}). Elongation is performed by the sequential action of N-acetyl-galactosaminyltransferase ($\beta 4$ GalNAc T1), galactosyltransferase ($\beta 3$ Gal T4) and sialyltransferases (ST3Gal I, ST3Gal II and ST8Sia V). Cer: ceramide; LacCer: lactosylceramide.

2.2. Cell culture

The breast cancer cell line MCF-7 and the melanoma cell line SK-Mel 28 were obtained from the American Type

Cell Culture Collection. Cell culture reagents were purchased from Lonza (Levallois-Perret, France). Cells were routinely grown in monolayer and maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, in DMEM supplemented with

10% FBS, 2 mM L-glutamine, and 100 units/mL penicillin-streptomycin. MCF-7 control (empty vector transfected) and MCF-7 GD3S+ clones #1 and #4 were cultured in the presence of 1 mg/mL G418 (Invitrogen).

2.3. Stable transfection

The pcDNA3-GD3S expression vector encoding the full-length human G_{D3} synthase [18] was obtained from Pr. C.H. Kim (Molecular and Cellular Glycobiology Unit, Department of Biological Science, SungKyunKwan University, Suwon, Korea). Transfections were performed by electroporation using the Nucleofection technology according to Amaxa Biosystem protocol (Lonza). Briefly, 2×10^6 cells were resuspended in 100 μ L of Cell Line Nucleofector™ Solution V and cell suspension was mixed with 2 μ g of pcDNA3 or pcDNA3-GD3S vector. The sample was transferred into an electroporation cuvette and transfection was performed using the program E-014 according to manufacturer's instructions. After nucleofection, cells were transferred into prewarmed complete DMEM medium and maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO_2 . After 48 h, the transfected cells were cultured in the presence of 1 mg/mL G418 (Invitrogen). After 21 days of culture in the selective medium, individual G418-resistant colonies were isolated by limit dilution. Two positive clones (#1 and #4), expressing GD3S and complex gangliosides, as determined by real-time PCR and flow cytometry analysis, respectively, were used for further study.

2.4. Extraction and preparation of glycolipids

20 dishes (10 cm diameter) of cultured cells were washed twice with ice-cold PBS and cells were scraped and homogenized. Cells were suspended in 200 μ L of water and sonicated on ice. The resulting material was dried under vacuum and sequentially extracted by $CHCl_3/CH_3OH$ (2:1, v/v), $CHCl_3/CH_3OH$ (1:1, v/v) and $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ (1:2:0.8, v/v/v). Supernatants were pooled, dried and subjected to a mild saponification in 0.1 M NaOH in $CHCl_3/CH_3OH$ (1:1) at 37 °C for 2 h and then evaporated to dryness [19]. Samples were reconstituted in CH_3OH/H_2O (1:1, v/v) and applied to a reverse phase C_{18} cartridge (Waters, Milford, MA) equilibrated in the same solvent. After washing with CH_3OH/H_2O (1:1, v/v), GSLs were eluted by CH_3OH , $CHCl_3/CH_3OH$ (1:1, v/v) and $CHCl_3/CH_3OH$ (2:1, v/v).

2.5. Mass spectrometry analysis of GSL

Prior to mass spectrometry analysis, GSL were permethylated according to Ciucanu and Kerek [20]. Briefly, compounds were incubated 2 h in a suspension of 200 mg/mL NaOH in dry DMSO (300 μ L) and CH_3I (200 μ L). The methylated derivatives were extracted in $CHCl_3$ and washed several times with water. The reagents were evaporated and the sample was dissolved in $CHCl_3$ in the appropriate dilution. MALDI-MS and MS/MS analyses of permethylated GSL were performed on 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)

mass spectrometer, operated in the reflectron mode. For MS acquisition, 5 μ L of diluted permethylated samples in $CHCl_3$ were mixed with 5 μ L of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL dissolved in $CHCl_3/CH_3OH$ (1:1, v/v)). The mixtures (2 μ L) were then spotted on the target plate and air-dried. MS survey data comprises a total of 50 subspectra of 1500 laser shots. Peaks observed in the MS spectra were selected for further MS/MS. CID MS/MS data comprises a total of 100 subspectra of 3000 laser shots. Two or more spectra can be combined postacquisition with mass tolerance set at 0.1 Da to improve S/N ratio. The potential difference between the source acceleration voltage and the collision cell was set to 1 kV and argon was used as collision gas.

2.6. Analysis of cell surface ganglioside by flow cytometry

Cells were washed in cold PBS and detached by EDTA 4 mM. Cells were incubated at 4 °C during 1 h with anti-ganglioside mAbs: anti- G_{M3} GMR6 (1:75), anti- G_{D3} R24 (1:100), anti- G_{D2} S220-51 (1:100), anti- G_{D1b} GGR12 (1:100) and anti- G_{T3} A2B5 (1:10), diluted in PBS containing 0.5% PBS-BSA (Sigma-Aldrich). After washing with PBS-BSA, cells were incubated on ice during 1 h with FITC-conjugated anti-mouse IgM or IgG. To analyze G_{M1a} expression, cells were incubated with a FITC-conjugated cholera toxin B-subunit (1:1000). Control experiments were performed using secondary antibody alone. Cells were analyzed by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson).

2.7. Analysis of ganglioside by confocal microscopy

Cells were cultured on glass coverslips in DMEM supplemented with 10% FBS. After 24 h, cells were washed twice in PBS and fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 20 min at room temperature. After washing with PBS, cells were blocked in PBS-BSA 0.2% for 30 min. Cells were incubated for 1 h at room temperature with anti- G_{D3} R24 (1:100), anti- G_{D2} S220-51 (1:100), anti- G_{D1b} GGR12 (1:100) and anti- G_{T3} A2B5 (1:10), diluted in PBS-BSA. Cells were then washed three times in PBS-BSA and incubated with Alexa Fluor® 488 anti-IgG or anti-IgM (1 h at room temperature; dilution 1:2000 in PBS-BSA). After three washes in PBS-BSA, PBS and deionised water, cells were mounted in Mowiol. Stained slides were examined under a Leica SP5 spectral microscope (IRI CNRS USR 3078, Villeneuve d'Ascq, France) with a 63X oil immersion lens at room temperature. Data were therefore collected using the LAS 6000 AF software.

2.8. Quantitative real-time-PCR (QPCR) analysis of G_{D3} synthase

Total RNA was extracted using the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel, Hoerd, France), quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientifics, Wilmington, USA) and the purity of the preparation was checked by ratio of the absorbance at 260 and 280 nm. The cDNA was synthesized using 2 μ g of RNA (GE Healthcare). PCR primers for GD3S and HPRT were previously described

[14,21] and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). PCR reactions (25 μ L) were performed using 2X SYBR[®] Green Universal QPCR Master Mix (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands), with 2 μ L of cDNA solution and 300 nM final concentration of each primer. PCR conditions were as follows: 95 °C for 30 s, 51 °C for 45 s, 72 °C for 30 s (40 cycles). Assays were performed in triplicate and GD3S transcript expression level was normalized to HPRT using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method described by Livak and Schmittgen [22]. Serial dilutions of the appropriate positive control cDNA sample were used to create standard curves for relative quantification and negative control reactions were performed by replacing cDNA templates by sterile water.

2.9. Proliferation assays

Control and clones cells (2×10^3) were seeded in 96-well plates (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) and grown in DMEM containing 5, 1, 0.5% FBS, or in FBS-free medium. Cell growth was analyzed at different times using the MTS reagent (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) according to the manufacturer's instructions.

2.10. Cell migration analysis

Cells (5×10^4) were seeded in the upper surface of Transwell 12 plates (BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France) and cultured for 24 h in 10% FBS-containing medium. After incubation, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (20 min at room temperature) and stained with Hoescht 33528 (Sigma-Aldrich) during 20 min in the dark at room temperature. Then, the upper chamber of the well's porous membrane was removed by scraping with a cotton swab and washed several times with PBS. The membrane was mounted on slide with Glycergel mounting medium (Dako, Trappes, France). The migrating cells were counted on the overall membranes under $\times 200$ magnification and the mean number of cells was evaluated in three independent experiments.

2.11. Immunodetection of *c-Met* and phospho-*c-Met*

Cell pellets were treated with lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1% Triton X-100, 1 mM sodium orthovanadate, and protease inhibitor cocktail tablet). The supernatants were assessed for protein concentration using the Bio-Rad DC protein assay kit II. One hundred microgram of total proteins were subjected to SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes were saturated in TBS containing 5% BSA and 0.05% Tween-20. Membranes were then incubated with blocking buffer (0.2% casein, 0.1% Tween-20 in PBS) for 1 h and probed for 1 h at room temperature with appropriate antibodies diluted in blocking buffer according to the manufacturer's recommendations. After washing in PBS-Tween 0.2%, immune complexes were detected with specific secondary antiserum conjugated with alkaline phosphatase followed by an enhanced chemiluminescence detection system (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents).

2.12. Statistical analyses

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

3. Results

3.1. Establishment of GD3S+ MCF-7 breast cancer cells

MCF-7 cells were transfected with the pcDNA3-GD3S expression vector containing the full-length cDNA of human GD3S or the empty pcDNA3 vector as control. Transfected cells were cultured 21 days in the presence of 1 mg/mL G418. As previously shown [14], QPCR analysis of GD3S expression (Fig. 2A) indicates that GD3S mRNA is expressed at a very low level in wild-type and control (empty vector transfected) MCF-7 cells compared to SK-Mel 28 melanoma cells used as positive control for GD3S expression [23]. Meanwhile, GD3S expression was significantly increased in pcDNA3-GD3S transfected MCF-7 cell population. Flow cytometry analysis of gangliosides in both control and pcDNA3-GD3S transfected cells shows that GD3S stable transfectants do not express G_{D3} or G_{D2} and only a low percentage of cells (about 15%) expresses G_{D1b} concomitantly with a decrease of G_{M1a} expression, a larger proportion of cells being recognized by the anti- G_{T3} A2B5 mAb (Fig. 2B).

Given the fact that the pcDNA3-GD3S transfected cell population was heterogenous, individual G418-resistant colonies were isolated by limiting dilution cloning. Forty-three different clones were obtained and analyzed for the expression of GD3S and gangliosides. Positive clones for G_{D1b} and G_{T3} expression were selected and two of them, clones #1 and #4, were used for this study. The pattern of gangliosides was monitored in the two clones by flow cytometry using different anti-ganglioside mAbs. As shown in Fig. 3A, the two selected clones expressed high levels of G_{D1b} and G_{T3} . In contrast, G_{M1a} expression level was reduced (Fig. 3A). G_{D1b} expression appeared to be slightly higher in clone #1 than in clone #4. Control cells showed no change in the ganglioside profile compared with wild-type MCF-7 (data not shown). Finally, immunofluorescence and confocal microscopy confirmed that G_{D1b} and G_{T3} were expressed at the cell surface of both clones (Fig. 3B).

3.2. Mass spectrometry analysis of GD3S+ MCF-7 cells GSL composition

In order to confirm the modifications in gangliosides composition observed by flow cytometry analysis in MCF-7 GD3S+ cells, we compared the GSLs profiles from control and GD3S+ MCF-7 cells by MALDI-TOF-MS and MALDI-TOF-MS/MS sequencing (Figs. 4 and 5). The total glycolipids were extracted and subjected to mild alkalinolysis. GSLs were further purified on reversed-phase C_{18} column and analyzed by mass spectrometry as permethylated derivatives. As shown in Fig. 4, the MALDI-MS analysis revealed that MCF-7 cells expressed a complex pattern of GSLs. Individual signals were identified by calculating

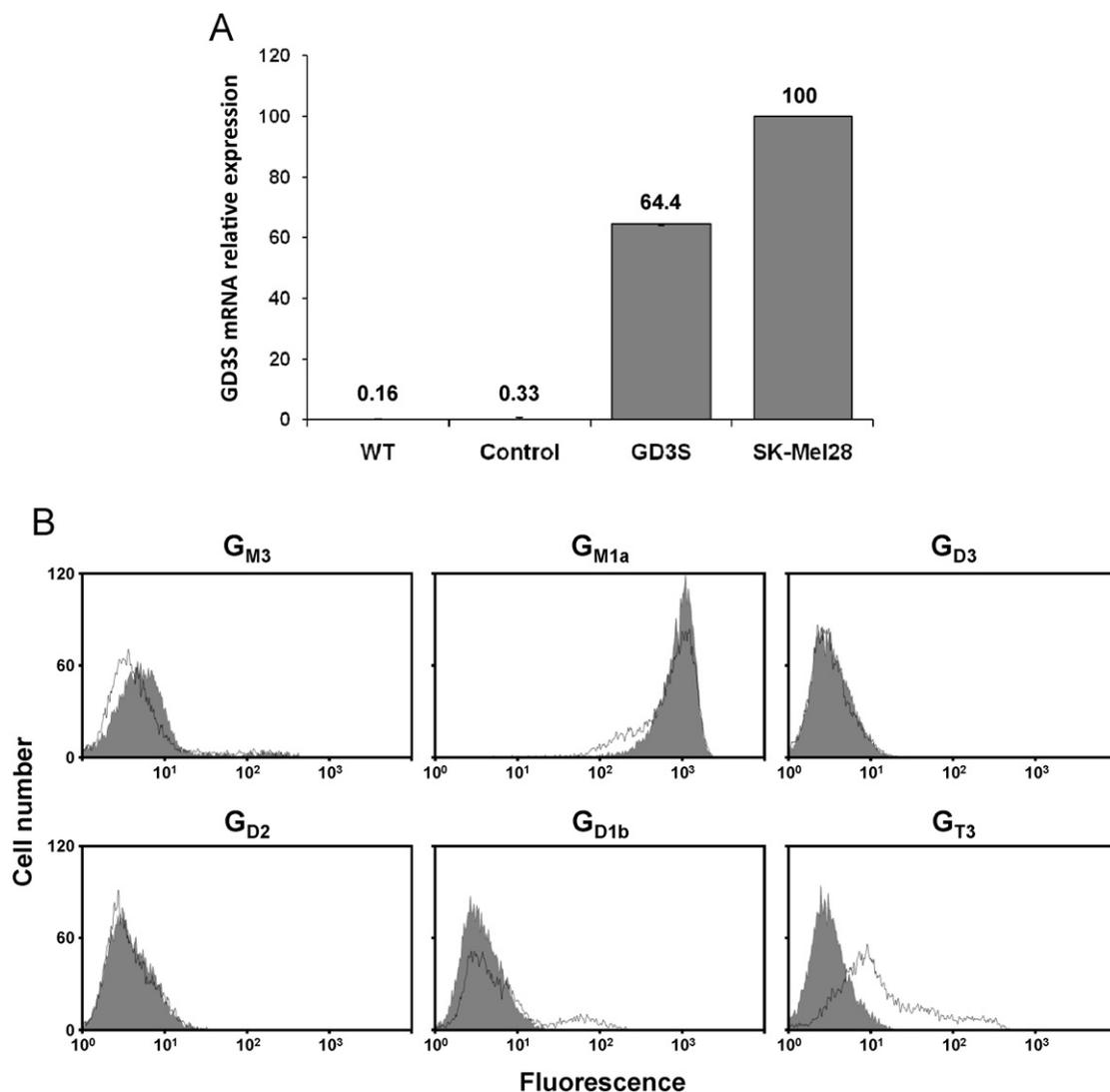


Fig. 2. A: QPCR analysis of GD3S mRNA in pcDNA3-GD3S transfected MCF-7 cell population. Results were normalized to the expression of HPRT mRNA and expressed relative to GDS3 mRNA in SK-Mel 28 melanoma cells, which was regarded as 100%. The quantification was performed by the method described by Livak and Schmittgen [22]. WT: MCF-7 wild-type; Control: empty vector transfected MCF-7; GD3S: pcDNA3-GD3S transfected MCF-7. B: Flow cytometry analysis of gangliosides expression in pcDNA3-GD3S transfected MCF-7 cell population. The immunodetection of G_{M3} , G_{D3} , G_{D2} , G_{D1b} , G_{T3} and G_{M1a} was performed using GMR6, R24, S220-51, GGR12, A2B5 mAbs and cholera toxin B-subunit from *Vibrio cholerae*, respectively. The grey peaks correspond to control MCF-7 cells (empty vector transfected) and black lines correspond to pcDNA3-GD3S transfected MCF-7 cells.

monosaccharide and Cer compositions and by establishing monosaccharide sequences by MALDI-TOF-MS/MS fragmentation. Then, the final attribution of individual GSLs to existing series was based on the known biosynthetic pathways of GSLs in human cells. Altogether, the data established that MCF-7 cells expressed GSLs from the globo- and the ganglio-series. Each GSL, irrespective of their series, were identified as two distinct signals exhibiting 112 mu differences, which established that they are substituted by two Cer moieties differing by eight $-CH_2-$ groups. Indeed, two Cer isoforms are usually expressed in human tissues due to the substitution of the sphingosine by palmitic acid C16:0 or lignoceric acid C24:0. Globo-series GSLs were characterized by the presence of simple G_{b3} and G_{b4} at m/z 1215/1327 and

1460/1572, respectively. Ganglio-series GSLs were characterized by the presence of a single neutral G_{A1} at m/z 1215/1327, monosialylated G_{M2} and G_{M1} at m/z 1616/1728 and 1821/1933, as well as disialylated at m/z 2182/2294. MS/MS fragmentation of individual signals allows one to differentiate isobaric molecules such as G_{b4}/G_{A1} and G_{M1a}/G_{M1b} (data not shown). It is noteworthy that the MS/MS sequencing established that the disialylated G_{D1} expressed in empty vector-transfected MCF-7 cells was exclusively constituted by the a-series ganglioside. Indeed, the intense B- and C-cleavage ions at m/z $[M + Na]^+$ 847 and 620 unambiguously established that the terminal Gal residue of the Hex-HexNAc motif was monosialylated (Fig. 5B). Accordingly to the attribution as G_{D1a} , Y-cleavage ion at m/z $[M + Na]^+$ 1469 and the Y2 α /C5 double cleavage ion at m/z

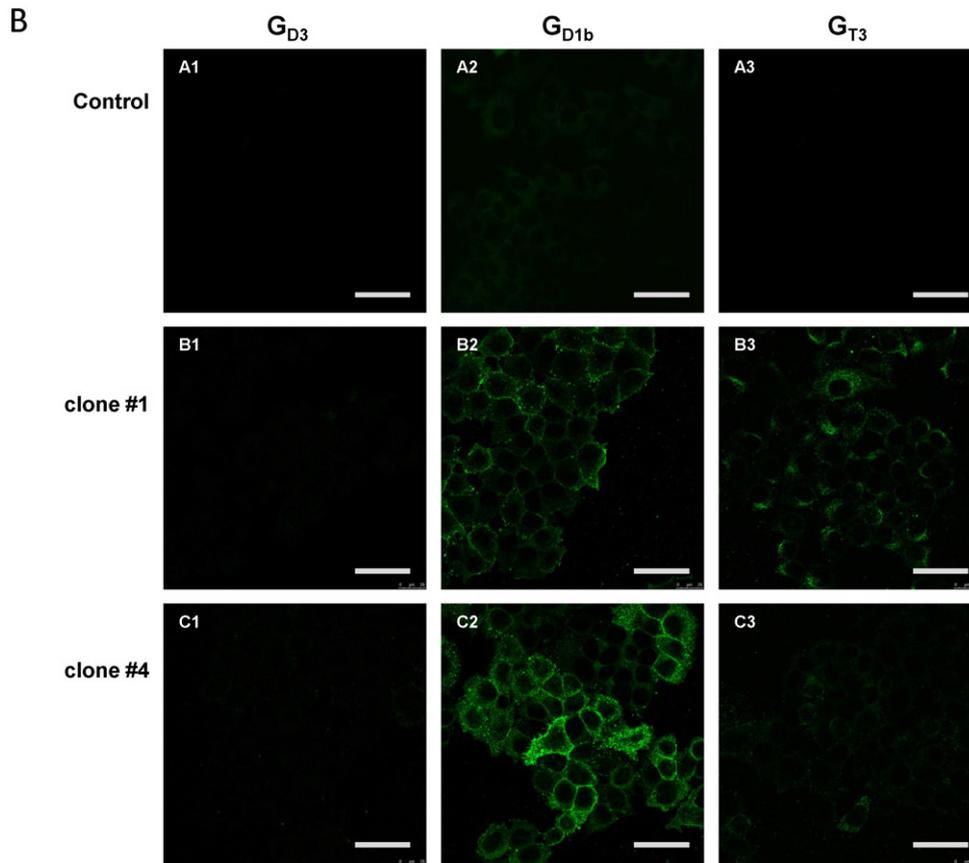
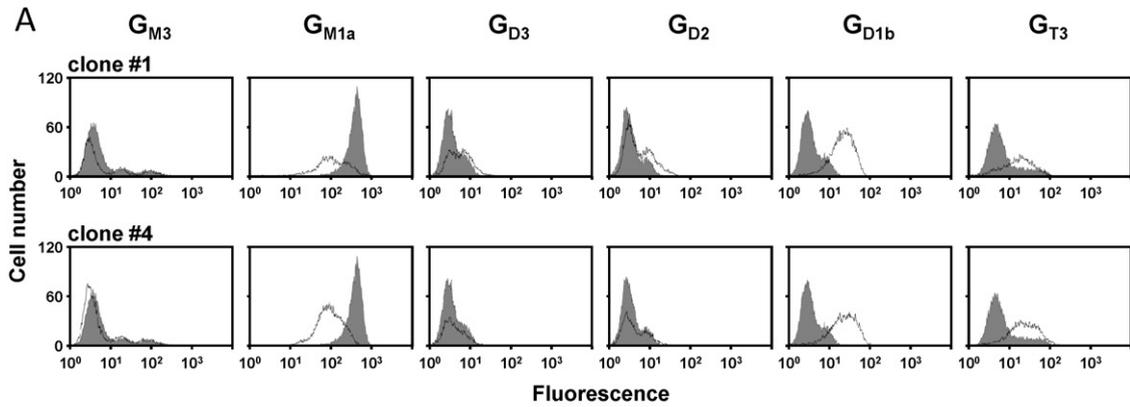


Fig. 3. Analysis of the expression of gangliosides in MCF-7 clones. A: flow cytometry analysis of ganglioside expression. Gangliosides G_{M3} , G_{D3} , G_{D2} , G_{D1b} , and G_{T3} were revealed with anti- G_{M3} GMR6, anti- G_{D3} R24, anti- G_{D2} S220-51, anti- G_{D1b} GGR12, and anti- G_{T3} A2B5 mAbs, respectively. G_{M1a} expression was analyzed with FITC-labeled cholera toxin B from *Vibrio cholerae*. The grey peaks correspond to control MCF-7 cells, whereas black lines correspond to MCF-7 GD3S+ cells. Results are representative of three independent experiments. B: Analysis of ganglioside expression at the membrane surface MCF-7 cells by immunocytochemistry and confocal microscopy. Ganglioside were revealed with anti- G_{D3} R24 (A1, B1, C1), anti- G_{D1b} GGR12 (A2, B2, C2) or anti- G_{T3} A2B5 (A3, B3, C3) mAbs and anti-mouse IgM or anti-mouse IgG labeled with Alexa 488. Bars: 50 μ m.

810 [M + Na]⁺ confirmed that Galp-(1→4)- β -Glc p disaccharide was also mono-sialylated.

As expected, the gangliosides profiles of MCF-7 GD3S+ clones established by MALDI-MS significantly differed from those of the wild-type (data not shown) and empty vector-transfected MCF-7 (control) cells (Fig. 4). Indeed,

whereas MCF-7 cells expressed simple a-series gangliosides including G_{M2} , G_{M1a} and G_{D1a} , GD3S+ clones accumulated di-, tri- and tetra-sialylated gangliosides of higher complexity including G_{D3} , G_{D2} , G_{D1} , G_{T2} , G_{T1} and G_{Q1} . In parallel, monosialylated gangliosides totally disappeared in MCF-7 GD3S+ cells compared to control cells.

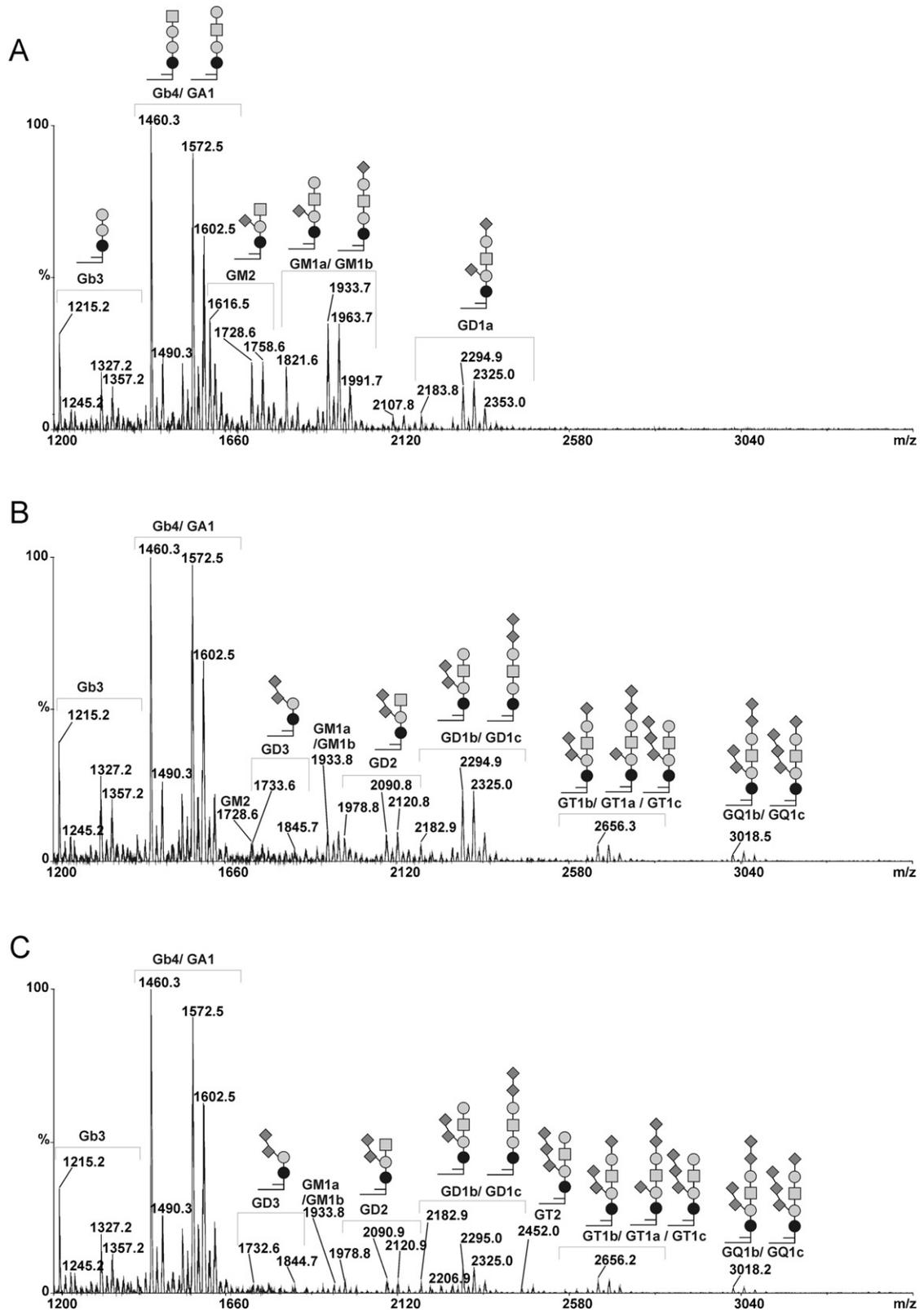


Fig. 4. MALDI-TOF-MS profiles of permethylated GSLs from control and GD3+ MCF-7 cells. Mass Spectra of permethylated GSLs isolated from control MCF-7 transfected with empty vector (A), GD3+ MCF-7 cells clone #1 (B) and clone #4 (C). Gangliosides from b- or c-series were not detected in control cells, whereas complex gangliosides containing 2 to 4 sialic acids residues (i.e. GD₃, GD₂, GD_{1b}, GT₂, GD₃, GT_{1b/c}, GQ_{1b/c}) were detected in GD3S+ MCF-7 cells. ● Galp; ◻ GalpNAc; ◆ Neup5Ac; ▭ Ceramide.

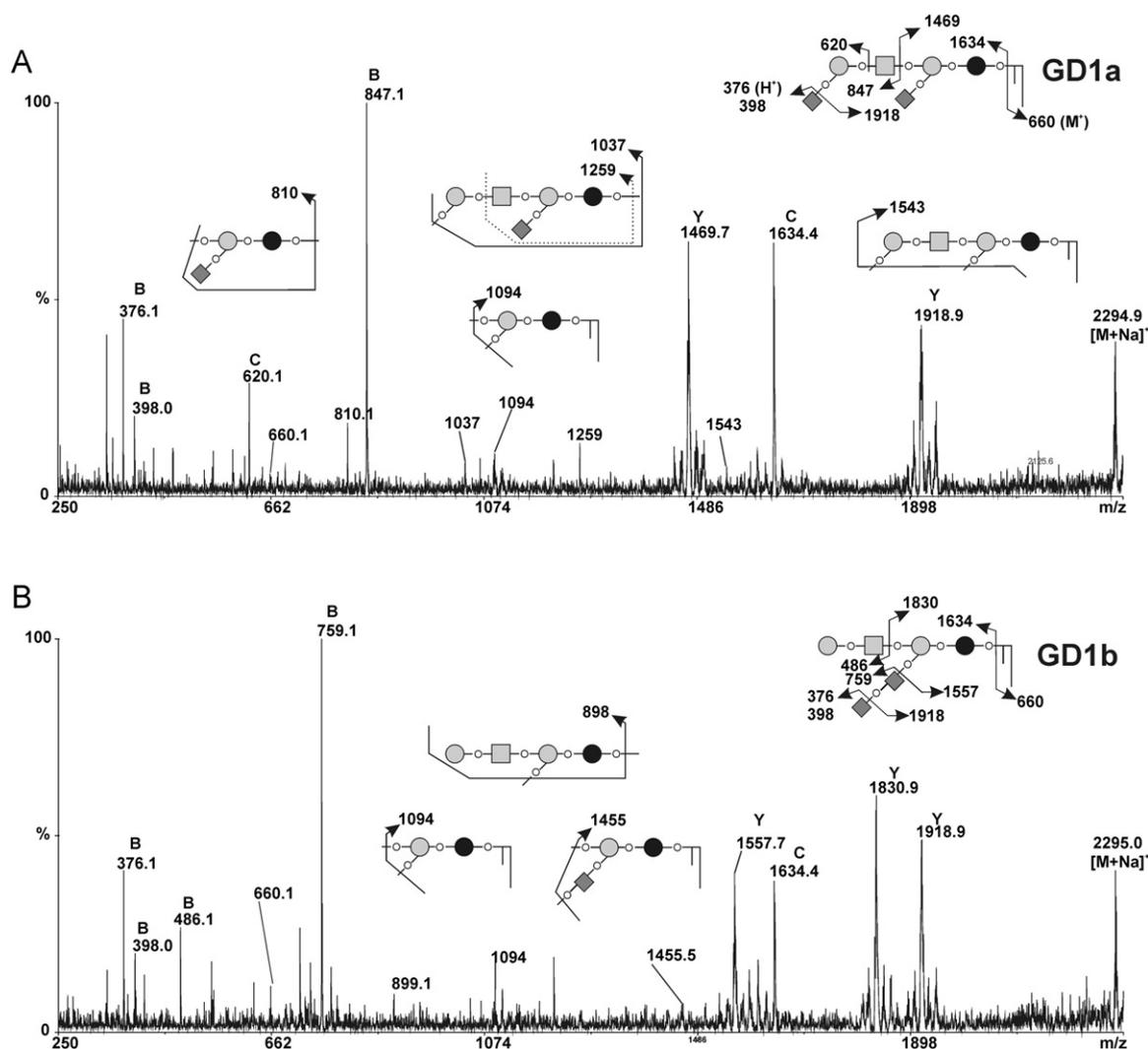


Fig. 5. MALDI-MS/MS sequencing of the permethylated gangliosides from control and GD3S+ MCF-7 cells. MALDI-MS/MS spectra of the $[M + Na]^+$ molecular ion m/z 2495 corresponding to permethylated G_{D1} gangliosides in MCF-7 transfected with empty vector (A) and GD3S+ MCF-7 clone #1 (B). Fragment ions were annotated according to nomenclature of Domon and Costello [31]. All molecules are detected as $[M + Na]^+$ ions with the exception of those into brackets {}. The fragmentation profiles of permethylated G_{D1} ganglioside typifies G_{D1a} in control MCF-7 cells and G_{D1b} in GD3S+ MCF-7 clones. The C/Z couple fragment ions at m/z 1634 $[M + Na]^+$ and 660 $[M + H]^+$ typify the ceramide moiety as sphingosine C18:1 substituted by lignoceric acid C24:0. ● Glcp; ○ Galp; □ GalpNAc; ◆ Neup5Ac; ¶ Ceramide.

Then, MS/MS fragmentation analysis of individual compounds in MCF-7 GD3S+ cells established that all GSLs are b- and c-series, which permitted to precisely identify G_{D1b} , $G_{T1b/c}$ and $G_{Q1b/c}$. In particular, comparison of the fragmentation patterns of G_{D1} signals from control MCF-7 cells and GD3S+ clones revealed that G_{D1} isolated from GD3S+ cells exclusively contained the b-series isomer whereas control MCF-7 cells only contained the a-series isomer (Fig. 5B). The presence of the di-sialylated motif on the lactose moiety typifying b-series was unambiguously established by the presence of Y/B couple cleavage ions at m/z 1830/486 and B ion at m/z 759.

3.3. Growth and migration of GD3S+ MCF-7 cells

Cell growth was determined by MTS assay in culture media containing decreasing concentrations of FBS. As

shown in Fig. 6A, no difference in cell growth was observed between control and GD3S+ cells. Similar result was obtained with wild-type MCF-7 cells (data not shown). In all cases, cell proliferation decreased with serum concentration. Similar result was obtained by direct cell counting experiments (data not shown). Interestingly, cell migration assay using Transwell Boyden chambers showed that GD3S expression induced twice as much cell migration to the bottom chamber compared to control cells (Fig. 6B).

3.4. Immunodetection of c-Met and phospho-c-Met in MCF-7 GD3S+ clones

The expression and phosphorylation of c-Met were analyzed in control and MCF-7 GD3S+ clones by Western blotting and immunodetection using anti-c-Met and anti-phospho-c-Met antibodies directed against phosphorylat-

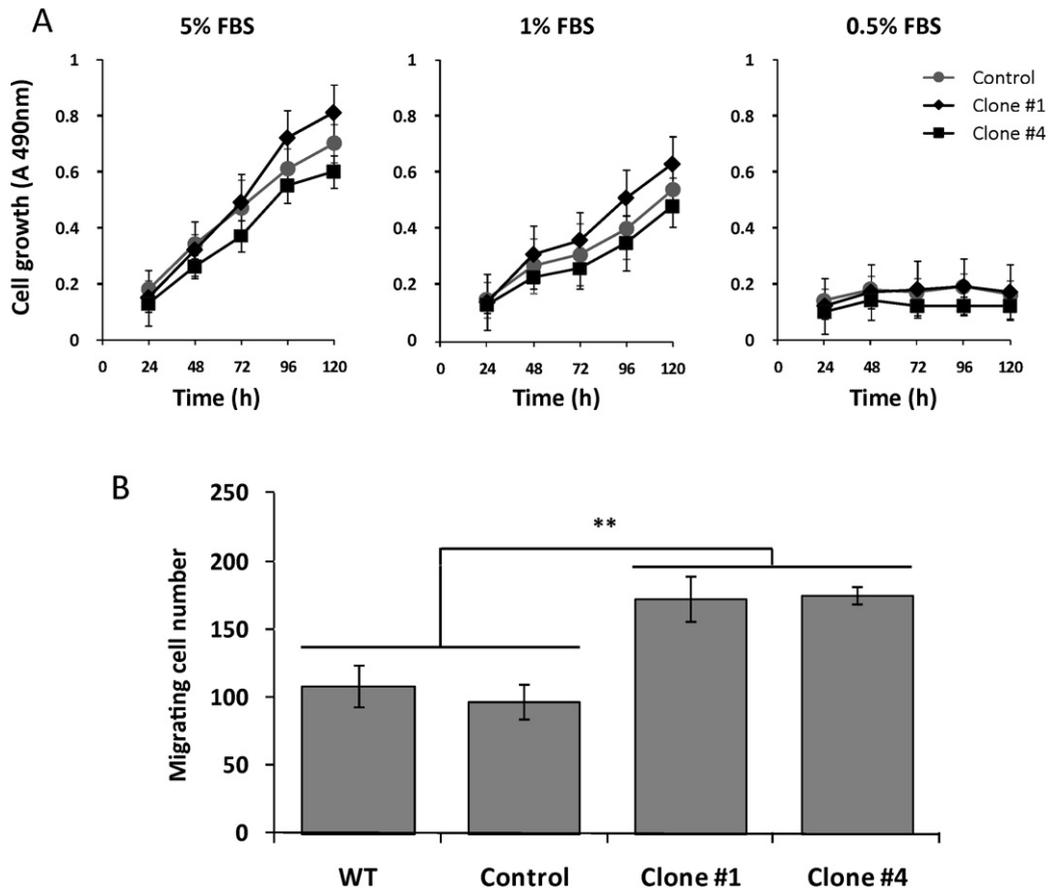


Fig. 6. Analysis of the effect of GD3S expression on MCF-7 cell proliferation and migration. A: Proliferation assays were performed by MTS in 96-wells plates and cells were grown in DMEM supplemented with 5, 1 or 0.5% FBS. Cells were counted after 24, 48, 72, 96 and 120 h. Each measure was performed in 16 wells and data are mean of four independent manipulations. ●: control cells; ◆: clone #1; ■: clone #4. B: Transwell cell migration analysis. Cells were counted after 24 h of culture in DMEM medium supplemented with 1% FBS. ** $p < 0.02$.

ed tyrosine residues 1234 and 1235 of the receptor. As shown in Fig. 7, c-Met was detected at the same expression level in both control and GD3S+ clones (Fig. 7). Phosphorylation of c-Met was revealed neither in control nor in untreated GD3S+ clones, while HGF/SF induced efficient Met phosphorylation in MCF7 cells (Fig. 7).

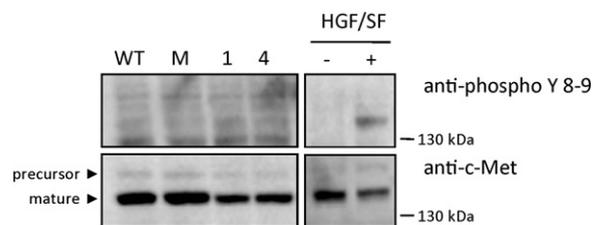


Fig. 7. Western blot analysis using specific c-Met and phospho-c-Met antibodies. Untransfected MCF-7 (WT), control MCF-7 transfected with empty vector, GD3S+ MCF-7 cells clone #1 and clone #4 were cultured in serum free condition. Untransfected MCF-7 (WT) were treated or not 15 min with 30 ng/ml HGF/SF. Cell lysates were analyzed by Western blotting with antibodies directed against human c-Met and the phosphorylated tyrosine residues of the c-Met kinase domain. The positions of molecular weight markers are indicated. Arrowheads indicate the positions of precursor and mature c-Met.

4. Discussion

Recent evidences have proposed that GD3S could be associated with breast cancer development and aggressiveness. Clinical studies using breast tumors microarray datasets have shown that the GD3S gene (*ST8SIA1*) displayed higher expression among ER negative tumors [12]. *ST8SIA1* expression is associated with poor histopathological grading and tumor size in ER negative tumors [12,13]. We have also recently showed that *ST8SIA1* expression is significantly higher in the basal-subtype [24] breast cancer tumors [15], indicating that GD3S could be over-expressed in aggressive breast cancer tumors. However, in comparison with tumors, breast cancer cells do not express complex gangliosides from b- and c-series in culture conditions [14]. To analyze the effect of GD3S expression in breast cancer, we have established and characterized cellular models deriving from two breast cancer cell lines: the triple negative (ER-, PR- and Her2-) basal-subtype MDA-MB-231 and the luminal-A subtype ER+ MCF-7 breast cancer cells, that both express GD3S. We have shown that MDA-MB-231 GD3S+ clones exhibit a proliferative phenotype in absence of serum or growth factors, and an increased tumor growth in severe

immunodeficiency mice. This phenotype results from the constitutive activation of c-Met receptor and subsequent activation of MEK/ERK and PI3 K/Akt pathways [15]. Here, we reported the phenotype of MCF-7 GD3S+ clones.

MALDI-TOF analysis has confirmed that wild-type MCF-7 and MDA-MB-231 have different GSL composition. GSL composition of MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines was previously examined [25], showing that there is twice as much neutral GSL in MCF-7 as in MDA-MB-231 cells and that ganglioside content is four-fold higher in MDA-MB-231 cells compared to MCF-7 cells. Our data confirm that MCF-7 express large amount of globosides such as G_{b3} and G_{b4} and lower amount of gangliosides compared to MDA-MB-231 [14]. This difference in GSL composition may be explained by the lowest expression of the G_{M3} synthase (ST3 Gal V) in MCF-7, the enzyme that regulates the first step of gangliosides biosynthesis [14]. Similarly to MDA-MB-231 cells, wild-type MCF-7 cells only express a-series gangliosides, but mainly accumulate G_{M1a} instead of G_{M2} in MDA-MB-231, probably due to the 5-fold higher expression of the $\beta 3$ Gal T4 in MCF-7 cells (data not shown). In MCF-7 clones, GD3S expression resulted in the conversion of a-series in b- and c-series gangliosides absent from control cells, G_{D1b} being the main compound instead of G_{D2} in MDA-MB-231 GD3S+ clones (unpublished data). These data are in good agreement with ganglioside profiles of wild-type MCF-7 and with the expression of related enzymes, G_{D2} being efficiently converted in G_{D1b} by the $\beta 3$ Gal T4 in MCF-7 cells. It is noteworthy that GD3S+ clones also express c-series gangliosides whereas the G_{T3} synthase ST8Sia V is weakly expressed in both MDA-MB-231 and MCF-7 cells. This may be due to the G_{T3} synthase activity of GD3S that also uses G_{D3} as acceptor substrate to synthesize G_{T3} [26].

As previously shown, GD3S expression in MDA-MB-231 induces a proliferative phenotype in serum-free conditions, resulting from the constitutive activation of c-Met receptor and subsequent activation of MEK/ERK and PI3 K/Akt transduction pathways [15]. Moreover, the silencing of the G_{M2}/G_{D2} synthase ($\beta 4$ GalNAc T1) reverses the proliferative phenotype and c-Met phosphorylation, underlying the role of G_{D2} in c-Met activation. It is commonly known that ganglioside expression can have important effects on RTKs-mediated signaling and regulates cell growth through activation or inhibition of intracellular transduction pathways [27]. For example, EGFR tyrosine kinase activity is inhibited by G_{M3} through interactions of G_{M3} with terminal β -GlcNAc of EGFR N-glycans [28]. However, no change in the proliferative capacity of GD3S+ MCF-7 clones was observed and no activation of c-Met was detected in these cells. The absence of phenotype of GD3S+ MCF-7 clones can be related to the expression of G_{D1b} instead of G_{D2} , and reinforces the role of G_{D2} in c-Met activation. In parallel, MCF-7 GD3S+ cells show an increased migration as observed for MDA-MB-231 clones. This seems to indicate that proliferation and migration are activated by different mechanisms in GD3S+ cells.

In conclusion, the present data together with our previous results show that the expression of GD3S in breast cancer cells results in different ganglioside profiles and phenotypes according to the cell type and the cell-

dependent expression of other glycosyltransferases involved in ganglioside biosynthesis (i.e. ST3 Gal V, $\beta 4$ GalNAc T1, and $\beta 3$ Gal T4). Recently, it has been shown that breast cancer cell gangliosides can serve as functional E-selectin ligands and be involved in cell adhesion to vascular endothelium, favoring metastasis [29]. Moreover, the expression of ST6GalNAc V, a sialyltransferase catalyzing α -ganglioside biosynthesis, has been associated to brain metastasis of breast cancer. Normally restricted to the brain, the expression of ST6GalNAc V in breast cancer cells enhances their adhesion to brain endothelial cells and their passage through the blood-brain barrier [30]. We have also previously shown that *ST8SIA1* expression is significantly higher in the basal-subtype breast cancer tumors and that G_{D2} expression induces a growth factor independent proliferative phenotype via the constitutive activation of c-Met [15]. Nevertheless, *ST8SIA1* alone is not sufficient to induce G_{D2} accumulation and c-Met activation, as low expression of $\beta 3$ Gal T4 is also required. Altogether, these data indicate that the fine analysis of ganglioside glycosyltransferase genes expression should give new insights on proliferation capacity and tissue-specific metastasis targeting of basal-subtype breast cancer tumors.

Acknowledgments

We thank Pr. Jacques Portoukalian (Depart. of Transplantation and Clinical Immunology, Claude Bernard University and Edouard Herriot Hospital, Lyon, France) and Pr. Ronald L. Schnaar (Depart. of Pharmacology and Neuroscience, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, USA) for the kind gift of anti- G_{T3} and anti- G_{D1b} mAbs, respectively. We also thank Pr. C.H. Kim (Molecular and Cellular Glycobiology Unit, Depart. of Biological Science, Sung Kyun Kwan University, Suwon, Korea) for providing the pcDNA3-GD3S expression vector. This work was supported by the University of Sciences and Technologies of Lille, the Association pour la Recherche sur le Cancer (P. Delannoy grant no. 7936 and 5023, D. Tulasne grant no. 1137), La Ligue Régionale contre le Cancer and the ANR-Young Investigator Program (D. Tulasne).

References

- [1] S.I. Hakomori, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99 (2002) 225.
- [2] A.R. Todeschini, S.I. Hakomori, Biochim. Biophys. Acta. 1780 (2008) 421.
- [3] G. Zeng, R.K. Yu, Curr. Drug Targets. 9 (2008) 317.
- [4] G. Tettamanti, Glycoconj. J. 20 (2004) 301.
- [5] T. Yamashita, R. Wada, T. Sasaki, C. Deng, U. Bierfreund, K. Sandhoff, R.L. Proia, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 96 (1999) 9142.
- [6] C.S. Pukel, K.O. Lloyd, L.R. Travassos, W.G. Dippold, H.F. Oettgen, L.J. Old, J. Exp. Med. 155 (1982) 1133.
- [7] N. Baumann, M.L. Harpin, J.C. Turpin, Biomedicine 35 (1981) 215.
- [8] D.A. Cheres, J. Rosenberg, K. Mujoo, L. Hirschowitz, R.A. Reisfeld, Cancer Res. 46 (1986) 5112.
- [9] K. Furukawa, K. Hamamura, W. Aixinjueluo, K. Furukawa, Ann. N Y Acad. Sci. 1086 (2006) 185.
- [10] S.I. Hakomori, Adv. Exp. Med. Biol. 491 (2001) 369.
- [11] G. Marquina, H. Waki, L.E. Fernandez, K. Kon, A. Carr, O. Valiente, R. Perez, S. Ando, Cancer Res. 56 (1996) 5165.
- [12] E. Ruckhäberle, A. Rody, K. Engels, R. Gaetje, G. von Minckwitz, S. Schiffmann, S. Grösch, G. Geisslinger, U. Holtrich, T. Karn, M. Kaufmann, Breast Cancer Res. Treat. 112 (2008) 41.
- [13] E. Ruckhäberle, T. Karn, A. Rody, L. Hanker, R. Gätje, D. Metzler, U. Holtrich, M. Kaufmann, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 135 (2009) 1005.

- [14] A. Cazet, S. Groux-Degroote, B. Teylaert, K.M. Kwon, S. Lehoux, C. Slomianny, C.H. Kim, X. Le Bourhis, P. Delannoy, *Biol. Chem.* 390 (2009) 601.
- [15] A. Cazet, J. Lefebvre, E. Adriaenssens, S. Julien, M. Bobowski, A. Grigoriadis, A. Tutt, D. Tulasne, X. Le Bourhis, P. Delannoy, *Mol. Cancer Res.* 8 (2010) 1526.
- [16] H. Ozawa, M. Kotani, I. Kawashima, T. Tai, *Biochim. Biophys. Acta* 1123 (1992) 184.
- [17] C. Dubois, J.C. Manuguerra, B. Hauttecoeur, J. Maze, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 2797.
- [18] S.K. Moon, H.M. Kim, Y.C. Lee, C.H. Kim, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 33063.
- [19] R.L. Schnaar, *Methods Enzymol.* 230 (1994) 348.
- [20] I. Ciucanu, F. Kerek, *Carbohydr. Res.* 131 (1984) 209.
- [21] X. Zhang, L. Ding, A.J. Sandford, *BMC Mol. Biol.* 6 (2005) 4.
- [22] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, *Methods* 25 (2001) 402.
- [23] S. Ruan, B.K. Raj, K.O. Lloyd, *J. Neurochem.* 72 (1999) 514.
- [24] T. Sorlie, R. Tibshirani, J. Parker, T. Hastie, J.S. Marron, A. Nobel, S. Deng, H. Johnsen, R. Pesich, S. Geisler, J. Demeter, C.M. Perou, P.E. Lønning, P.O. Brown, A.L. Børresen-Dale, D. Botstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100 (2003) 8418.
- [25] K. Nohara, F. Wang, S. Spiegel, *Breast Cancer Res. Treat.* 48 (1998) 149.
- [26] J. Nakayama, M.N. Fukuda, Y. Hirabayashi, A. Kanamori, K. Sasaki, T. Nishi, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 3684.
- [27] P.H. Lopez, R.L. Schnaar, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 19 (2009) 549.
- [28] N. Kawashima, S.J. Yoon, K. Itoh, K. Nakayama, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 6147.
- [29] V.S. Shirure, K.A. Henson, R.L. Schnaar, L. Nimrichter, M.M. Burdick, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 406 (2011) 423.
- [30] 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, *J. Massagué, Nature* 459 (2009) 1005.
- [31] B. Domon, C.E. Costello, *Glycoconj. J.* 5 (1988) 397.

Conclusion et perspectives

Nos résultats ont clairement confirmé que le niveau d'expression de la GD3S est un facteur essentiel d'expression des gangliosides complexes au niveau de la membrane plasmique. Les analyses en spectrométrie de masse ont confirmé que le G_{D1b} est le ganglioside majeur exprimé par les cellules MCF-7 GD3S+ et que le G_{D2} n'est pratiquement pas exprimé dans ces cellules. Ces résultats sont en accord avec les observations de Cazet *et al.* qui ont montré que le phénotype prolifératif des cellules MDA-MB-231 GD3S+ était associé à l'expression du ganglioside G_{D2} . De plus, ces résultats ont également mis en évidence la faible proportion de gangliosides dans les cellules MCF-7, qui expriment majoritairement des globosides. L'absence de phénotype prolifératif des cellules MCF-7 GD3S+ pourrait donc également s'expliquer par la faible proportion de gangliosides dans ces cellules. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons essayé d'augmenter la proportion de gangliosides dans les cellules MCF-7 et ensuite analysé les conséquences de ces modifications sur les propriétés des cellules MCF-7. Comme le LacCer est un précurseur commun pour la synthèse des séries globo- et ganglio-, la conversion du LacCer en gangliosides nécessite une première étape de synthèse du G_{M3} par l'action de la G_{M3} synthétase (ST3Gal V). Nous avons transfecté les cellules MCF-7 par le vecteur pcDNA3-ST3Gal V pour augmenter le niveau des gangliosides et plus particulièrement le G_{M3} qui est le précurseur pour la synthèse du G_{D3} par l'action de la GD3S. Pour ensuite exprimer les gangliosides de la série b, une deuxième transfection par le vecteur pcDNA3-ST8Sia I contenant la séquence d'ADNc de la GD3S a été réalisée.

Le nouveau modèle cellulaire sera présenté dans la deuxième partie des résultats.

2. Effet de l'expression des gangliosides dans les cellules MCF-7 doublement transfectées

Dans ce chapitre, je présente la deuxième partie de mon travail de thèse qui a consisté à créer un nouveau modèle cellulaire MCF-7 doublement transfecté. Comme nous l'avons présenté précédemment, les cellules MCF-7 présentent une très faible proportion de gangliosides, ce qui pourrait expliquer l'absence de phénotype prolifératif dans les cellules MCF-7 GD3S⁺. Nous avons tout d'abord transfecté stablement les cellules MCF-7 par un vecteur d'expression contenant la séquence d'ADNc de la GM3 synthétase qui catalyse la conversion du LacCer en G_{M3}, enzyme faiblement exprimée dans les cellules MCF-7 (Cazet et al., 2009). Ensuite, pour augmenter le niveau d'expression des gangliosides des séries b et c, nous avons exprimé stablement de la GD3S dans les cellules MCF-7 GM3S⁺. Les cellules doublement transfectées ont été sélectionnées en présence d'antibiotiques. A partir de la population résistante, nous avons effectué une sélection clonale et analysé les nouveaux clones par qPCR et cytométrie de flux. L'analyse par qPCR a montré qu'aucun des clones n'exprimait un niveau augmenté de GM3S, par contre certains clones présentaient une forte expression de la GD3S. L'analyse par cytométrie de flux a montré que les clones doublement transfectés présentaient un profil gangliosidique particulier, avec une accumulation de G_{D3} et de G_{T3} à la surface cellulaire. Dans ces clones, nous avons analysé le profil de phosphorylation des récepteurs à activité tyrosine kinase et nous avons effectué des tests de prolifération. Les résultats de ces expériences montrent que les clones doublement transfectés ne présentent pas de phénotype particulier par rapport aux cellules contrôle.

Par contre, l'analyse des GSLs des clones MCF-7 doublement transfectés par spectrométrie de masse a démontré que ces cellules accumulaient des gangliosides inhabituels qui se caractérisent par la présence de quatre ou cinq résidus d'acide sialique, respectivement le G_{O3} et le G_{P3}. Ces dernières observations ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Molecules* parue en 2012.

a. Expression de la GM3 synthétase dans la population polyclonale

Nous avons analysé par qPCR le niveau d'expression des ARNm de la GM3 synthétase dans la population polyclonale des cellules MCF-7 obtenue après transfection par le vecteur pcDNA3-ST3Gal V et après sélection en présence d'hygromycine. La **figure 21** montre que l'expression des transcrits de la GM3 synthétase est environ 4 fois supérieure dans la population polyclonale par rapport aux cellules MCF-7 contrôle (transfectées par le vecteur vide) ou aux cellules MCF-7 wild type.

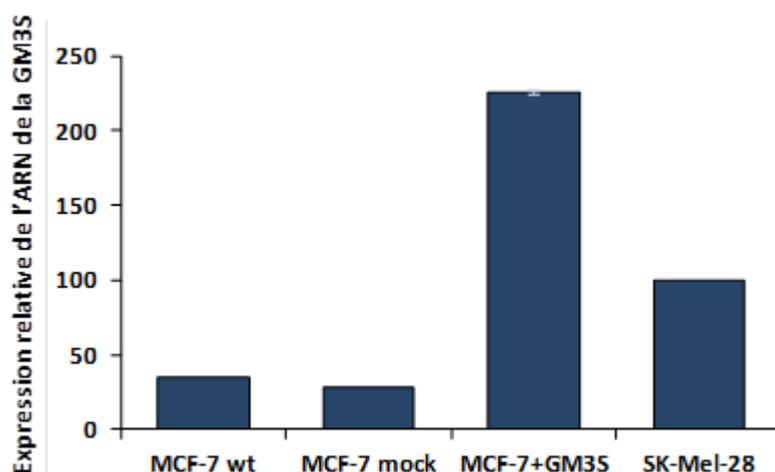


Figure 21 : Quantification relative des transcrits de la GM3 synthétase après transfection stable des cellules MCF-7. L'expression de la GM3 synthétase a été quantifiée par qPCR en SYBR Green, et normalisée par rapport à celle du gène HPRT. Le niveau d'expression de transcrits de la GM3 synthétase dans la lignée de mélanome SK-Mel-28 sert de référence.

b. Analyse de gangliosides à la surface cellulaire de la population polyclonale exprimant la GM3S

L'expression du ganglioside G_{M3} a été analysée par cytométrie de flux sur les cellules MCF-7 $GM3S^+$ non perméabilisées. Dans ces cellules, nous avons détecté une augmentation de l'expression du G_{M3} par rapport aux cellules contrôles. Par contre, la population polyclonale présente un profil d'expression des gangliosides hétérogène (**Fig. 22**). Les résultats de qPCR et cytométrie de flux montrent que la sur-expression de la GM3S dans les cellules MCF-7 induit la modification du profil des gangliosides avec une augmentation du G_{M3} .

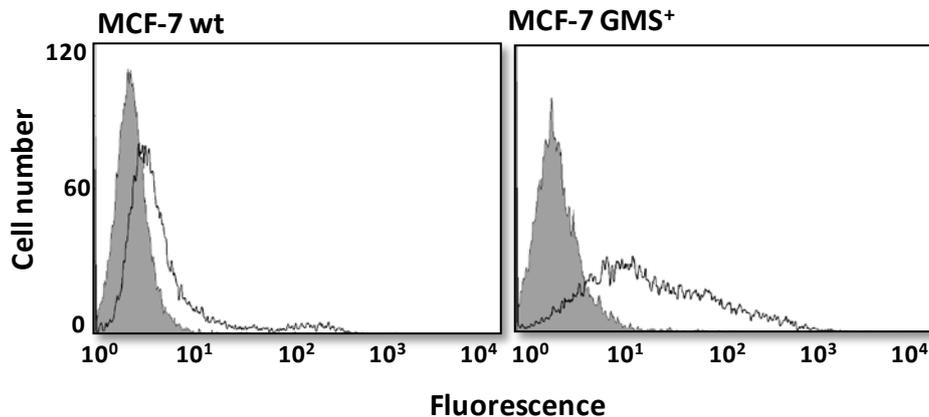


Figure 22 : Analyse par cytométrie en flux de l'expression des gangliosides GM3 à la surface cellulaire des cellules MCF-7 stablement transfectées par le vecteur pcDNA3-GM3S. Les pics colorés en gris représentent le contrôle négatif (incubation avec anticorps secondaire seul) et les lignes noires représentent les signaux observés après incubation des cellules avec l'anticorps anti GM3 (1 :75).

c. Expression transcriptionnelle de la GD3S dans la population doublement transfectée

Comme nous avons présenté précédemment, les cellules MCF-7 expriment très faiblement la GD3S et n'expriment pas les gangliosides des séries b et c à la membrane plasmique. (Steenackers *et al.*, 2012). Après avoir observé une augmentation du niveau d'expression du G_{M3} , nous avons transfecté les cellules MCF-7 GM3S+ par le vecteur pcDNA3-GD3S. Après 3 semaines de culture en présence d'hygromycine et de généticine, nous avons obtenu une population polyclonale de cellules résistantes. Dans cette population nous avons analysé le niveau d'expression des ARNm de la GD3S par technique de qPCR. Nous avons détecté l'augmentation du niveau des transcrits de la GD3S par rapport aux cellules contrôles (**Fig. 23**).

Compte tenu de l'hétérogénéité de la population des cellules MCF-7 obtenues après transfection stable (**Fig. 22**), nous avons effectué une sélection clonale par dilution limite. Quarante cinq clones ont été isolés et analysés par qPCR pour l'expression de la GM3S et de la GD3S, et leur profil gangliosidique a été déterminé par cytométrie de flux et spectrométrie de masse.

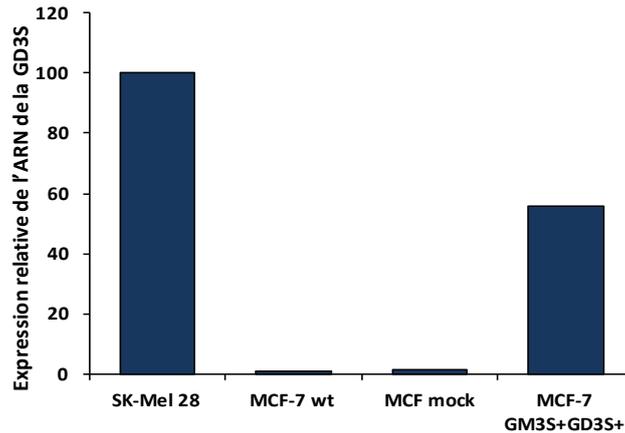


Figure 23 : Quantification relative des transcrits de la GD3 synthétase après transfection stable des cellules MCF-7 GM3S+. L'expression de la GD3 synthétase est quantifiée par qPCR (SYBG Green), normalisée par rapport à celle du gène HPRT, et comparée au niveau d'expression de transcrits de la GD3 synthétase dans la lignée de mélanome SK-Mel-28.

d. Analyse de l'expression des transcrits de la GM3S et GD3S dans les clones MCF-7 doublement transfectés

Après sur-expression de la GM3S et de la GD3S, enzymes impliquées dans les deux premières étapes de la biosynthèse des gangliosides des série b et c, et sélection clonale, nous avons analysé l'expression des ARNm de la GM3S et GD3S dans les clones MCF-7 doublement transfectés. Comme le montre la **Figure 24a**, de façon surprenante aucun des clones testés n'exprime la GM3 synthétase ; par contre, trois clones présentent une forte expression de la GD3S en comparaison avec les cellules MCF-7 contrôles (transfectées par le vecteur vide) ou les cellules MCF-7 WT (**Fig. 24b**).

Figure 24a

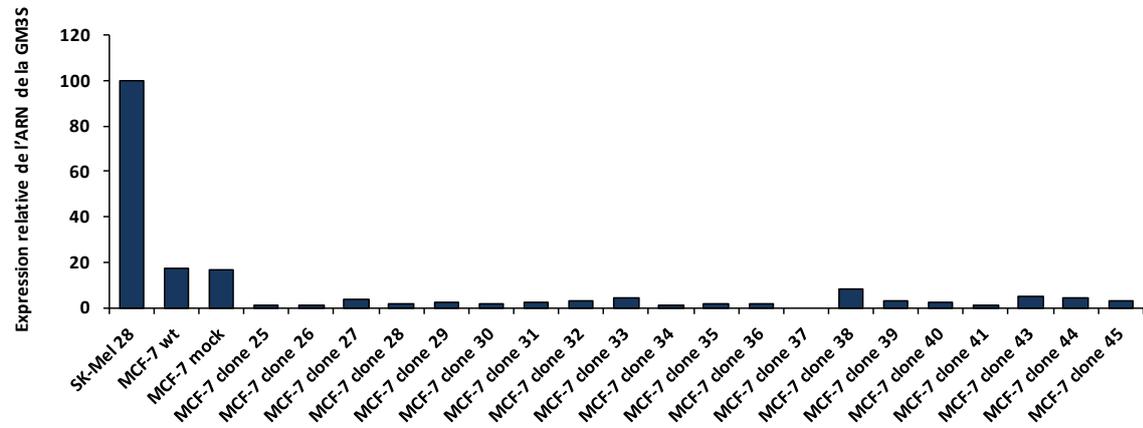
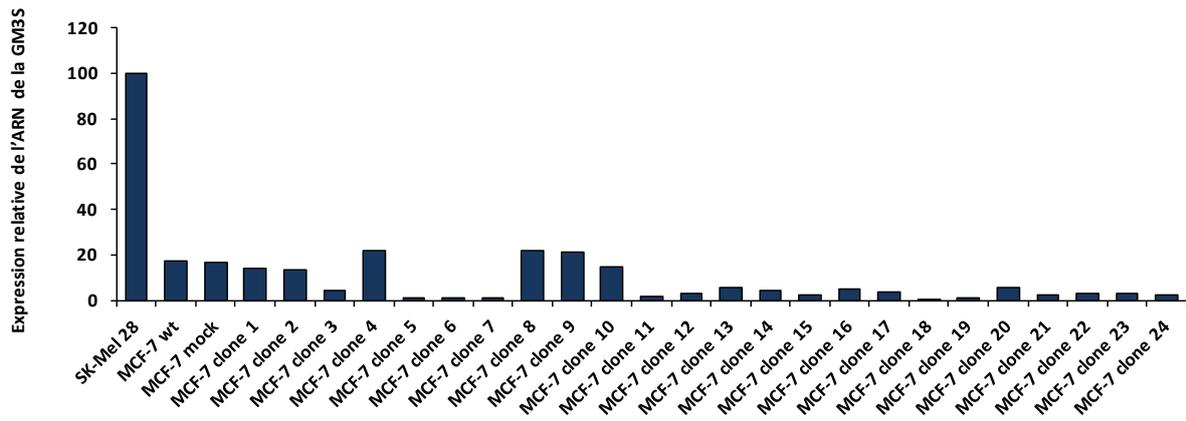


Figure 24b

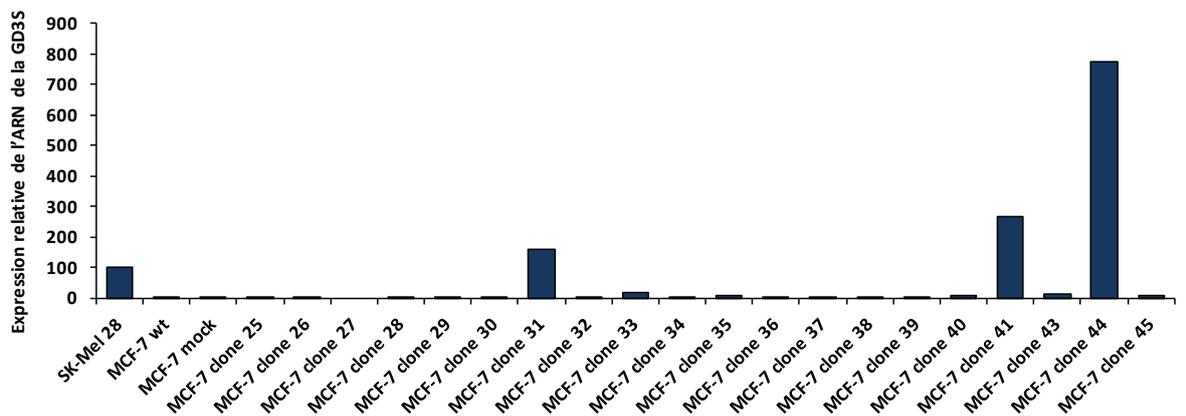
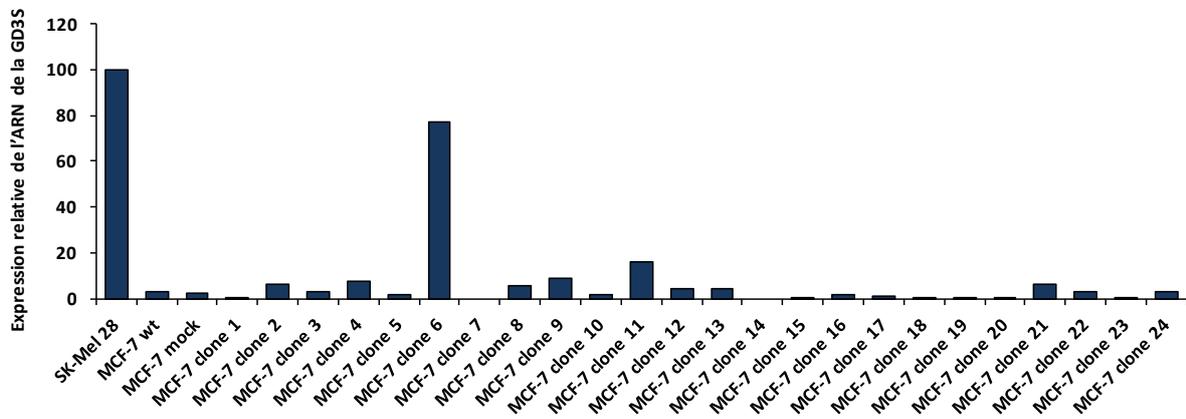


Figure 24 : Quantification relative des transcrits de la GM3S (a) et de la GD3S (b) dans les clones MCF-7 GM3S+ GD3S+. L'expression relative de la GM3S et de la GD3S a été quantifiée par qPCR (SYBR Green), normalisée par rapport à celle du gène HPRT, et comparée au niveau d'expression dans les cellules SK-Mel-28.

Parmi les quarante cinq clones analysés, nous avons sélectionné 3 clones présentant une forte expression de la GD3S. L'analyse par cytométrie de flux a montré que les clones doublement transfectés expriment uniquement des gangliosides G_{D3} et G_{T3} à la surface cellulaire. Par contre, nous n'avons pas détecté de gangliosides plus complexes tels que le G_{D2} , ou le G_{D1b} comme dans le modèle présenté précédemment (Article 1). Ces résultats ont été confirmés par spectrométrie de masse. Ces analyses ont également montré que ces clones expriment des gangliosides possédant 4 ou 5 résidus d'acide sialique, respectivement le G_{Q3} et le G_{P3} . L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article 2).

e. Analyse du profil de phosphorylation des RTKs dans les clones MCF-7 GM3S+ GD3S+ exprimant les gangliosides G_{Q3} et G_{P3}

Nous avons voulu déterminer si l'expression de gangliosides inhabituels comme le G_{Q3} et le G_{P3} pouvait modifier le profil de phosphorylation des RTKs. Cette analyse a été réalisée par phospho array sur le clone 44 et les cellules contrôles (**Fig. 25**). Ces expériences de phospho array ont été réalisées en présence de sérum (10% de sérum bovin fœtal) et en conditions de sevrage. En présence de sérum, nous n'avons pas détecté de différences entre le clone 44 et les cellules contrôles. Dans les deux types cellulaires, nous avons majoritairement détecté une phosphorylation des récepteurs EGFR et ErbB3. Par contre, nous avons observé un changement de statut de phosphorylation en conditions de sevrage, avec une phosphorylation accrue des récepteurs EGFR, ErbB3, ErbB2 dans les cellules mock et le clone 44, et une augmentation de la phosphorylation du récepteur ErbB4 détectée dans le clone 44.

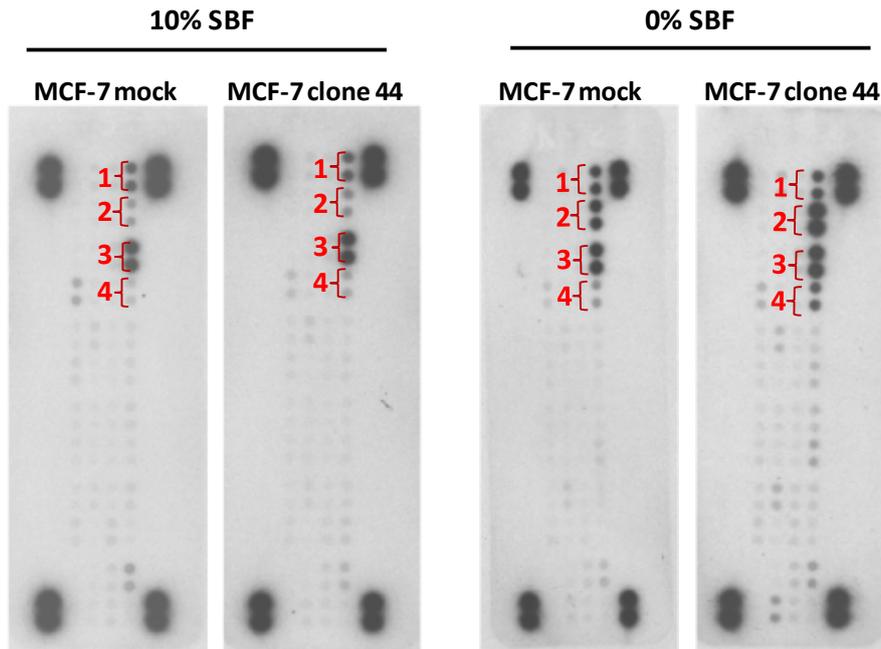


Figure 25 : Analyse du statut de phosphorylation des RTKs dans le clone MCF-7 GM3S+ GD3S+ 44 et les cellules MCF-7 contrôles en présence de sérum (10% SBF) et en conditions de sevrage. Pour analyser la phosphorylation en conditions de sevrage, les cellules ont été cultivées 48h sans sérum. Les points noirs dans le coin de la membrane représentent le contrôle positif.

1: EGFR, 2 : ErbB2, 3 : ErbB3, 4 : ErbB4.

f. Analyse de la croissance des cellules MCF-7 doublement transfectées

Afin de déterminer si la modification de profil gangliosidique et le changement de statut de phosphorylation de certains RTKs pouvait modifier la prolifération des cellules doublement transfectées, nous avons analysé la croissance des différentes populations cellulaires avec un test MTS. Le test de prolifération été effectué à une concentration de sérum bovin foetal (SBF) de 1% dans le milieu de culture. Nous n'avons pas pu analyser la croissance des cellules MCF-7 en conditions de sevrage du fait de la forte mortalité cellulaire. La prolifération a été mesurée 24, 48, 72, 96 et 120h après repiquage. A l'issue de ces expériences, nous n'avons pas observé de différences de prolifération pour le clone 44 par rapport aux cellules MCF-7 WT et MCF-7 contrôles (**Fig. 26**).

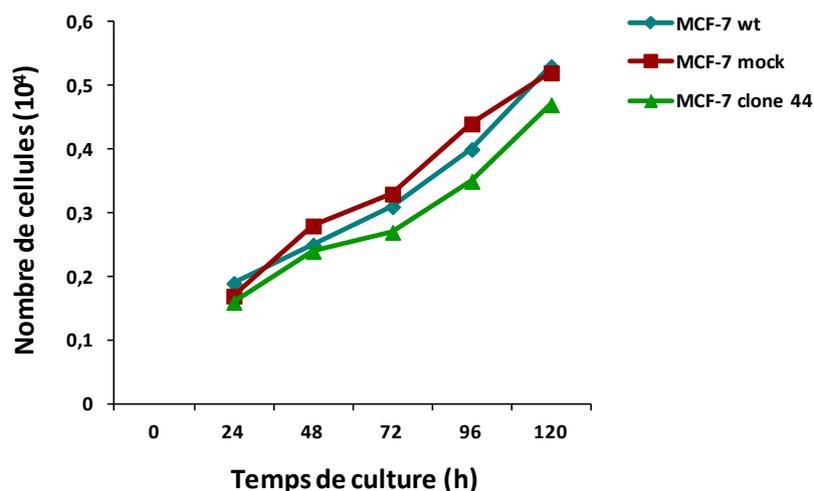


Figure 26 : Analyse de la prolifération des cellules MCF-7 GM3S+ GD3S+ par un test colorimétrique MTS. Le clone 44 et les cellules MCF-7 contrôles (mock et WT) ont été cultivées avec une concentration de 1% de SBF. Le nombre de cellules a été estimé après 24, 48, 72, 96, 120 h par l'ajout de MTS.

g. Accumulation des gangliosides inhabituels G_{Q3} et G_{P3} dans les cellules MCF-7.

L'analyse de spectrométrie de masse dans les clones MCF-7 doublement transfectés par les vecteurs pcDNA3-GM3S et pc DNA3-GD3S a démontré que ces cellules présentent un phénotype gangliosidique particulier avec accumulation de gangliosides inhabituels qui présentent quatre ou cinq résidus d'acide sialique, respectivement le G_{Q3} et le G_{P3}. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication dans la revue *Molecules* parue en 2012.

Article

Accumulation of Unusual Gangliosides G_{Q3} and G_{P3} in Breast Cancer Cells Expressing the G_{D3} Synthase

Agata Steenackers ^{1,†}, Jorick Vanbeselaere ^{1,†}, Aurélie Cazet ^{1,‡}, Marie Bobowski ¹, Yoann Rombouts ^{1,#}, Florent Colomb ¹, Xuefen Le Bourhis ², Yann Guérardel ¹ and Philippe Delannoy ^{1,*}

¹ Structural and Functional Glycobiology Unit, UMR CNRS 8576, University of Sciences and Technologies of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France; E-Mails: agata.steenackers@hotmail.fr (A.S.); jorick.vanbeselaere@gmail.com (J.V.); aurelie_cazet@yahoo.fr (A.C.); marie.bobowski@hotmail.fr (M.B.); yoann.rombouts@gmail.com (Y.R.); florent.colomb@ed.univ-lille1.fr (F.C.); yann.guerardel@univ-lille1.fr (Y.G.)

² INSERM U908, University of Sciences and Technologies of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France; E-Mail: xuefen.lebourhis@univ-lille1.fr

† These authors contributed equally to this work.

‡ Current address: Cancer Research Program, Garvan Institute of Medical Research, Darlinghurst, NSW 2010, Australia

Current address: Department of Rheumatology, Leiden University Medical Center, 2300 RC Leiden, The Netherlands

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: philippe.delannoy@univ-lille1.fr; Tel.: +33-320-436-923; Fax: +33-320-436-555.

Received: 18 June 2012; in revised form: 20 July 2012 / Accepted: 6 August 2012 /

Published: 10 August 2012

Abstract: Glycosphingolipids from the ganglio-series are usually classified in four series according to the presence of 0 to 3 sialic acid residues linked to lactosylceramide. The transfer of sialic acid is catalyzed in the Golgi apparatus by specific sialyltransferases that show high specificity toward glycolipid substrates. ST8Sia I (EC 2.4.99.8, SAT-II, SIAT 8a) is the key enzyme controlling the biosynthesis of b- and c-series gangliosides. ST8Sia I is expressed at early developmental stages whereas in adult human tissues, ST8Sia I transcripts are essentially detected in brain. ST8Sia I together with b- and c-series

gangliosides are also over-expressed in neuroectoderm-derived malignant tumors such as melanoma, glioblastoma, neuroblastoma and in estrogen receptor (ER) negative breast cancer, where they play a role in cell proliferation, migration, adhesion and angiogenesis. We have stably expressed ST8Sia I in MCF-7 breast cancer cells and analyzed the glycosphingolipid composition of wild type (WT) and GD3S+ clones. As shown by mass spectrometry, MCF-7 expressed a complex pattern of neutral and sialylated glycosphingolipids from globo- and ganglio-series. WT MCF-7 cells exhibited classical monosialylated gangliosides including G_{M3} , G_{M2} , and G_{M1a} . In parallel, the expression of ST8Sia I in MCF-7 GD3S+ clones resulted in a dramatic change in ganglioside composition, with the expression of b- and c-series gangliosides as well as unusual tetra- and pentasialylated lactosylceramide derivatives G_{Q3} ($II^3Neu5Ac_4-Gg_2Cer$) and G_{P3} ($II^3Neu5Ac_5-Gg_2Cer$). This indicates that ST8Sia I is able to act as an oligosialyltransferase in a cellular context.

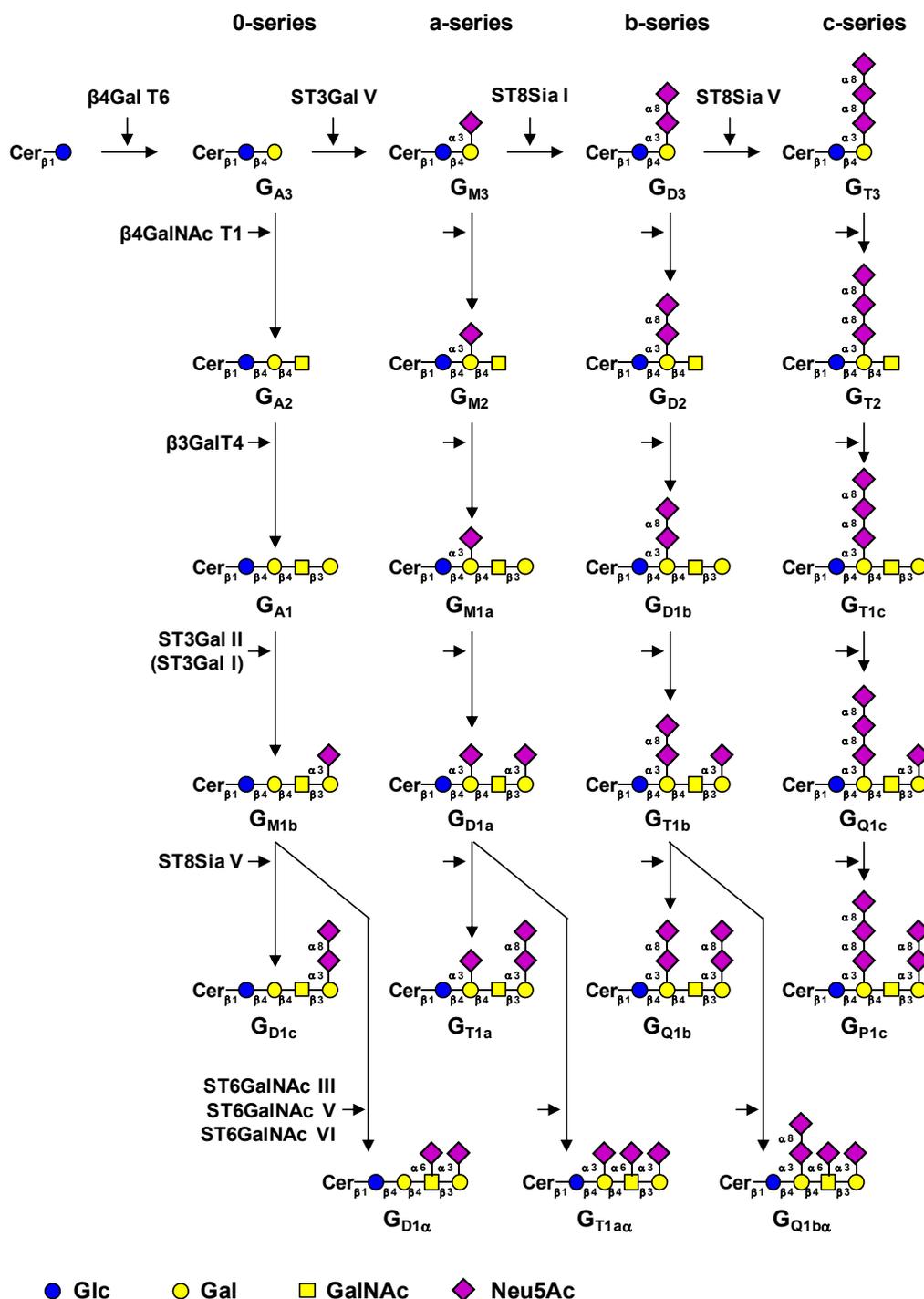
Keywords: gangliosides; G_{D3} synthase; MCF-7; unusual gangliosides

Abbreviations: BSA: Bovine Serum Albumin; Cer: ceramide; DMB: 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene; DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid; DMSO: Dimethyl Sulfoxide; FBS: Fetal Bovine Serum; FITC: Fluorescein Isothiocyanate; FL-HPLC: Fluorescence Detection High Performance Liquid Chromatography; GD3S: G_{D3} synthase; GSL: glycosphingolipid; HPRT: Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase; HRP: horseradish peroxidase; LacCer: Lactosylceramide; mAb: monoclonal Antibody; MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption-ionization time-of-flight; MS: Mass Spectrometry; PBS: Phosphate Buffered Saline; QPCR: Quantitative real-time Polymerase Chain Reaction; SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis; ST3Gal V: G_{M3} synthase; ST8Sia I: G_{D3} synthase; ST8Sia V: G_{T3} synthase; WT: Wild Type.

1. Introduction

Glycosphingolipids (GSL) from the ganglio-series are classified in four series according to the presence of 0 to 3 sialic acid residues linked to lactosylceramide ($Gal\beta 1-4Glc-Cer$, LacCer) [1]. The transfer of sialic acid to LacCer is catalyzed in the Golgi apparatus by specific sialyltransferases (namely ST3Gal V, ST8Sia I and ST8Sia V) that show high specificity toward glycolipid substrates [2]. LacCer, G_{M3} ($Neu5Ac\alpha 2-3Gal\beta 1-4Glc-Cer$, $II^3Neu5Ac_1-Gg_2Cer$), G_{D3} ($Neu5Ac\alpha 2-8Neu5Ac\alpha 2-3Gal\beta 1-4Glc-Cer$, $II^3Neu5Ac_2-Gg_2Cer$) and G_{T3} ($Neu5Ac\alpha 2-8Neu5Ac\alpha 2-8Neu5Ac\alpha 2-3Gal\beta 1-4Glc-Cer$, $II^3Neu5Ac_3-Gg_2Cer$) are therefore the precursors for 0-, a-, b- and c-series gangliosides and the biosynthesis of these compounds determine the relative proportion of gangliosides in each series (Figure 1). Elongation of the precursors can then occur by the sequential action of *N*-acetylgalactosaminyltransferase ($\beta 4GalNAc$ T1), galactosyltransferase ($\beta 3Gal$ T4) and sialyltransferases (ST3Gal I, ST3Gal II and ST8Sia V), α -gangliosides deriving from the action of ST6GalNAc III, V or VI on G_{M1b} , G_{D1a} or G_{T1b} (Table 1).

Figure 1. Biosynthesis pathway for gangliosides. The code names of gangliosides are according to Svennerholm [1]. Cer: ceramide.



The sialyltransferase ST8Sia I (EC 2.4.99.8, SAT-II, SIAT 8a) 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} . ST8Sia I and G_{D3} are expressed in fetal tissues at an early developmental stage [3,4] where they play a key role in cell-cell interaction, cell differentiation and proliferation [5], whereas in adult human tissues, ST8Sia I is essentially detected in the brain [6]. ST8Sia I and G_{D3} have been also shown to be over-expressed in neuroectoderm-derived malignant tumors such as melanoma, glioblastoma and neuroblastoma, and in estrogen receptor negative breast cancer [7–10].

Table 1. Glycosyltransferases involved in gangliosides biosynthesis. R = G_{A3}, G_{M3}, G_{D3} or G_{T3}.

Gene	Common name	Main acceptor(s)	Accession #	Reference
<i>UGCG</i>	GlcCer synthase	Ceramide	NM_003358	[18]
<i>B4GALT6</i>	LacCer synthase	Glucosylceramide	NM_004775	[19,20]
<i>ST3GAL5</i>	G _{M3} synthase	Lactosylceramide	NM_003896	[21]
<i>ST8SIA1</i>	G _{D3} synthase	G _{M3} , G _{D3}	NM_003034.2	[11–13]
<i>ST8SIA5</i>	G _{T3} synthase	G _{D3} , G _{M1b} , G _{D1a} , G _{T1b}	NM_013305	[17]
<i>B4GALNACT1</i>	G _{M2} /G _{D2} synthase	G _{A3} , G _{M3} , G _{D3} , G _{T3}	NM_001478.2	[22–24]
<i>B3GALT4</i>	G _{M1a} /G _{D1b} synthase	G _{A2} , G _{M2} , G _{D2} , G _{T2}	NM_003782.3	[23,25]
<i>ST3GAL1</i>	ST3Gal I	Galβ1-3GalNAcβ1-4-R	NM_003033	[26]
<i>ST3GAL2</i>	ST3Gal II	Galβ1-3GalNAcβ1-4-R	NM_006927	[27]
<i>ST6GALNAC3</i>	ST6GalNAc III	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4-R	NM_152996	[28]
<i>ST6GALNAC5</i>	ST6GalNAc V	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4-R	NM_030965.1	[29]
<i>ST6GALNAC6</i>	ST6GalNAc VI	Neu5Acα2-3Galβ1-3GalNAcβ1-4-R	NM_013443.3	[29]

The human ST8Sia I cDNA was simultaneously isolated by expression cloning by three research groups [11–13]. The *ST8SIA1* gene is located on chromosome 12, in p12.1-p11.2 and consists of five coding exons spanning over 135 kbp of genomic DNA [14]. ST8Sia I cDNA encodes a 341 amino acid membrane-bound Golgi enzyme with a 12 amino-acid cytoplasmic tail, a transmembrane domain of about 20 residues and a catalytic domain containing the conserved Sialyl motifs involved in substrate binding and transfer [15].

Whereas ST8Sia I mainly sialylates G_{M3}, Nakayama and co-workers have underlined its ability to synthesize G_{T3} from G_{D3} [6]. 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* [16]. However, the α2,8-sialyltransferase ST8Sia V is a much better candidate for G_{T1a}/G_{Q1b} synthase activity [17] 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 the b- and c-series.

By stable transfection of the full-length cDNA of human G_{D3} synthase, we have isolated cellular clones deriving from MCF-7 breast cancer cells that constitutively express GD3S together with b- and c-series gangliosides. Here, we show by mass spectrometry and HPLC analysis that clones that express a high level of GD3S also accumulate unusual tetra- and pentasialylated derivatives of LacCer, G_{Q3} (II³Neu5Ac₄-Gg₂Cer) and G_{P3} (II³Neu5Ac₅-Gg₂Cer).

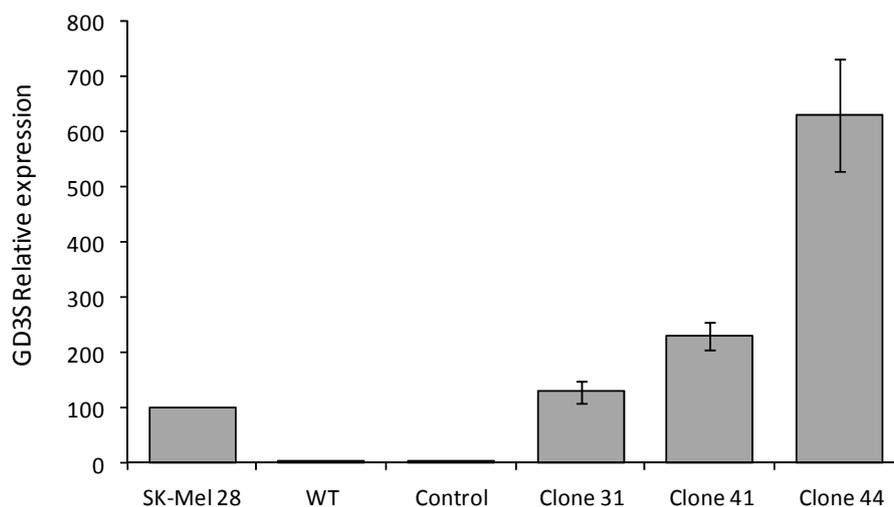
2. Results and Discussion

2.1. Analysis of ST8Sia I Expression by QPCR in Control and GD3S+ MCF-7 Clones

MCF-7 cells were transfected with the pcDNA3-GD3S expression vector containing the full-length cDNA of human GD3S or the empty pcDNA3 vector as control. Transfected cells were cultured 21 days in the presence of 1 mg/mL G418. Individual G418-resistant colonies were isolated by limiting dilution cloning. Forty-four clones were obtained and analyzed for the expression of GD3S. As previously shown [30], QPCR analysis of GD3S expression (Figure 2) indicates that GD3S mRNA is expressed at a very low level in wild-type and control (empty vector transfected) MCF-7 cells compared to SK-Mel 28 melanoma cells used as positive control [31]. Within the forty-four analyzed clones,

three GD3S+ clones (clone #31, #41 and #44) were selected according to the high expression of GD3S compared to SK-Mel 28 (1.3-fold, 2.3-fold and 6.3-fold, respectively) (Figure 2).

Figure 2. QPCR analysis of GD3S expression in control and GD3S+ MCF-7 clones. Quantification of GD3S expression was performed by the method described by Livak and Schmittgen [32] and normalized to HPRT. The expression of GD3S in MCF-7 cells was relative to SK-Mel 28, which was regarded as 100%.



2.2. Flow Cytometry Analysis of Gangliosides Expression in MCF-7 GD3S+ Clones

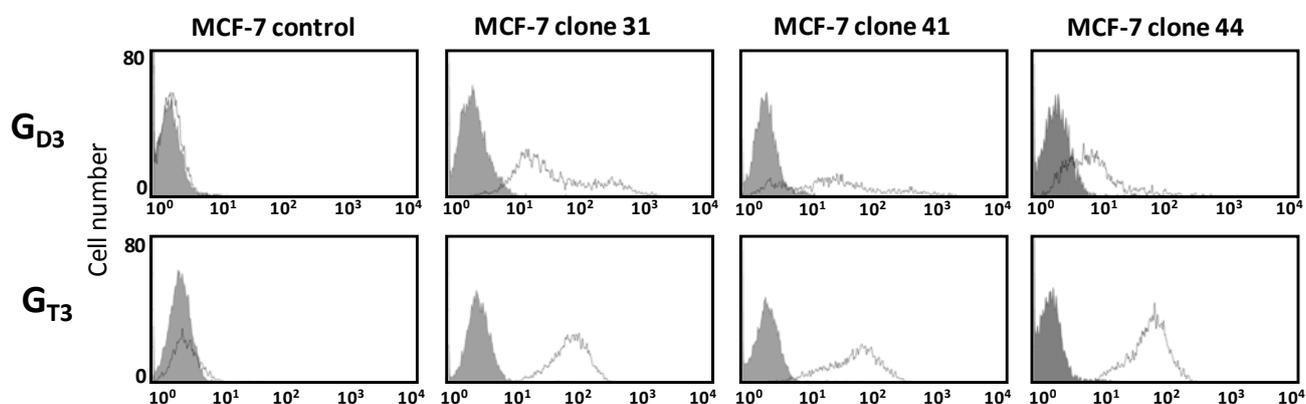
The pattern of gangliosides was monitored in the three selected MCF-7 GD3S+ clones (clone #31, #41, #44) by flow cytometry using anti-G_{D3} R24 and anti-G_{T3} A2B5 mAbs. As shown in Figure 3, the three GD3S+ clones expressed G_{D3} and G_{T3} whereas wild-type and control (empty vector transfected) MCF-7 cells did not express complex gangliosides. G_{T3} is expressed at a similar level in the three GD3S+ clones but a decrease of G_{D3} is observed in clone #44 compared to clone #31 and #41 whereas the expression level of GD3S was 4.8-fold or 2.7-fold higher in clone #44 compared to clone #31 and #41, respectively (Figure 2). Control cells showed no change in the ganglioside profile compared with wild-type MCF-7 (data not shown).

2.3. MS Analysis of Gangliosides in MCF-7 and GD3S+ Clones

Glycolipids were extracted from cells, purified by reverse phase chromatography and permethylated prior to MS analysis. Mass spectrometry analysis established that glycolipid profiles of MCF-7 WT and GD3S+ clones were characterized by complex patterns of neutral and sialylated glycosphingolipids from globo- and ganglio-series. Profiles of all cell lines were dominated by two signals at *m/z* 1460 and 1572 both identified based on their MALDI-TOF/TOF fragmentation patterns (data not shown) and in agreement with previously published analyses [33] as mixtures of G_{b4} and G_{A1} differing by the nature of their lipid moieties (d18:1-16:0 or d18:1-24:0). Along these two major components, MS and MS/MS analyses permitted us to identify other minor neutral GSLs including LacCer and G_{b3} (Figure 4). The comparison of MS profiles did not show any significant difference in neutral GSLs content between MCF-7 WT and GD3+ clones. On the contrary, the content in sialylated

glycolipids varied among the different cell lines. MCF-7 WT cells exhibited monosialylated gangliosides including G_{M3} , G_{M2} , and G_{M1} . The only disialylated GSL observed in MCF-7 WT cells was G_{D1} at m/z 2182 and 2194. Its sequence analysis by MALDI-TOF/TOF typified it as G_{D1a} , thus lacking disialylated motif (data not shown). $GD3^+$ clones did not show GSLs from the G2 and G1 families but synthesized instead a family of unusual highly sialylated lactosylceramide derivatives substituted by up to 5 Neu5Ac residues tentatively identified as G_{D3} , G_{T3} , G_{Q3} and G_{P3} . The structure of these four compounds was confirmed by MALDI-TOF/TOF sequencing.

Figure 3. Flow cytometry analysis of gangliosides in pcDNA3-GD3S transfected MCF-7 cells. Immunodetection of G_{D3} and G_{T3} was performed using anti- G_{D3} R24 (dilution 1:100) and anti- G_{T3} A2B5 (dilution 1:10) mAbs. The gray peaks correspond to the negative controls (incubation with secondary antibody alone, anti-mouse IgM or anti-mouse IgG labeled with Alexa 488).



The Glycolipid profile of SK-Mel 28 cells was also analyzed in respect to the presence of polysialylated lactosylceramide derivatives. Contrarily to MCF-7 WT cells, GSLs extracted from SK-Mel 28 cells did not contain globo-series but were dominated by ganglio-series, which induces much higher overall sialic acid content (data not shown). In particular, disialylated G_{D3} appears to be the major component along with monosialylated G_{M3} and trisialylated G_{T3} . However, the tetra- and pentasialylated gangliosides synthesized by MCF-7 $GD3^+$ clones were not detected in SK-Mel 28.

Figure 4. Comparison of MS profiles of permethylated glycosphingolipids purified from MCF-7 WT and $GD3^+$ clone #44. All GSLs are present as d18:1/C16:0 (Cer*) and d18:1/C24:0 (Cer**) isomers. ○, Gal; ●, Glc; ■, GalNAc; ◆, Neu5Ac.

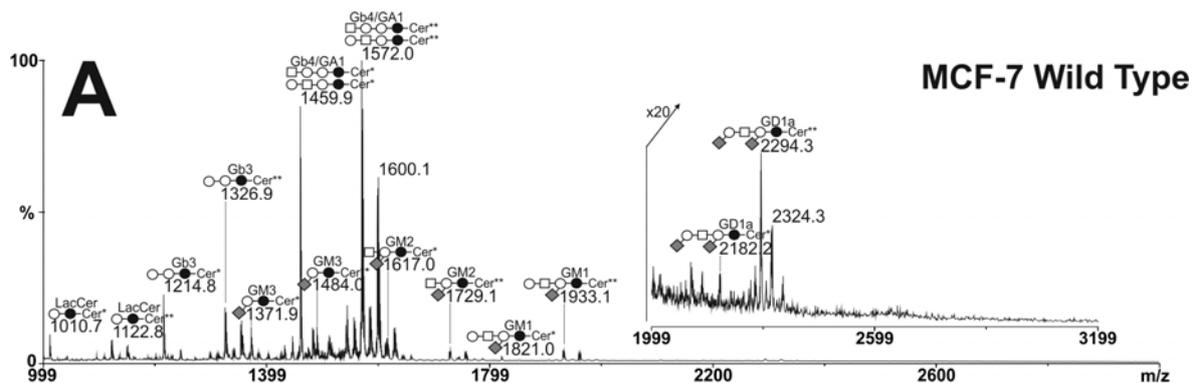
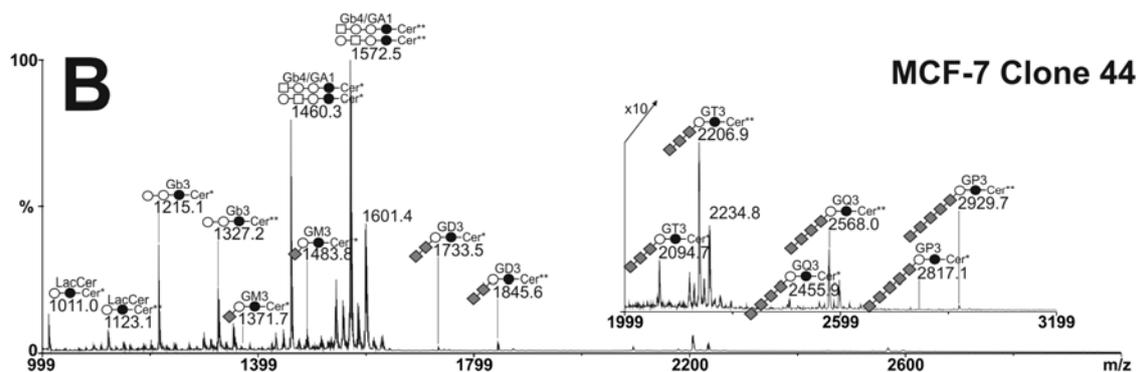
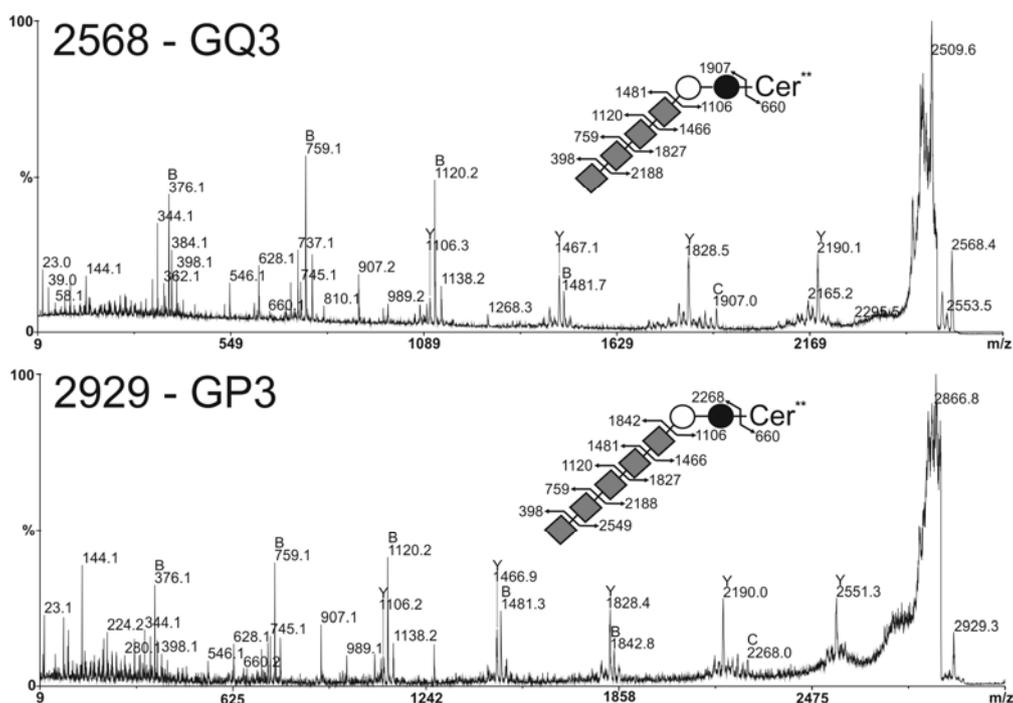


Figure 4. Cont.



We illustrate the sequence analyses of unusual G_{Q3} and G_{P3} in Figure 5. These two molecules differing in the presence of a single Neu5Ac residue were structurally related. They shared the fragmentation pattern of a linear stretch of four sialic acid residues in terminal non-reducing position as $[M+Na]^+$ B-ions at m/z 398, 759, 1120 and 1481 and a linear sequence of Sia_4Hex_2Cer at reducing end as $[M+Na]^+$ Y-ions at m/z 1106, 1466, 1827 and 2188. G_{P3} showed additional B and Y ions at m/z 1842 and 2551 typifying a linear Sia_5 sequence. Altogether, these data established that MCF-7 GD3+ clone #44 synthesizes an unusual family of oligosialylated lactosylceramide derivatives presented from 2 to 5 Neu5Ac residues. The disappearance of G_{M2} , G_{M1} and G_{D1a} in MCF-7 GD3+ clone #44 could be explained by the depletion of G_{M3} substrate caused by the over-expression of the GD3S+ that competes with β -4GalNAcT1 for the use of G_{M3} substrate.

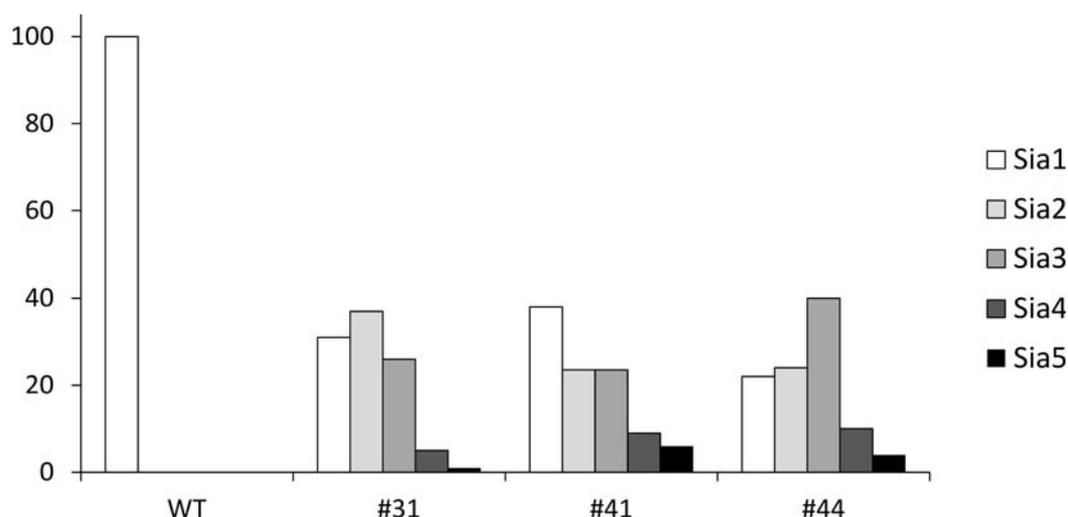
Figure 5. MS/MS sequencing of permethylated glycosphingolipids. Analysis of G_{Q3} at m/z 2568 (A) and G_{P3} at m/z 2929 (B) with ceramide moieties d18:1/C24:0 (Cer**). All fragments are observed as $[M+Na]^+$ adducts except those at m/z at 376 and 660 observed as $[M+H]^+$ adducts. Fragment ions were annotated according to nomenclature of Domon and Costello [34]. \circ , Gal; \bullet , Glc; \blacksquare , GalNAc; \blacklozenge , Neu5Ac.



2.4. Quantification of Polysialylation Associated with Gangliosides by HPLC

Because mass spectrometry does not provide reliable quantitative data, we quantified the extent of oligosialylation modifications in GSLs induced by the overexpression of G_{D3} in MCF-7 by screening all three GD3S+ clones (#31, #41 and #44) (Figure 6). To do that, oligosialylated motifs were released from purified GSLs by mild hydrolysis according to optimized procedures [35] and labeled by DMB before separation and quantification by FL-HPLC [36]. The analysis of relative quantifications of sialic acid chains in GSLs of all MCF-7 GD3S+ clones compared to MCF-7 WT demonstrated a sharp increase of sialylation oligomerization degree, up to five residues, in accordance with mass spectrometry analysis. In MCF-7 WT, no oligosialylation could be observed, in accordance with the sole identification of G_{D1a} by MS. In contrast, all GD3S+ clones contained about 30% of Sia₂ and Sia₃ motifs, up to 10% of Sia₄ and up to 5% of Sia₅. Although clones presented similar GSL oligosialylation profiles, small scale quantitative differences could be observed between the three clones, with a prevalence of higher DP values for clone #44 compared to clones #31 and #41.

Figure 6. Relative quantification of oligosialylation sequence on GSL of MCF-7 WT GD3S+ clones #31, clone #41 and clone #44 by FL-HPLC after DMB derivation.



3. Experimental Section

3.1. Antibodies and Reagents

Anti- G_{D3} R24 mAb was purchased from Abcam (Cambridge, UK) and anti- G_{T3} A2B5 mAb was kindly provided by Pr. Jacques Portoukalian (Depart. of Transplantation and Clinical Immunology, Claude Bernard University and Edouard Herriot Hospital, Lyon, France). FITC-conjugated sheep anti-mouse IgG was from GE Healthcare (Templemars, France). FITC-conjugated anti-mouse IgM was purchased from Molecular Probes (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

3.2. Cell Culture

The breast cancer cell line MCF-7 and the melanoma cell line SK-Mel 28 were obtained from the American Type Cell Culture Collection. Cell culture reagents were purchased from Lonza

(Levallois-Perret, France). Cells were routinely grown in monolayer and maintained at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and 100 units/mL penicillin-streptomycin. GD3S positive (GD3S+) MCF-7 clones were obtained by stable transfection of the pcDNA3-GD3S expression vector encoding the full-length human G_{D3} synthase [37] as previously described [33]. Individual resistant colonies were isolated by limit dilution. Three positive clones (#31, #41 and #44), expressing different levels of GD3S were used for further study. Control cells (empty vector transfected) and GD3S+ clones were cultured in the presence of 1 mg/mL G418 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France).

3.3. Quantitative Real-Time-PCR (QPCR) Analysis of G_{D3} Synthase

Total RNA was extracted using the Nucleospin RNA II kit (Macherey Nagel, Hoerd, France), quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, USA) and the purity of the preparation was checked by ratio of the absorbance at 260 and 280 nm. The cDNA was synthesized using 2 µg of RNA (GE Healthcare). PCR primers for GD3S and Hypoxanthine PhosphoRibosylTransferase (HPRT) were previously described [30,38] and synthesized by Eurogentec (Seraing, Belgium). PCR reactions (25 µL) were performed using 2X SYBR[®] Green Universal QPCR Master Mix (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands), with 2 µL of cDNA solution and 300 nM final concentration of each primer. PCR conditions were as follows: 95 °C for 30 s, 51 °C for 45 s, 72 °C for 30 s (40 cycles). Assays were performed in triplicate and GD3S transcript expression level was normalized to HPRT using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method described by Livak and Schmittgen [32]. Serial dilutions of the appropriate positive control cDNA sample were used to create standard curves for relative quantification and negative control reactions were performed by replacing cDNA templates by sterile water.

3.4. Analysis of Cell Surface Ganglioside by Flow Cytometry

Cells were washed in cold PBS and detached by EDTA 2 mM. Cells were incubated at 4 °C during 1 h with anti-G_{D3} R24 (1:100) and anti-G_{T3} A2B5 (1:10), diluted in phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% bovine serum albumin (PBS-BSA) (Sigma-Aldrich). After washing with PBS-BSA, cells were incubated on ice during 1 h with Alexa Fluor 488 anti-IgG or anti-IgM (1:500). After two washes in PBS-BSA, cells were analyzed by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson). Control experiments were performed using secondary antibody alone.

3.5. Extraction and Preparation of Glycolipids

Twenty dishes (10 cm diameter) of cultured cells were washed twice with ice-cold PBS and cells were scraped and sonicated on ice in 200 µL of water. 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 dryness [39]. Samples were reconstituted in CH₃OH/H₂O (1:1, v/v) and applied to a reverse phase C₁₈

cartridge (Waters, Milford, MA, USA) equilibrated in the same solvent. After washing with CH₃OH/H₂O (1:1, v/v), GSLs were eluted by CH₃OH, CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v) and CHCl₃/CH₃OH (2:1, v/v).

3.6. Mass Spectrometry Analysis of GSL

Prior to mass spectrometry analysis, GSL were permethylated according to Ciucanu and Kerek [40]. Briefly, compounds were incubated 2 h in a suspension of 200 mg/mL NaOH in dry DMSO (300 µL) and CH₃I (200 µL). 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. MALDI-MS and MS/MS analyses of permethylated GSL were performed on 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) mass spectrometer, operated in the reflectron mode. For MS acquisition, 5 µL of diluted permethylated samples in CHCl₃ were mixed with 5 µL of 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix solution (10 mg/mL dissolved in CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v)). The mixtures (2 µL) were then spotted on the target plate and air dried. MS survey data comprises a total of 50 sub-spectra of 1500 laser shots. Peaks observed in the MS spectra were selected for further MS/MS. CID MS/MS data comprises a total of 100 sub-spectra of 3000 laser shots. Two or more spectra can be combined post-acquisition with mass tolerance set at 0.1 Da to improve S/N ratio. The potential difference between the source acceleration voltage and the collision cell was set to 1 kV and argon was used as collision gas.

3.7. Analysis of Oligo-Sialylated Sequences by HPLC

In order to minimize internal fragmentation of polysialylated sequences, sialylated glycan samples were directly coupled to 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene (DMB) without prior mild hydrolysis [35]. Samples were incubated for 2.5 h at 50 °C in 50 µL of a DMB reagent solution (2.7 mM DMB, 9 mM sodium hydrosulfite, and 0.5 mM β-mercaptoethanol in 20 mM TFA). 10 µL of 1 M NaOH was then added and the reaction mixtures further incubated in the dark at room temperature for 1 h. Samples were stored at 4 °C before analysis. DMB-derivatized sialic acid oligomers were separated on a HPLC apparatus fitted with a CarboPac PA-100 column (Dionex). CarboPac column was eluted at 1 mL/min with a concentration gradient of 2 to 32% of 1 M NaNO₃ in water. Elution was monitored by an on line fluorescence detector set at wavelengths of 373 nm for excitation and 448 nm for emission.

4. Conclusions

ST8Sia I is the only sialyltransferase able to transfer a sialic acid residue onto G_{M3} to synthesize G_{D3} and is therefore considered as the G_{D3} synthase. The animal ST8Sia family can be divided in three groups according to the capacity to carry out poly-, oligo- and mono-α2,8-sialylation and phylogenetic analyses have clearly associated ST8Sia I to the group of mono-α2,8-sialyltransferase [41]. However, by expression cloning of the human G_{T3} synthase, Nakayama and co-workers have underlined the ability of ST8Sia I to synthesize G_{T3} from G_{D3} [6]. Here, we show, for the first time, that ST8Sia I is able to synthesize unusual highly sialylated lactosylceramide derivatives substituted by up to

5 Neu5Ac residues and identified as G_{Q3} (II³Neu5Ac₄-Gg₂Cer) and G_{P3} (II³Neu5Ac₅-Gg₂Cer), showing that this enzyme can act as an oligosialyltransferase.

In humans, the *ST8SIA1* gene is located on chromosome 12, in p12.1-p11.2 and consists of five coding exons spanning over 135 kbp of genomic DNA [14]. Two initiation codons on the first exon lead to two protein isoforms of 356 or 341 amino acids that differ in their N-terminal part. However, the relative capacity of each isoform to transfer more than two sialic acid residues has not been evaluated. By *in vitro* sialyltransferase assay, a recombinant soluble form of the human G_{D3} synthase was shown to synthesize, after a long period of incubation, higher polysialogangliosides, which presumably have more than three sialic acid residues but these compounds were not characterized [6].

From a general point of view, the occurrence of oligosialylation associated with glycolipids has been rarely reported so far. One exception is the recent identification of polysialogangliosides containing α 2,8-linked polyNeu5Ac with DPs ranging from 2 to at least 16 in sea urchin sperm head [42]. However, to our knowledge, tetra- and pentasialylated lactosylceramide derivatives have never been described in human tissues and cells. Although SK-Mel 28 cells that constitutively express high levels of GD3S, synthesize high quantities of G_{D3} and G_{T3}, we were not able to detect these unusual tetra- and pentasialylated gangliosides in this cell line. Indeed, in our cellular model, these unusual structures were obtained after transfection of GD3S cDNA and may not exist in natural conditions, and the depletion of G_{M3} in GD3S+ MCF-7 clones could explain that GD3S used other gangliosides, such as G_{T3} or G_{Q3}, as acceptor substrates. Nevertheless, one may thus expect that revisiting the structure of human gangliosides with recent high sensitivity mass spectrometry techniques will uncover oligosialylated glycolipids in cancerous cell lines and in normal or pathological tissues.

Acknowledgments

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. Florent Colomb is supported by a PhD fellowship from "Vaincre la mucoviscidose".

References

1. Svennerholm, L. Ganglioside designation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1980**, *125*, 11–19.
2. Zeng, G.; Yu, R.K. Cloning and transcriptional regulation of genes responsible for synthesis of gangliosides. *Curr. Drug Targets* **2008**, *9*, 317–324.
3. Yamamoto, A.; Haraguchi, M.; Yamashiro, S.; Fukumoto, S.; Furukawa, K.; Takamiya, K.; Atsuta, M.; Shiku, H.; Furukawa, K. Heterogeneity in the expression pattern of two ganglioside synthase genes during mouse brain development. *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 26–34.
4. Yu, R.K.; Macala, L.J.; Taki, T.; Weinfield, H.M.; Yu, F.S. Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain. *J. Neurochem.* **1988**, *50*, 1825–1829.
5. Yamashita, T.; Wada, R.; Sasaki, T.; Deng, C.; Bierfreund, U.; Sandhoff, K.; Proia, R.L. A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9142–9147.

6. Nakayama, J.; Fukuda, M.N.; Hirabayashi, Y.; Kanamori, A.; Sasaki, K.; Nishi, T.; Fukuda, M. Expression cloning of a human GT3 synthase. GD3 and GT3 are synthesized by a single enzyme. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3684–3691.
7. Furukawa, K.; Hamamura, K.; Aixinjueluo, W.; Furukawa, K. Biosignals modulated by tumor-associated carbohydrate antigens novel targets for cancer therapy. *Ann. NY Acad. Sci.* **2006**, *1086*, 185–198.
8. 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. Diagnostic and prognostic value of glycosyltransferase mRNA in glioblastoma multiforme patients. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2006**, *32*, 410–418.
9. Ruan, S.; Lloyd, K.O. Glycosylation pathways in the biosynthesis of gangliosides in melanoma and neuroblastoma cells relative glycosyltransferase levels determine ganglioside patterns. *Cancer Res.* **1992**, *52*, 5725–5731.
10. Ruckhäberle, E.; Rody, A.; Engels, K.; Gaetje, R.; von Minckwitz, G.; Schiffmann, S.; Grösch, S.; Geisslinger, G.; Holtrich, U.; Karn, T.; Kaufmann, M. Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2008**, *112*, 41–52.
11. Nara, K.; Watanabe, Y.; Maruyama, K.; Kasahara, K.; Nagai, Y.; Sanai, Y. Expression cloning of a CMP-NeuAcNeuAc alpha 2-3Gal beta 1-4Glc beta 1-1'Cer alpha 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) from human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 7952–7956.
12. Sasaki, K.; Kurata, K.; Kojima, N.; Kurosawa, N.; Ohta, S.; Hanai, N.; Tsuji, S.; Nishi, T. Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase). *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 15950–15956.
13. Haraguchi, M.; Yamashiro, S.; Yamamoto, A.; Furukawa, K.; Takamiya, K.; Lloyd, K.O.; Shiku, H.; Furukawa, K. Isolation of GD3 synthase gene by expression cloning of GM3 alpha-2,8-sialyltransferase cDNA using anti-GD2 monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 10455–10459.
14. Furukawa, K.; Horie, M.; Okutomi, K.; Sugano, S.; Furukawa, K. Isolation and functional analysis of the melanoma specific promoter region of human GD3 synthase gene. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1627*, 71–78.
15. Harduin-Lepers, A.; Vallejo-Ruiz, V.; Krzewinski-Recchi, M.A.; Samyn-Petit, B.; Julien, S.; Delannoy, P. The human sialyltransferase family. *Biochimie* **2001**, *83*, 727–737.
16. Nara, K.; Watanabe, Y.; Kawashima, I.; Tai, T.; Nagai, Y.; Sanai, Y. Acceptor substrate specificity of a cloned GD3 synthase that catalyzes the biosynthesis of both GD3 and GD1c/GT1a/GQ1b. *Eur. J. Biochem.* **1996**, *238*, 647–652.
17. Kim, Y.J.; Kim, K.S.; Do, S.; Kim, C.H.; Kim, S.K.; Lee, Y.C. Molecular cloning and expression of human alpha2,8-sialyltransferase (hST8Sia V). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, *235*, 327–330.
18. Ichikawa, S.; Sakiyama, H.; Suzuki, G.; Hidari, K.I.; Hirabayashi, Y. Expression cloning of a cDNA for human ceramide glucosyltransferase that catalyzes the first glycosylation step of glycosphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 4638–4643.
19. Nomura, T.; Takizawa, M.; Aoki, J.; Arai, H.; Inoue, K.; Wakisaka, E.; Yoshizuka, N.; Imokawa, G.; Dohmae, N.; Takio, K.; *et al.* Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-Gal:

- Glucosylceramide beta-1,4-galactosyltransferase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 13570–13577.
20. Takizawa, M.; Nomura, T.; Wakisaka, E.; Yoshizuka, N.; Aoki, J.; Arai, H.; Inoue, K.; Hattori, M.; Matsuo, N. cDNA cloning and expression of human lactosylceramide synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1438*, 301–304.
 21. Ishii, A.; Ohta, M.; Watanabe, Y.; Matsuda, K.; Ishiyama, K.; Sakoe, K.; Nakamura, M.; Inokuchi, J.; Sanai, Y.; Saito, M. Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31652–31655.
 22. Nagata, Y.; Yamashiro, S.; Yodoi, J.; Lloyd, K.O.; Shiku, H.; Furukawa, K. Expression cloning of beta 1,4 N-acetylgalactosaminyltransferase cDNAs that determine the expression of GM2 and GD2 gangliosides. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 12082–12089.
 23. Iber, H.; Zacharias, C.; Sandhoff, K. The c-series gangliosides GT3, GT2 and GP1c are formed in rat liver Golgi by the same set of glycosyltransferases that catalyse the biosynthesis of asialo-, a- and b-series gangliosides. *Glycobiology* **1992**, *2*, 137–142.
 24. Yamashiro, S.; Haraguchi, M.; Furukawa, K.; Takamiya, K.; Yamamoto, A.; Nagata, Y.; Lloyd, K.O.; Shiku, H.; Furukawa, K. Substrate specificity of beta 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase *in vitro* and in cDNA-transfected cells. GM2/GD2 synthase efficiently generates asialo-GM2 in certain cells. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 6149–6155.
 25. Amado, M.; Almeida, R.; Carneiro, F.; Levery, S.B.; Holmes, E.H.; Nomoto, M.; Hollingsworth, M.A.; Hassan, H.; Schwientek, T.; Nielsen, P.A.; *et al.* A family of human beta3-galactosyltransferases. Characterization of four members of a UDP-galactose: Beta-N-acetylglucosamine/beta-N-acetyl-galactosamine beta-1,3-galactosyltransferase family. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 12770–12778.
 26. Kitagawa, H.; Paulson, J.C. Differential expression of five sialyltransferase genes in human tissues. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 17872–17878.
 27. Giordanengo, V.; Bannwarth, S.; Laffont, C.; van Miegem, V.; Harduin-Lepers, A.; Delannoy, P.; Lefebvre, J.C. Cloning and expression of cDNA for a human Gal(beta1-3)GalNAc alpha2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *247*, 558–566.
 28. Tsuchida, A.; Ogiso, M.; Nakamura, Y.; Kiso, M.; Furukawa, K.; Furukawa, K. Molecular cloning and expression of human ST6GalNAc III: Restricted tissue distribution and substrate specificity. *J. Biochem.* **2005**, *138*, 237–243.
 29. Harduin-Lepers, A.; Mollicone, R.; Delannoy, P.; Oriol, R. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: A phylogenetic approach. *Glycobiology* **2005**, *15*, 805–817.
 30. Cazet, A.; Groux-Degroote, S.; Teylaert, B.; Kwon, K.M.; Lehoux, S.; Slomianny, C.; Kim, C.H.; Le Bourhis, X.; Delannoy, P. GD3 synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol. Chem.* **2009**, *390*, 601–609.
 31. Ruan, S.; Raj, B.K.; Lloyd, K.O. Relationship of glycosyltransferases and mRNA levels to ganglioside expression in neuroblastoma and melanoma cells. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 514–521.
 32. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.

33. Steenackers, A.; Cazet, A.; Bobowski, M.; Rombouts, Y.; Lefebvre, J.; Guérardel, Y.; Tulasne, D.; Le Bourhis, X.; Delannoy, P. Expression of GD3 synthase modifies ganglioside profile and increases migration of MCF-7 breast cancer cells. *C.R. Chim.* **2012**, *15*, 3–14.
34. Domon, B.; Costello, C.E. A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjug. J.* **1988**, *5*, 397–409.
35. Sato, C.; Inoue, S.; Matsuda, T.; Kitajima, K. Fluorescent-assisted detection of oligosialyl units in glycoconjugates. *Anal. Biochem.* **1999**, *266*, 102–109.
36. Chang, L.-Y.; Harduin-Lepers, A.; Kitajima, K.; Sato, C.; Huang, C.-J.; Khoo, K.-H.; Guérardel, Y. Developmental regulation of oligosialylation in zebrafish. *Glycoconjug. J.* **2009**, *26*, 247–261.
37. Moon, S.K.; Kim, H.M.; Lee, Y.C.; Kim, C.H. Disialoganglioside (GD3) synthase gene expression suppresses vascular smooth muscle cell responses via the inhibition of ERK1/2 phosphorylation, cell cycle progression, and matrix metalloproteinase-9 expression. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 33063–33070.
38. Zhang, X.; Ding, L.; Sandford, A.J. Selection of reference genes for gene expression studies in human neutrophils by real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* **2005**, *6*, 4.
39. Schnaar, R.L. Isolation of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* **1994**, *230*, 348–370.
40. Ciucanu, I.; Kerek, F. Rapid and simultaneous methylation of fatty and hydroxy fatty acids for gas-liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr.* **1984**, *284*, 179–185.
41. Harduin-Lepers, A.; Petit, D.; Mollicone, R.; Delannoy, P.; Petit, J.-M.; Oriol, R. Evolutionary history of the alpha2,8-sialyltransferase (ST8Sia) gene family: Tandem duplications in early deuterostomes explain most of the diversity found in the vertebrate ST8Sia genes. *BMC Evol. Biol.* **2008**, *8*, 258.
42. Miyata, S.; Yamakawa, N.; Toriyama, M.; Sato, C.; Kitajima, K. Co-expression of two distinct polysialic acids, α 2,8- and α 2,9-linked polymers of *N*-acetylneuraminic acid, in distinct glycoproteins and glycolipids in sea urchin sperm. *Glycobiology* **2011**, *21*, 1596–1605.

Sample Availability: Not available.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Conclusion

Nos résultats ont clairement démontré que la double transfection des vecteurs pcDNA3-GM3S et pcDNA3-GD3S n'augmente pas la proportion de la série ganglio des GSL dans les cellules MCF-7. De plus, nous avons montré qu'aucun clone doublement transfecté n'exprime la GM3S, contrairement à ce qui est observé après la première transfection avec le vecteur codant la GM3S. Ce phénomène peut être associé avec un processus d'apoptose dans ces cellules : en effet, nous avons montré précédemment que la sur-expression de la GD3S dans les cellules MCF-7 provoque une accumulation du G_{D1b} , mais la proportion des gangliosides est très faible, en lien avec une faible expression de la GM3S. L'expression de cette enzyme induit l'accumulation du G_{M3} qui est un substrat pour la GD3S. Après sur-expression de la GD3S, les cellules accumulent un niveau important de G_{D1b} , qui pourrait provoquer l'inhibition de la prolifération et la mort des cellules. Il a été précédemment montré que l'augmentation d'expression de la GM1/GD1b synthétase dans la lignée cellulaire de mélanome induit l'accumulation des gangliosides G_{D1b} , G_{T1b} et G_{M1} , avec réduction de la prolifération (Dong et al., 2010). En parallèle, nous avons montré que les clones MCF-7 doublement transfectés présentent une composition de gangliosides particulière avec l'expression de gangliosides G_{D3} , G_{T3} , et G_{Q3} , G_{P3} . Ces résultats démontrent que la GD3S peut se comporter comme une oligosialyltransférase. De plus, l'analyse du statut de phosphorylation des RTKs et l'analyse des tests de prolifération démontrent que les cellules MCF-7 ne sont pas un modèle adapté pour étudier l'effet de l'expression de la GD3S sur le phénotype prolifératif.

3. Nouveau modèle cellulaire MDA-MB-231 sur-exprimant la GD3S

La troisième partie de mon travail s'est inscrite dans la continuité des travaux de Cazet et collaborateurs sur le modèle cellulaire MDA-MB-231 GD3S+. Notre objectif était d'étudier le mécanisme d'activation de c-Met par le G_{D2}. En effet, les résultats obtenus au laboratoire avaient clairement montré l'implication de la partie saccharidique du G_{D2} dans l'activation du récepteur c-Met. En particulier, l'inhibition de la phosphorylation de c-Met dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ par des anticorps dirigés contre la partie saccharidique du G_{D2}, alors que des anticorps anti-G_{D3} n'ont aucun effet, ont clairement démontré la nécessité d'une reconnaissance de la partie glucidique du G_{D2} dans le mécanisme d'activation.

Pour poursuivre ces travaux, nous avons tout d'abord vérifié la phosphorylation de c-Met dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+. En répétant plusieurs fois les expériences de Western Blot, nous n'avons jamais été en mesure de reproduire les résultats de Cazet et collaborateurs et de visualiser la phosphorylation de c-Met dans les clones MDA-MB-231 GD3S+ en conditions de sevrage. En parallèle, nous avons répété les tests de prolifération et les résultats obtenus n'ont pas montré de différences entre les cellules MDA-MB-231 contrôles et les cellules sur-exprimant la GD3S. Nous avons donc décidé de sélectionner de nouveaux clones en repartant de la population polyclonale obtenue en 2008 par Aurélie Cazet. En parallèle, nous avons également retransfecté des cellules MDA-MB-231 WT par le vecteur pcDNA3-GD3S, obtenu une nouvelle population polyclonale résistante à la généticine et sélectionné des clones par une dilution limite. Nous avons sélectionné 60 clones qui ont été analysés par cytométrie en flux. Après l'analyse par cytométrie de flux et qPCR, nous avons sélectionné 2 clones sur-exprimant les gangliosides des séries b et c à la surface cellulaire, et analysé leur statut de phosphorylation des RTKs et la phosphorylation de kinases intracellulaires. Pour analyser les propriétés biologiques des cellules MDA-MB-231 GD3S+, nous avons analysé leurs capacités de prolifération et de migration.

a. Expression des transcrits de la GD3 synthétase dans les cellules MDA-MB-231 transfectées stablement

Nous avons transfecté la lignée MDA-MB-231 par électroporation par le plasmide pcDNA3-GD3S. Après 3 semaines en culture sous pression de sélection en présence de généticine, nous avons obtenu une population de cellules résistantes. Nous avons analysé le niveau d'expression transcriptionnelle de l'enzyme GD3S dans la nouvelle population résistante et dans la population polyclonale obtenue en 2008. La **figure 27** montre que l'expression de la GD3S est environ 40 à 50 fois plus importante dans la nouvelle population obtenue en 2012 et dans la population polyclonale de 2008, en comparaison avec les cellules wild type et Mock.

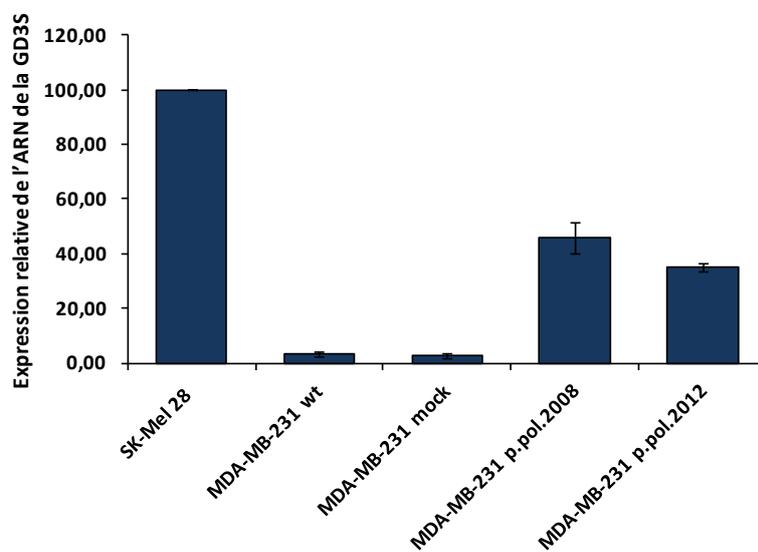


Figure 27 : Quantification relative par qPCR des transcrits de la GD3 synthétase après transfection stable des cellules MDA-MB-231. L'expression de la GD3 synthétase a été normalisée par celle du gène HPRT et le niveau d'expression de transcrits de la GD3 synthétase dans la lignée SK-Mel-28 sert de référence.

Dans l'étape suivante, nous avons effectué une sélection clonale par dilution limite à partir des deux populations polyclonales. Nous avons obtenu 60 clones que nous avons criblés par cytométrie en flux pour l'expression du G_{D2} . Enfin, nous avons sélectionné deux clones, le clone 3A à partir de la population polyclonale de 2008, et le clone 33B à partir de la population polyclonale de 2012. Dans ces clones, nous avons vérifié le niveau transcriptionnel de la GD3S et nous avons analysé le profil des gangliosides par cytométrie en flux.

b. Expression de la GD3S et des gangliosides dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ après sélection clonale

Nous avons vérifié l'expression des ARNm de la GD3S dans les deux clones sélectionnés. Comme le montre la **figure 28**, les ARNm de la GD3S sont environ 1100 plus exprimés dans les clones 3A et 300 fois plus dans le clone 33B en comparaison avec les cellules MDA-MB-231 contrôles.

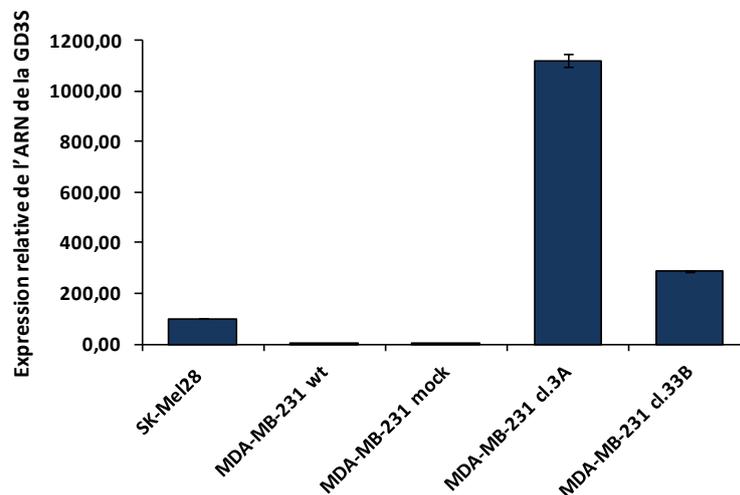


Figure 28 : Quantification relative par qPCR (SYBR Green) des transcrits de la GD3 synthétase après sélection clonale les cellules MDA-MB-231. L'expression relative de la GD3S a été normalisée par rapport à celle du gène HPRT et est exprimée par rapport à son niveau d'expression dans les cellules SK-Mel-28.

Nous avons ensuite analysé le profil d'expression des gangliosides par cytométrie en flux. Les résultats présentés sur la **figure 29** montrent que les gangliosides de la série a- tels que le G_{M1} présentent un niveau plus faible dans les clones par rapport aux cellules contrôles. Par ailleurs, dans les cellules transfectées, nous avons détecté une accumulation des gangliosides de la série b (G_{D3} , G_{D2} , G_{D1b}) et de la série c (G_{T3}) qui sont pas présents dans les cellules contrôles. Ces résultats ont confirmé les résultats obtenus précédemment par Aurélie Cazet et collaborateurs (Cazet *et al.*, 2009). Les résultats obtenus sur le modèle cellulaire MCF-7 confirment que l'expression de la GD3S est suffisante pour modifier le profil des gangliosides à la surface cellulaire, conduisant à l'expression des gangliosides di- et trisialylés mais aussi diminuant l'expression des gangliosides monosialylés.

c. Statut de phosphorylation des RTKs dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+

Plusieurs études ont montré que les gangliosides sont impliqués dans la régulation des récepteurs à activité tyrosine kinase et les voies de signalisation associées (chapitre IV.3.a). Nous avons donc analysé le statut de phosphorylation de 42 RTKs dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ par phospho-RTK array. Comme le montre la **figure 30**, nous avons détecté une forte phosphorylation des récepteurs VEGFR1, EphA2 et du récepteur Axl en conditions de sevrage. De plus, nous avons observé une augmentation de phosphorylation des récepteurs EGFR par rapport aux cellules contrôles.

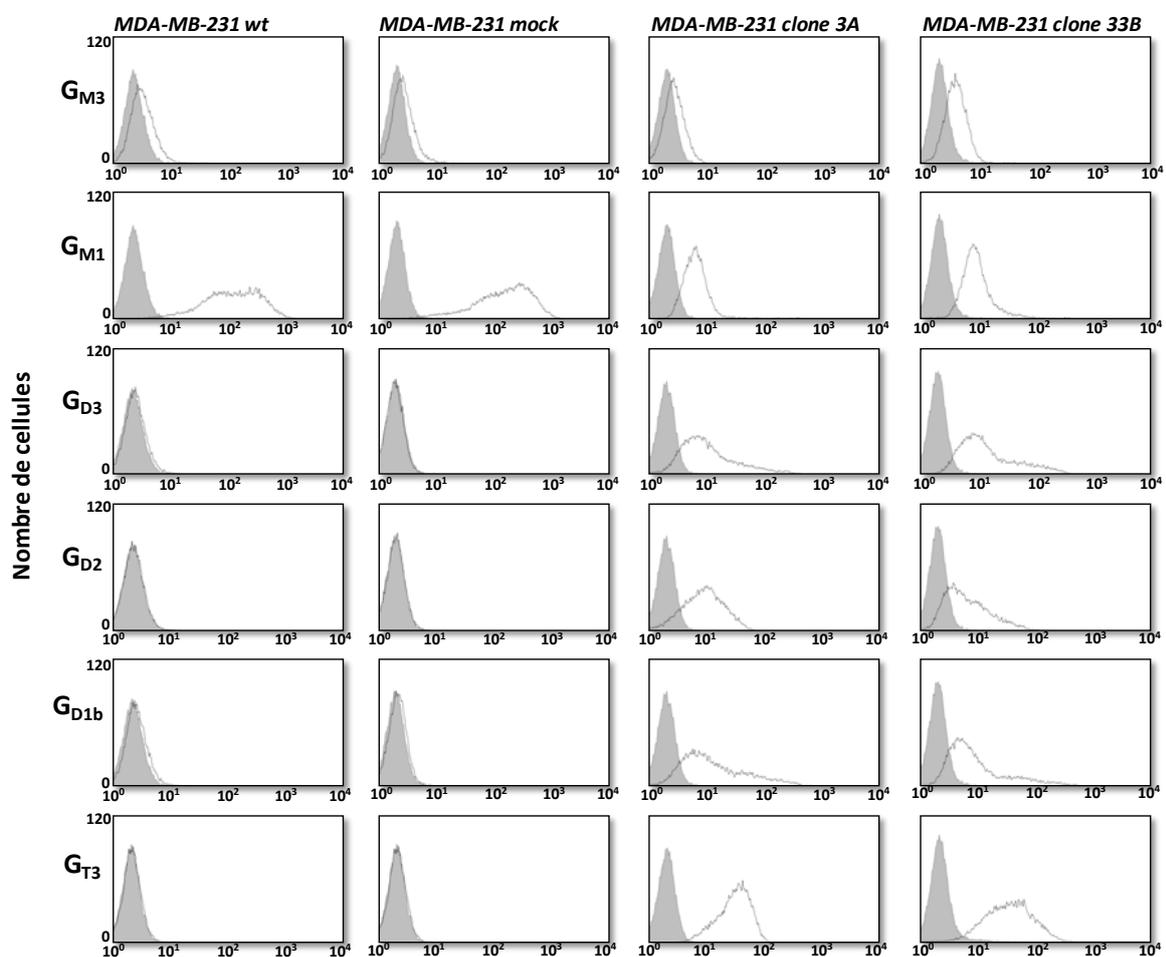


Figure 29 : Analyse en cytométrie en flux du profil d'expression des gangliosides à la surface de cellules MDA-MB-231 après sélection clonale. Les pics colorés en gris représentent le contrôle négatif (incubation avec anticorps secondaire seul), les lignes noires représentent les signaux observés après incubation des cellules avec un anticorps anti-G_{M3} (1 :75), anti-G_{D3} (1 :100), anti-G_{D2} (1 :10) , anti-G_{D1b} (1 :100), anti-G_{T3} (1 :10), la sous unité B cholérique couplée au FITC été utilisée pour détecter le G_{M1} (dilution au 1/1000).

Ces résultats confirment donc que la modification des gangliosides membranaires est impliquée dans la régulation de la phosphorylation des RTKs. Par contre, ce nouveau modèle cellulaire présente un profil différent de phosphorylation des RTKs en comparaison avec les cellules MDA-MB-231 GD3S+ obtenues par A. Cazet dans lesquelles était essentiellement observée une phosphorylation des récepteurs c-Met. Comme les récepteurs RTKs sont impliqués dans les processus de prolifération et de migration cellulaires, nous avons ensuite analysé la prolifération et la migration des cellules MDA-MB-231 GD3S+.

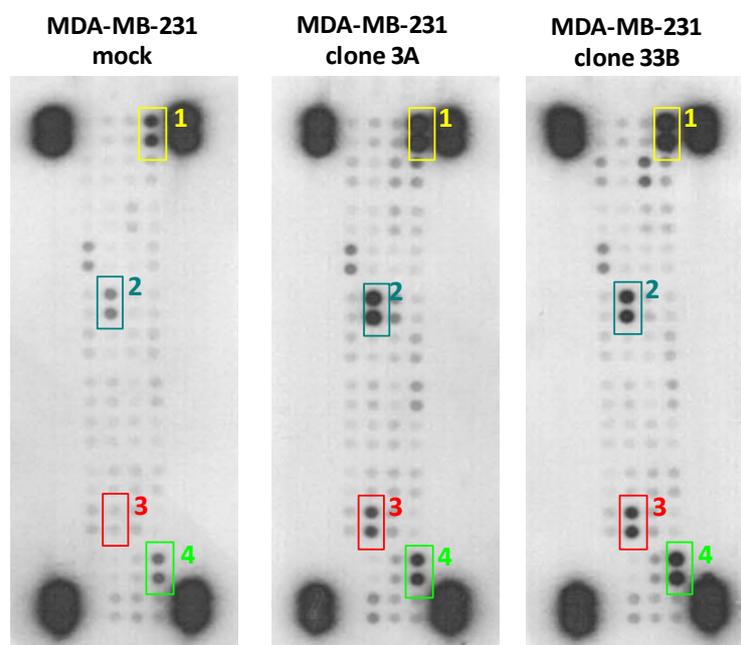


Figure 30 : Analyse du statut de phosphorylation des RTKs dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ et dans les cellules contrôles (mock) en conditions de sevrage (0% SBF). Pour analyser la phosphorylation en conditions de sevrage, les cellules ont été cultivées 48h sans sérum. Les points noirs dans le coin de la membrane représentent le contrôle positif. 1: EGFR ; 2 : VEGFR1 ; 3 : EphA2 ; 4 : Axl.

d. Prolifération et migration des cellules MDA-MB-231 GD3S+

Afin de déterminer l'implication des RTKs sur la prolifération cellulaire, nous avons effectué un test de prolifération des cellules MDA-MB-231 GD3S+ en comparaison avec les cellules contrôles. Les analyses de prolifération ont été effectuées grâce au test MTS dans deux conditions différentes : milieu contenant du SBF 10% (conditions normales) et milieu avec du SBF 0% (sevrage). Les résultats de la prolifération effectuée en conditions normales ont

montré une diminution de la prolifération dans les derniers jours de test. Cette diminution peut s'expliquer par la confluence extrême des cellules dans les derniers jours du test (**Fig. 31A**). Pour les cellules MDA-MB-231 cultivées en conditions de sevrage, nous n'avons pas observé de différence de prolifération pour les deux clones sur-exprimant la GD3 synthétase par rapport aux cellules MDA-MB-231 contrôles.

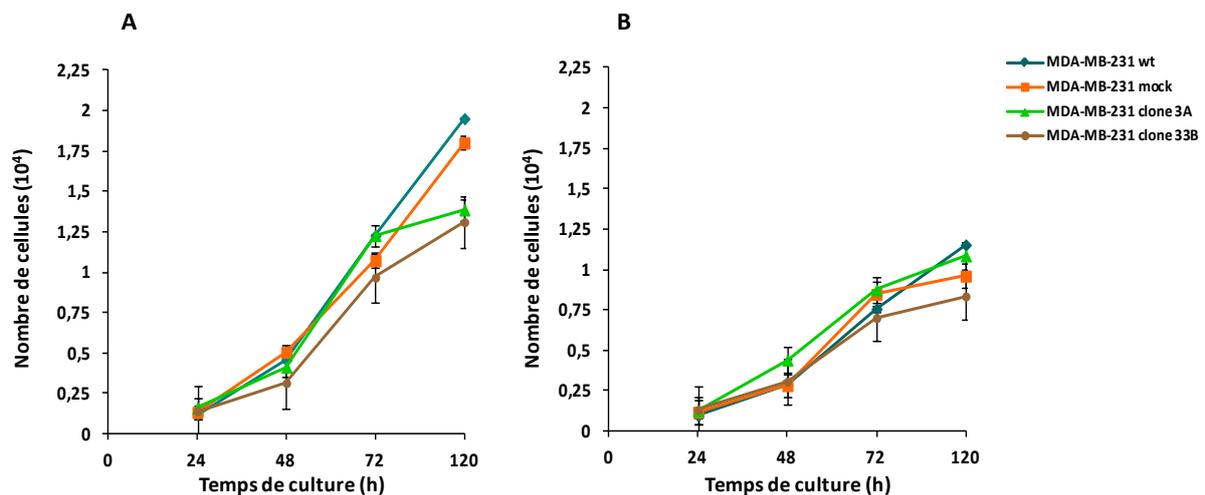


Figure 31 : Effet de la sur-expression de la GD3S sur la prolifération, analysée par un test colorimétrique MTS. Les cellules MDA-MB-231 ont été cultivées avec des concentrations de 10% (A) et 0% (B) de SBF dans le milieu. Le nombre de cellules a été estimé après 24, 48, 72, 96 et 120 heures par l'ajout de MTS.

Pour l'analyse de la migration des cellules MDA-MB-231GD3S+, nous avons utilisé le système Transwell. Les cellules ont été cultivées dans un milieu contenant 0,1% de SBF et le test de migration a été effectué après 12 heures. Les résultats présentés dans la **figure 32** montrent que nous n'avons pas détecté de différence significative de migration entre les deux clones et les cellules contrôles.

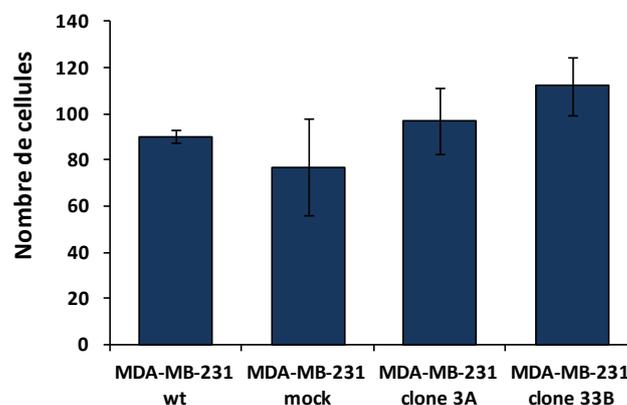


Figure 32 : Effet de la sur-expression de la GD3S sur la migration des cellules MDA-MB-231. Les cellules ont été ensemencées sur la face supérieure d'un puits Transwell et cultivées 12 heures dans le milieu DMEM supplémenté avec 0,1% de SBF. Les cellules qui ont traversé le filtre ont été comptées au microscope avec un grossissement de 20x.

Nous avons également analysé la migration cellulaire par test de blessure, technique dans laquelle les cellules maintiennent des contacts cellules-cellules. Nous avons cultivé les cellules dans le pochoir en silicone stérile qui été collé dans la plaque 6 puits. Pour une bonne adhérence des cellules et pour obtenir une monocouche cellulaire, les cellules MDA-MB-231 ont tout d'abord été cultivées dans le milieu en présence de 10% de SBF. Ensuite, nous avons changé le milieu pour cultiver les cellules en conditions de sevrage. L'étape suivante était de retirer le pochoir de silicone pour obtenir une blessure que nous avons observée au microscope (**Fig. 33**). Ensuite, nous avons observé la migration des cellules après 12 heures, cette observation ne montrait pas de différences significatives de la migration des cellules MDA-MB-231 GD3S+ par rapport aux cellules MDA-MB-231 contrôles.

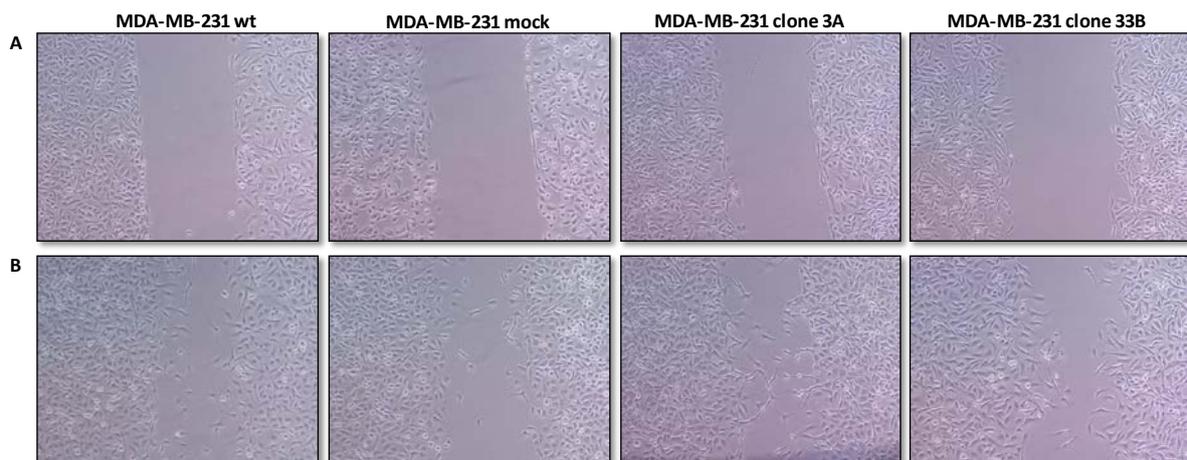


Figure 33 : Test de blessure : les cellules MDA-MB-231 sont cultivées en boîte de Pétri sur des inserts en silicone (ibid., Martinieriez, Germany) composés de deux chambres (surface de croissance cellulaire : 0.22 cm²) séparées par une épaisseur de 500 µm. Après attachement cellulaire quelques heures à 37°C, les cellules ont été mises en conditions de sevrage pendant une nuit. Par la suite, l'insert a été retiré pour former la blessure. Des photos ont été prises dans une localisation précise à 0 (A) et 12 (B) heures afin de visualiser l'évolution de la blessure à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse Ti-U.

e. Statut de phosphorylation des kinases dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+

Les résultats des tests de prolifération et de migration effectués sur les nouveaux clones n'ont pas montré de différences entre les cellules MDA-MB-231 GD3S+ et les cellules con-

trôles. Nous avons donc décidé d'analyser le profil de phosphorylation des kinases par phospho-kinase array (Fig. 34). Les résultats obtenus ne montrent aucune différence importante entre les deux clones et les cellules contrôles en conditions de sevrage. Les cellules présentent une forte phosphorylation des protéines p53, H5P6O, WNK1 et PRAS40. Nous avons détecté une légère diminution de la phosphorylation des protéines ERK1/2 dans les clones 3A et 33B.

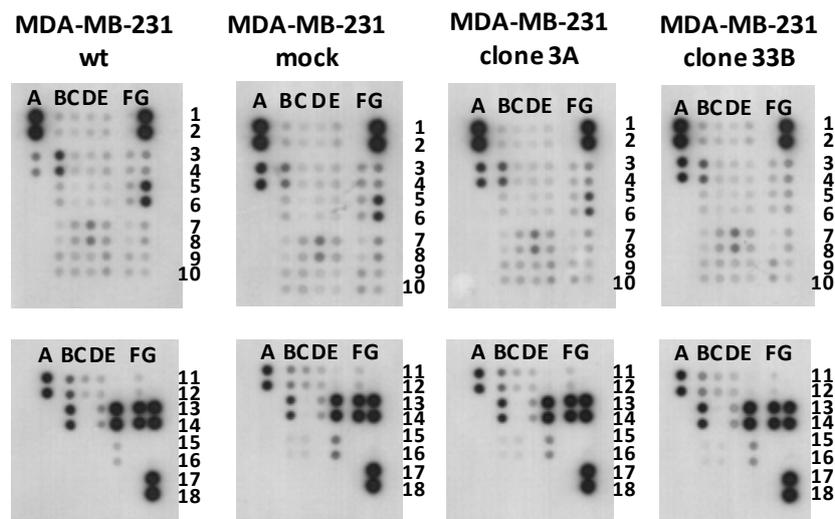


Figure 34 : Analyse du statut de phosphorylation des kinases dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ et dans les cellules contrôles en conditions de sevrage (0% SBF). Pour analyser la phosphorylation en conditions de sevrage, les cellules ont été cultivées 48h sans sérum dans le milieu de culture. A1,A2- contrôle positif ;A3,A4-PRAS40; A9,A10- contrôle négatif; A11,A12-HSP60; A17,A18- contrôle négatif; B1,B2-Hck; B3,B4-Chk-2; B5,B6-FAK; B7,B8-PDGFR β ; B9,B10-STAT5a/b; B11,B12-STAT3; B13,B14-WNK1; B15,B16-PYK2; C1,C2-Fyn; C3,C4-Yes; C5,C6-Fgr; C7,C8-STAT6; C9,C10-STAT5b; C11,C12-STAT3; C13,C14-p26; C15,C16-PLC- γ 1; D1,D2-Src; D3,D4-Lyn; D5,D6-Lck; D7,D8-STAT2; D9,D10-STAT5a; D11,D12-p70 S6 Kinase; D13,D14-RSK1/2/3; D15,D16-eNOS; E1,E2-TOR; E3,E4-CREB; E5,E6-HSP27; E7,E8-AMPK α 2; E9,E10- β -Catenin; E11,E12-p60 S6 Kinase; E13,E14-p53; E15,E16-c-Jun; F3,F4-EGFR; F5,F6-MSK1/2; F7,F8-AMPK α 1; F9,F10-Akt; F11,F12-Akt; F13,F14-p53; G1,G2- I contrôle positif; G3,G4-p38 α ; G5,G6-ERK1/2; G7,G8-JNK; G9,G10-GSK-3 α/β ; G13,G14-p53; G15,G16- contrôle positif.

Après avoir effectué l'analyse de tous les résultats obtenus sur le nouveau modèle cellulaire MDA-MB-231 GD3S+ qui ne présente pas de phénotype prolifératif et migratoire augmenté par rapport aux cellules contrôles, nous avons effectué une nouvelle fois une analyse de cytométrie en flux pour vérifier le profil gangliosidique. L'analyse confirme la présence des gangliosides des séries b et c. Nous avons également analysé à nouveau le statut de phos-

phorylation des RTKs, et les résultats obtenus n'ont pas montré de différences entre les deux clones GD3S+ et cellules contrôles. De plus, nous n'avons pas détecté de phosphorylation des récepteurs VEGFR1, EphA2 et Axl.

Conclusion

Pour conclure cette troisième partie de nos travaux, nous avons pu confirmer que la GD3S est une enzyme clef qui contrôle la biosynthèse des gangliosides des séries b et c. Nous avons montré que le changement de composition des gangliosides est corrélé avec un changement du statut de phosphorylation des RTKs. Par contre, nous avons observé que le phénotype prolifératif et migratoire des clones MDA-MB-231 GD3S+ n'est pas stable, tout comme la phosphorylation des RTKs. Le modèle cellulaire MDA-MB-231 GD3S+ obtenu par A. Cazet a été stable et a présenté les mêmes propriétés pendant 3 ans, alors que le même modèle cellulaire obtenu en 2012 est resté stable pendant seulement quelques mois. De plus, après sélection clonale à partir de la population polyclonale de 2012, nous avons sélectionné des clones qui présentent un profil de phosphorylation différent par rapport aux clones obtenus précédemment par A. Cazet qui présentaient essentiellement une phosphorylation augmentée de c-Met (Cazet et al., 2010). Ces résultats montrent clairement que la transfection du même vecteur dans le même modèle cellulaire peut après sélection clonale générer des clones présentant un phénotype cellulaire différent. Au vu de ces résultats, il semble nécessaire pour poursuivre ces travaux d'utiliser une autre méthode de vectorisation telle que l'infection par lentivirus, plus efficace et permettant d'éliminer les étapes fastidieuses de sélection clonale.

Discussion et perspectives

I. Effet de l'expression de la GD3S sur le développement de la tumeur

mammaire

La GD3S est la seule enzyme qui contrôle la biosynthèse des gangliosides des séries b- et c qui sont impliqués dans la carcinogenèse des cellules d'origine neuro-ectodermique et du cancer du poumon à petites cellules (Aixinjueluo et al., 2005; Furukawa et al., 2006). En particulier, le G_{D3} est considéré comme un antigène associé au mélanome. La sur-expression de la GD3S induit l'accumulation de G_{D3} dans les cellules de mélanome SK-Mel-28-N1. Il a été clairement montré que ces changements de composition en gangliosides sont impliqués dans les capacités invasives de ces cellules (Hamamura et al., 2005). De même, l'expression de la GD3S dans la lignée de cancer de poumon à petites cellules SK-LC-17 conduit à l'accumulation du G_{D2} et du G_{D3} . L'expression de ces gangliosides est associée avec une augmentation de la prolifération et l'invasion des cellules SK-LC-17 (Yoshida et al., 2001). De plus, l'utilisation d'anticorps anti- G_{D2} induit l'inhibition de la prolifération, ce qui indique un rôle spécifique du G_{D2} dans le phénotype invasif de ces cellules (Aixinjueluo et al., 2005). Concernant le cancer du sein, Marquina et collaborateurs ont montré une augmentation significative du niveau d'expression du G_{D3} , de sa forme O-acétylée mais aussi du G_{T3} dans les carcinomes mammaires infiltrants (Marquina et al., 1996). Cette sur-expression s'accompagne d'une augmentation d'expression du gène *ST8SIA1*, codant la GD3S, dans les tumeurs mammaires ER négatives (Ruckhäberle et al., 2008). Enfin, dans notre laboratoire nous avons montré que les cellules MDA-MB-231 sur-exprimant la GD3S présentent un phénotype prolifératif et migratoire augmenté par rapport aux cellules WT. Ce phénotype est lié à l'activation spécifique du récepteur c-Met et des voies de signalisation intracellulaires MEK/ERK et PI3K/AKT (Cazet et al., 2009 ; 2010).

1. Rappel des résultats obtenus

Pour déterminer si le phénomène prolifératif observé dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ est généralisable à d'autres lignées cancéreuses mammaires, nous avons créé un nouveau modèle de cellules MCF-7 exprimant la GD3S. En comparaison avec les cellules MDA-MB-231 qui appartiennent au sous type moléculaire « Claudin-low » (ER-, PR-, HER-, Claudin 3, 4, 7 low) les cellules MCF-7 appartiennent au sous type « Luminal A » (ER+, PR +/-, HER-) (Holliday and Speirs, 2011). Nous avons démontré que l'expression de la GD3S dans les cellules MCF-7 ne modifie pas de façon significative la prolifération cellulaire mais les cellules MCF-7 GD3S+ présentent une capacité de migration accrue (Steenackers et al., 2012). De plus, ces cellules présentent un profil gangliosidique différent de celui des cellules MDA-MB-231 GD3S+ : les cellules MCF-7 accumulent majoritairement le G_{D1b} à la membrane plasmique (**Article 1**). Par ailleurs, nous avons montré que l'expression de la GD3S dans les cellules MCF-7 induit l'accumulation des gangliosides des séries b et c, mais aussi des gangliosides portant quatre et cinq résidus d'acide sialique (G_{Q3} et G_{P3}), ce qui indique que la GD3S a une activité d'oligosialyltransférase dans ces cellules (Steenackers et al., 2012).

Nous avons également poursuivi nos travaux sur le modèle cellulaire MDA-MB-231. Du fait de la perte du phénotype prolifératif des cellules MDA-MB-231 GD3S+ créées précédemment dans notre équipe, nous avons exprimé la GD3S dans les cellules MDA-MB-231 pour développer de nouveaux clones présentant un phénotype prolifératif. Nous avons montré que le nouveau modèle cellulaire MDA-MB-231 GD3S+ accumule les gangliosides des séries b- et c- à la surface cellulaire, et que ces cellules présentent une phosphorylation de certains RTKs tels que VEGFR1, EphA2 et Axl. Malgré ces résultats, le nouveau modèle cellulaire MDA-MB-231 GD3S+ ne présente pas de phénotype prolifératif, et la phosphorylation du récepteur à activité tyrosine kinase c-Met n'est plus détectée.

2- L'expression de la GD3S dans les différentes lignées cellulaires

a- La GD3 synthétase contrôle l'expression des gangliosides complexes à la membrane plasmique

Les résultats présentés dans ce manuscrit confirment que le niveau d'expression de la GD3S est un facteur critique qui contrôle l'expression des gangliosides complexes à la surface cellulaire, mais d'autres GTs peuvent également jouer un rôle important dans la détermination de la composition en gangliosides pour chaque type cellulaire. L'analyse par cytométrie en flux et spectrométrie de masse démontre que dans les cellules MCF-7, l'enzyme GD3S conduit à l'accumulation de gangliosides des séries b et c, où le G_{D1b} est le ganglioside majeur (Steenackers et al., 2012). Par contre, la sur-expression de la même enzyme dans la lignée cellulaire MDA-MB-231 provoque également l'accumulation de gangliosides complexes, mais le ganglioside principalement exprimé est le G_{D2} (Cazet et al., 2010). La suppression de la GD3S ne conduit pas au même profil gangliosidique dans ces différentes lignées, ce qui s'explique vraisemblablement par des différences dans la nature des gangliosides « substrats » exprimés dans ces cellules. Il a déjà été montré que les cellules MDA-MB-231 présentent une quantité 4 fois supérieure de gangliosides et une quantité 18 fois supérieure de G_{M3} en comparaison des cellules MCF-7 (Nohara et al., 1998). Ces résultats ont été confirmés par une analyse en spectrométrie de masse des GSLs qui a montré que les cellules MCF-7 présentent une forte expression de globosides tels le G_{b3} et le G_{b4} , et une faible proportion des gangliosides par rapport aux cellules MDA-MB-231 (Steenackers et al., 2012 ; Cazet et al., 2009). Ces différentes proportions de gangliosides et de globosides peuvent s'expliquer par des différences d'expression de la GM3S (ST3Gal V), qui est faiblement exprimée dans les cellules MCF-7 en comparaison avec les cellules MDA-MB-231 (Cazet et al., 2009). De plus, les cellules MCF-7 WT et MDA-MB-231 WT présentent uniquement l'expression des gangliosides de série a, mais leur composition n'est pas identique, les cellules MCF-7 WT expriment principalement du G_{M1} , par contre les cellules MDA-MB-231 WT expriment majoritairement du G_{M2} (Steenackers et al., 2012 ; Cazet et al., 2009) (**Fig. 35**).

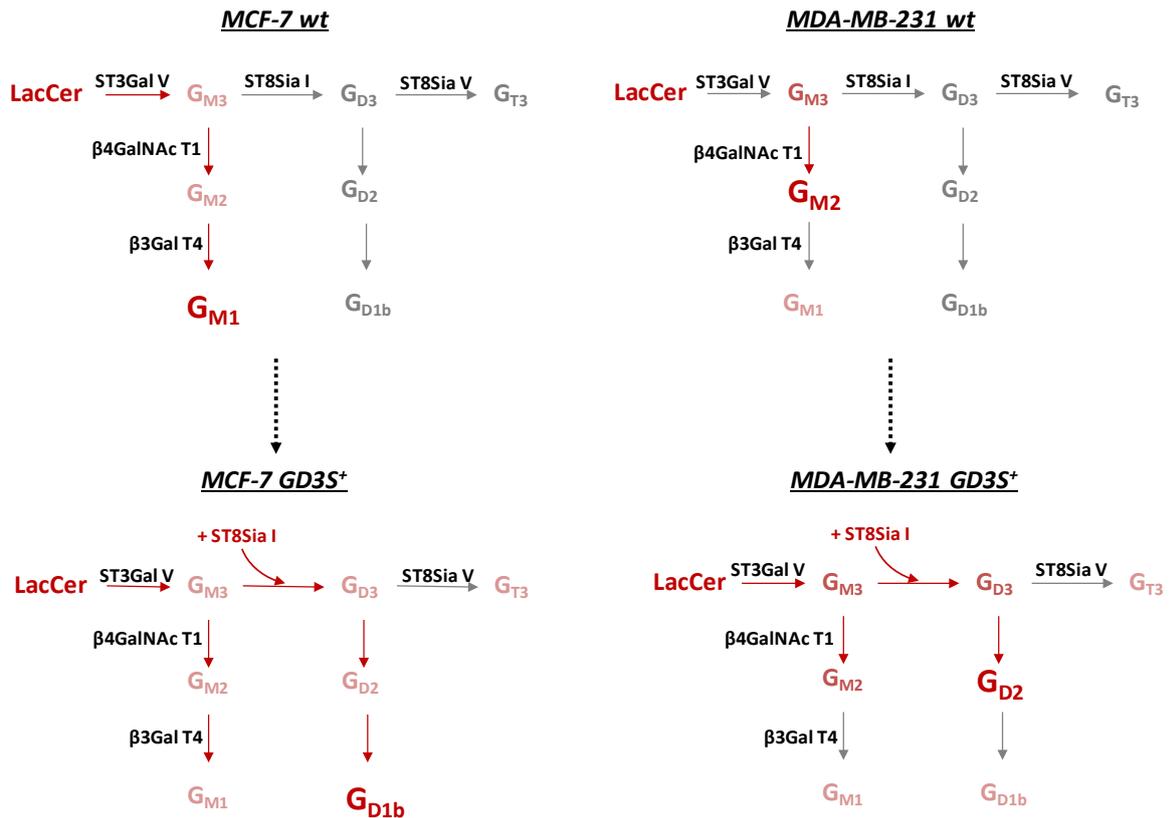


Figure 35 : Schéma général de la composition et de la biosynthèse des gangliosides dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 avant et après transfection. Les cellules MCF-7 WT et MDA-MB-231 WT expriment les gangliosides de série a-, par contre la sur-expression de la GD3S dans ces lignées cellulaires induit l'accumulation des gangliosides de la série b-.

Ces différences pourraient être liées à des différences d'expression du gène de la $\beta 3\text{GalT4}$ qui convertit le $\text{G}_{\text{M}2}$ en $\text{G}_{\text{M}1}$.

L'expression du $\text{G}_{\text{D}1\text{b}}$ dans les cellules MCF-7 GD3S^+ et du $\text{G}_{\text{D}2}$ dans les cellules MDA-MB-231 GD3S^+ suggère que l'expression du gène codant la $\beta 3\text{GalT4}$ joue un rôle principal dans la composition finale des gangliosides dans ces lignées cellulaires. L'effet de la sur-expression de la GD3S sur l'expression des gangliosides a également été décrit dans d'autres lignées cellulaires, comme la lignée du mélanome SK-Mel-28, de neuroblastome SH-SY5Y, de cancer de poumon à petites cellules SK-LC-17 ou de phéochromocytome PC12 (Ruan et al., 1999; Fukumoto et al., 2000; Hamamura et al., 2005). Par exemple, la sur-expression de la GD3S dans la lignée cellulaire SK-Mel-28-N1 induit l'accumulation du $\text{G}_{\text{D}3}$, par contre la sur-expression de cette même enzyme dans la lignée de neuroblastome SH-SY5Y induit une forte expression du $\text{G}_{\text{D}2}$ (Ruan et al., 1999; Hamamura et al., 2005). Nous avons montré que

l'expression de la GD3S dans les deux différentes lignées cellulaires induit un changement de profil gangliosidique mais la composition finale est dépendante de l'expression et de l'activité d'autres glycosyltransferases.

En parallèle, nous avons montré que dans les cellules MCF-7 GD3S+, la GD3S est capable de synthétiser le G_{T3} à partir du G_{D3} , mais aussi des gangliosides inhabituels tels que des structures tétra- (G_{Q3}) et penta-sialylées (G_{P3}) (Steenackers et al., 2012). De même, dans les clones MDA-MB-231, l'expression de la GD3S induit l'accumulation des gangliosides de série c-. Précédemment, l'équipe de Nakayama avait montré que la GD3S peut également avoir la fonction de GT3 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). L'analyse de l'activité enzymatique de la GD3S démontre que cette enzyme utilise la structure glycanique terminale Neu5Ac $\alpha 2$ -3Gal des gangliosides, ce qui induit les substrats accepteurs G_{M3} , G_{M1b} , G_{D1b} et G_{T1b} . De fait, la GD3S ne catalyse seulement pas la formation de G_{D3} mais aussi de G_{D1c} , G_{T1a} et G_{Q1b} *in vivo* (Nara et al., 1994). Enfin, une autre $\alpha 2,8$ -sialyltransférase, ST8Sia V est majoritairement impliquée dans la synthèse des gangliosides G_{T3} , G_{D1c} , G_{T1a} , et G_{Q1b} . Par contre, aucune activité de ST8Sia V envers le G_{M3} n'a été détectée (Kim et al., 1997). La GD3S est la seule enzyme capable de synthétiser le G_{D3} , mais est également capable de convertir les gangliosides de série a- en gangliosides des séries b- et c-, et peut aussi catalyser la formation de gangliosides avec 4 et 5 résidus d'acides sialique ; la GD3S peut donc être considérée comme une oligo-sialyltransférase.

b- Effet de l'expression de la GD3S dans les lignées cellulaires du cancer du sein sur la prolifération et la migration des cellules

Comme nous l'avons vu, les travaux effectués pendant ma thèse sur le modèle cellulaire MCF-7 démontrent que ces cellules présentent un profil gangliosidique différent en comparaison des cellules MDA-MB-231, à la fois dans les cellules WT et les clones sur-exprimant la GD3S. La sur-expression de la GD3S dans les cellules MCF-7 n'entraîne pas de modifications de leur prolifération, de plus les cellules MCF-7 GD3S+ ne prolifèrent pas en l'absence de sérum contrairement aux cellules MDA-MB-231 GD3S+. Enfin, dans les cellules MCF-7 GD3S+, nous n'avons pas détecté de phosphorylation spécifique de RTKs par rapport aux

cellules MDA-MB-231 GD3S+ qui présentent une phosphorylation de c-Met en l'absence de son ligand (Cazet et al., 2010). La différence d'effet de la sur-expression de la GD3S sur la prolifération cellulaire pourrait s'expliquer par la différence de profil des gangliosides dans la membrane plasmique et leur implication dans l'activation des RTKs. Dans la littérature, il a été montré que certains gangliosides tels que le G_{D1b} sont impliqués dans l'inhibition de la prolifération ; par contre d'autres gangliosides comme le G_{D2} et le G_{D3} augmentent les capacités prolifératives et migratoires (Hamamura et al., 2008; Cazet et al., 2012). Par exemple, l'expression du G_{D1b} , G_{T1b} et G_{M1} dans la lignée cellulaire du mélanome SK-Mel-37 est associée avec une diminution de la prolifération et de l'invasion des cellules (Dong et al., 2010). De même, une diminution des gangliosides de la série b tels que le G_{D1b} , G_{T1b} et G_{Q1b} est corrélée avec un phénotype agressif du neuroblastome et un mauvais pronostic de survie (Hettmer et al., 2003; 2005). De plus, il a été montré que certains gangliosides inhibent la croissance des cellules par régulation des RTKs. Par exemple, le ganglioside G_{D1a} inhibe l'activation de c-Met par son ligand HGF dans la lignée cellulaire d'ostéosarcome FBJ-LL, mais aussi dans la lignée cellulaire cancéreuse hépatique HepG2. L'inhibition de la phosphorylation du récepteur c-Met est associée avec la diminution de la croissance des cellules (Hyuga et al., 2001). De même, il a été montré que le G_{M3} induit l'inhibition de l'activité de l'EGFR dans les cellules cancéreuses hépatiques murines Hca-F25.

Par contre, d'autres gangliosides tels que le G_{D2} et le G_{D3} sont généralement associés avec un phénotype prolifératif et invasif. Le ganglioside G_{D3} augmente les capacités invasives des cellules de mélanome SK-Mel-28-N1 avec une augmentation de la phosphorylation de protéines telles que la paxilline, p130Cas et FAK (Hamamura et al 2005 ; 2008 ; 2011). L'expression du G_{D2} est également associée avec l'acquisition de la malignité des lignées cellulaires de cancer du poumon à petites cellules SK-LC-17 (Yoshida et al., 2001). De plus, l'inhibition de l'expression des gangliosides de la série b ou l'incubation avec un anticorps anti- G_{D2} induit l'inhibition de la prolifération de ces cellules (Ko et al., 2006; Aixinjueluo et al., 2005). Dans notre équipe, nous avons aussi montré que le ganglioside G_{D2} est lié aux capacités prolifératives et migratoires des cellules MDA-MB-231 GD3S+. Enfin, ces études ont également démontré que les gangliosides sont impliqués dans la régulation des RTKs. Dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+, une activation spécifique de c-Met et des voies de signalisation intracellulaires MEK/ERK et PI3KI/AKT a été détectée (Cazet et al., 2010 ; 2012).

Les résultats obtenus sur le modèle cellulaire MCF-7 GD3S+ démontrent que ces cellules ne présentent pas de statut de phosphorylation particulier des RTK, ce qui peut être associé à l'absence de G_{D2} . De plus, la proportion des gangliosides est très faible en comparaison des cellules MDA-MB-231. Notre but a été d'augmenter la proportion des gangliosides par sur-expression de la GM3S et de la GD3S pour induire l'expression des gangliosides de la série b-, et ensuite d'inhiber la G_{D1b} synthétase ($\beta 3GalT 4$) par ARN interférence de manière à bloquer la conversion de G_{D2} en G_{D1b} et ainsi d'accumuler du G_{D2} . Après une double transfection des cellules MCF-7, nous n'avons pas détecté les gangliosides G_{D1b} et G_{M1} . Nous pouvons supposer que l'augmentation de la proportion des gangliosides et la forte expression du G_{D1b} a provoqué la mort cellulaire. Il a déjà été montré que l'expression de la GD3S dans les cellules d'hépatocarcinome humain se traduit par l'augmentation de l'expression du G_{D3} à la fois à la membrane plasmique et au niveau des membranes mitochondriales. Ces cellules deviennent sensibles à l'hypoxie, induisant la production de ROS (Reactive Oxygen Species) et la mort cellulaire (Lluis et al., 2009).

c- Modèle cellulaire MDA-MB-231 GD3S+ et activation spécifique des RTKs

L'objectif de départ de la troisième partie de mon travail de thèse était de poursuivre les travaux réalisés sur le modèle cellulaire MDA-MB-231 GD3S+. Malheureusement, en l'absence de phénotype prolifératif et l'absence de phosphorylation du récepteur c-Met, nous avons retransfecté les cellules MDA-MB-231 par le vecteur pcDNA-ST8Sia I afin d'obtenir de nouveaux clones présentant le phénotype décrit par Cazet et collaborateurs. Les nouveaux clones MDA-MB-231 GD3S+ sélectionnés présentent un profil de phosphorylation différent du précédent. Dans ces nouveaux clones, nous avons détecté la phosphorylation de l'EGFR, du VEGFR1, de EphA2 et de Axl. Par contre, quelques mois après, nous n'avons plus détecté de phosphorylation de ces récepteurs, ce qui suggère que la phosphorylation des RTKs et le phénotype associé n'est pas stable. Afin de continuer les travaux sur le modèle cellulaire MDA-MB-231, il va être nécessaire d'utiliser une autre méthode de vectorisation rétrovirale, plus efficace et permettant d'éliminer les étapes de sélection clonale, ainsi que la variabilité et l'instabilité des clones sélectionnés (Fontaine C, 2003). Ces expé-

riences seront effectuées en collaboration avec le Dr Fabrice Soncin (Institut de Biologie de Lille).

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées afin d'expliquer le phénotype prolifératif des cellules MDA-MB-231 GD3S+ et l'activation spécifique de c-Met dépendante du G_{D2}. Comme le récepteur c-Met porte des chaînes N-glycanniques, l'activation du récepteur c-Met pourrait être médiée par des interactions directes entre la partie oligosaccharidique du G_{D2} et les résidus des chaînes N-glycanniques portées par c-Met (Faletto et al., 1992). Ce type d'interaction a été montré pour le gangliosides G_{M3} qui est capable de se lier spécifiquement au domaine extracellulaire de l'EGFR (Kawashima et al., 2009). En effet, il a été montré que l'inhibition de l'activité tyrosine kinase est dépendante des interactions entre les résidus GlcNAc des chaînes N-glycanniques du récepteur et la partie glycannique du G_{M3} (Yoon et al., 2006; Kawashima et al., 2009). Pour confirmer ce type d'interactions, nous envisageons d'utiliser la technique de glycan array, qui consiste en une variété d'oligosaccharides immobilisés sur un support solide en collaboration avec le Pr Ten Feizi (Feizi and 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}. La spécificité d'activation de c-Met par le G_{D2} pourrait également s'expliquer par des interactions indirectes. Dans la littérature, il a déjà été montré que le ganglioside G_{D2} est impliqué dans l'acquisition de la malignité des cellules tumorales par l'intermédiaire d'interactions entre le G_{D2} et les intégrines (Yoshida et al., 2001; Aixinjueluo et al., 2005). En parallèle, il a été montré que les interactions entre le suppresseur de tumeur tétraspanine CD82, l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ et c-Met sont régulées au sein des glycosynapses par le complexe G_{M3}/G_{M2} dans les cellules épithéliales HCV-29. Ce complexe G_{M3}/G_{M2} interagit spécifiquement avec la protéine CD82 qui inhibe la trans-phosphorylation du récepteur dépendante des intégrines. De plus, il a été montré que l'activation de c-Met par la fibronectine et les intégrines $\alpha 5\beta 1$, indépendamment de la présence de son ligand, est impliquée dans l'invasion et dans les métastases du cancer des ovaires (Mitra *et al.*, 2011). Afin d'étudier l'existence possible de complexes entre le G_{D2} et les protéines membranaires telles que les tétraspanines, les intégrines ou la fibronectine, nous envisageons également d'effectuer des expériences de co-immunoprécipitation et de FRET dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+

d- Invasion et métastases des cellules MDA-MB-231 GD3S+

Les gangliosides complexes et l'enzyme GD3S qui contrôle leur synthèse jouent un rôle important dans le processus de tumorigenèse. Marquina et collaborateurs ont montré que le G_{D3} , le 9-O-acétyl- G_{D3} , et le G_{T3} sont exprimés dans la majorité des carcinomes canauxiaux infiltrants (Marquina et al., 1996). De plus, des études cliniques focalisées sur différentes banques de données d'analyse transcriptionnelle ont montré que l'expression de ST8Sia I dans les tumeurs ER-négatives était liée avec un grade histopronostique élevé (Ruckhäberle et al., 2008; 2009). Dans notre laboratoire, nous avons aussi montré que l'expression de la GD3S dans les cellules MDA-MB-231 est associée avec un phénotype prolifératif (Cazet et al., 2009). De plus, l'agressivité accrue des cellules MDA-MB-231 GD3S+ a été démontrée *in vivo* lors d'expériences de xénogreffes chez des souris immunodéprimées (Cazet et al., 2010). Ces dernières années, plusieurs études ont impliqué les gangliosides dans le phénomène de métastase du cancer du sein. 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 des tissus osseux sur-expriment le gène *ST8SIA1* (Carcel-Trullols et al., 2006). Au laboratoire, Marie Bobowski en collaboration avec Dr Cheryl Gillett du Guy's Hospital de Londres a pu répertorier les sites métastatiques chez 20 patientes atteintes de cancer du sein, pour lesquelles l'expression transcriptionnelle de la GD3S a été mesurée dans les tumeurs primaires (**Fig. 36**). Cette analyse démontre 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 au niveau du foie, des poumons et du cerveau.

Toutes ces études tentent à montrer que les gangliosides pourraient jouer un rôle dans l'apparition des métastases du cancer du sein. Afin de déterminer si les cellules MDA-MB-231 GD3S+ peuvent coloniser des organes spécifiques chez des souris immunodéficientes, nous pouvons transfecter stablement l'ADNc codant la luciférase dans les clones MDA-MB-231 GD3S+ et les cellules contrôles. 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 former des métastases au niveau de sites 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 (Vandehaute et al., 2012).

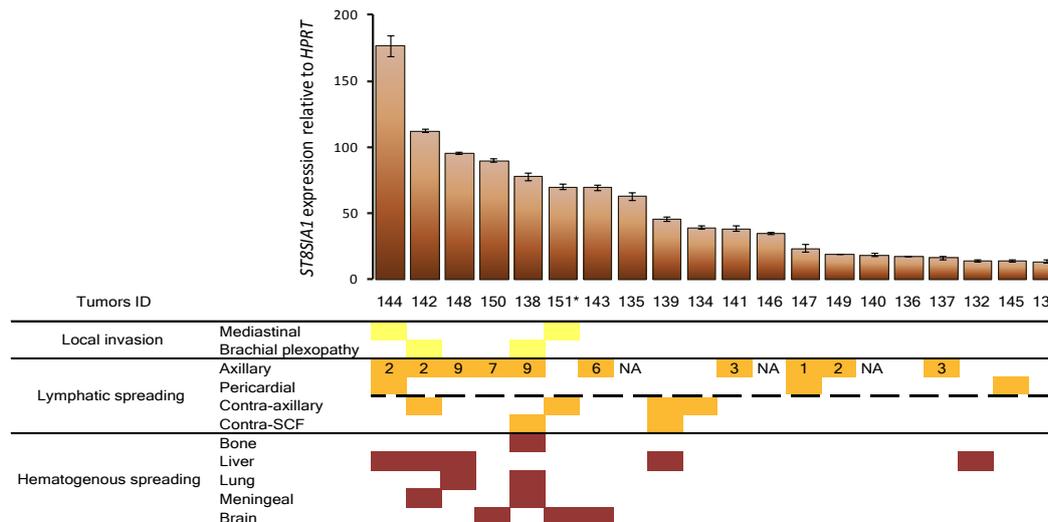


Figure 36 : Caractéristiques métastatiques de patientes atteintes de cancer du sein en fonction de l'expression de la GD₃ synthétase au niveau la tumeur primaire. Le niveau d'expression des ARN de *ST8SIA1* a été mesuré par qPCR à partir de 20 échantillons de tumeurs de type ER- (132 à 151), obtenus par le Guy's Hospital de Londres. L'expression de *ST8SIA1* a été normalisée par rapport à celle de *HPRT* et classée de la plus forte à la plus faible expression. Les sites métastatiques sont indiqués dans le tableau pour chaque patiente. Figure tirée de la thèse de M. Bobowski (2012).

Conclusion :

Mes travaux de thèse ont permis de montrer une influence de la sur-expression de la GD3S sur la composition des gangliosides complexes présents à la surface de lignées cellulaires de cancer du sein. L'accumulation du G_{D1b} dans les cellules MCF-7 montre que le profil gangliosidique est également dépendant de l'expression d'autres glycosyltransférases telles que ST3Gal V, $\beta 4\text{GalNAcT1}$ et $\beta 3\text{GalT4}$. De plus, nos résultats ont démontré que la GD3S est capable de synthétiser le G_{T3} à partir de G_{D3} mais aussi des gangliosides tétra- (G_{Q3}) et penta-sialylés (G_{P3}). En parallèle, les travaux menés sur le modèle cellulaire MDA-MB-231 ont permis de montrer que les gangliosides sont impliqués dans l'activation des RTKs. Dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF-7, nous avons montré que l'activation de certains RTKs est corrélée au changement de composition en gangliosides, avec la modification des capacités prolifératives et/ou migratoires des cellules. Il serait maintenant important de préciser les mécanismes moléculaires par lesquels le G_{D2} active de manière spécifique le récepteur c-Met dans la lignée MDA-MB-231 et de déterminer l'impact de l'expression de la GD3S sur la localisation et le nombre de métastases dans un modèle animal.

Matériel et Méthodes

Ce chapitre décrit les protocoles des expériences non publiées décrites dans la deuxième et la troisième partie des résultats.

1. Culture cellulaire

La lignée de cancer du sein MDA-MB-231 nous a été fournie par le Professeur Xuefen Le Bourhis (Laboratoire de Signalisation des facteurs de croissance dans le cancer du sein, Ville-neuve d'Ascq, France). Ces cellules sont cultivées en routine dans un milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium Essential*) à 4,5 g/l de glucose (Cambrex) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal (SVF ; Lonza), 2 mM de L-glutamine (Cambrex), et les antibiotiques pénicilline (100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) et streptomycine (100 UI. ml^{-1}) (Gibco). Ces lignées sont maintenues dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide et enrichie de 5 % de CO₂.

2. Transfections

La construction du vecteur plasmidique contenant la séquence d'ADNc de la sialyltransférase ST8Sia I humaine a été réalisée par l'équipe du Professeur Kim (Unité de Glycobiologie moléculaire et cellulaire, Sungkyunkwan University, Corée du Sud). Cette séquence d'ADNc a été insérée dans les sites de restriction *Hind* III et *Xho* I du vecteur d'expression en cellules de mammifères pcDNA3. Le plasmide est nommé pcDNA3-ST8Sia I. L'extraction de plasmide s'effectue à partir d'une culture dense de bactéries contenant le plasmide pcDNA3 vide ou le vecteur pcDNA3-ST8Sia I en utilisant le kit HiSpeed Plasmid Purification Midi. La quantité d'ADN obtenue et sa qualité sont déterminées par la technologie NanoDrop.

Les transfections des cellules MDA-MB-231 sont réalisées par électroporation à l'aide de la technologie Nucleofector (Amaxa Biosystems) selon un protocole optimisé pour cette lignée. Les cellules MCF-7 ($1\cdot 10^6$) sont resuspendues dans 100 μl de solution V (Amaxa Biosystems) ; 2 μg du vecteur sont ajoutés aux cellules et l'échantillon est transféré dans une cuvette Amaxa. Immédiatement après le choc électrique, la suspension cellulaire est diluée dans du milieu DMEM complet préchauffé et placé dans un incubateur à 37° C. Pour la sélection de clones MDA-MB-231 stables, le milieu DMEM complet est remplacé 48 h après le choc électrique par du milieu complet DMEM-10 % SVF contenant 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de Généticine G418 (Gib-

co). La pression de sélection est maintenue pendant 21 jours durant lesquels le milieu est renouvelé tous les deux jours. La sélection clonale a ensuite été réalisée par la technique de dilution limitée sur de plaques 96 puits de façon à obtenir de 0 à 1 cellule par puits.

3. PCR quantitative

Les ARN totaux sont isolés à partir de culots des cellules MDA-MB-231 grâce aux colonnes échangeuses d'ions du kit Nucleospin[®] RNA II (Macherey Nagel). La quantité de ces ARN est ensuite estimée par mesure du spectre d'absorbance entre 230 et 300 nm en utilisant la technologie NanoDrop. Leur pureté est estimée par le rapport des absorbances A_{260}/A_{280} .

La synthèse des premiers brins d'ADNc par rétrotranscription est réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux grâce au kit Affinity Script cDNA Synthesis (Stratagene). Une amorce oligo(dT) est utilisée pour l'initiation de cette synthèse. Les ADNc sont dilués au 1/5 avant d'être utilisés pour toutes les réactions de PCR.

La PCR quantitative (qPCR) que nous avons mise au point est basée sur la visualisation en temps réel de la fluorescence émise par un agent intercalant de l'ADN, le SYBR[®] Green. Les couples d'amorces de la G_{D3} synthétase ont été définis à l'aide du programme informatique Primer Premier 3.1 (Biosoft International). Les réactions de qPCR sont effectuées sur un appareil MX3005 Multiplex Quantitative PCR (Stratagene), dans un volume final de 25 µl constitué de 1 µl de chacune des deux amorces à 300 nM, de 8,5 µl d'H₂O et de 12,5 µl de mélange Brilliant SYBR[®] Green qPCR Master Mix (2X) (Stratagene) contenant les dNTPs, le SYBR[®] Green, la Taq polymérase et le tampon optimisé de l'enzyme. Pour toutes les réactions, 2 µl d'ADNc sont utilisés. Les conditions de qPCR ont été définies pour permettre d'amplifier avec la même efficacité l'ensemble des gènes cibles. 40 cycles d'amplification sont ensuite réalisés selon le programme suivant : dénaturation de l'ADNc à 95°C, 30 s ; hybridation des amorces à 51°C, 45 s ; et une étape d'élongation à 72°C, 30 s.

Après avoir déterminé l'efficacité de PCR pour le gène d'intérêt ST8Sia I, nous avons utilisé la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$, décrite par Livak et Schmittgen (2001) pour comparer les différents échantillons entre eux, ceci grâce à l'utilisation d'un échantillon de référence composé d'ADNc de la lignée de mélanome SK-Mel-28. Le gène de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase ou HPRT est utilisé comme gène de référence pour normaliser les résultats.

4. Immunofluorescence et cytométrie en flux

Les cellules sont décollées en présence de PBS-EDTA 2 mM avant d'être lavées 3 fois dans du PBS-0,5 % BSA. 2.10^5 cellules sont ensuite incubées à 4° C pendant 1 h avec les différents anticorps primaires spécifiques cités ci-dessus dilués dans du PBS-0,5 % de BSA. Les anticorps R24 (anti-G_{D3}) au 1/100, S220-51 (IgG de souris anti-G_{D2}) au 1/10 et l'anticorps anti-G_{D1b} au 1/100 ont été fournis par le Professeur Ronald L. Schnaar (Département de Pharmacologie et de Neurosciences, The Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA). Les anticorps GMR6 (anti-G_{M3}) au 1 /75 et A2B5 (anti-G_{T3}) au 1/10 ont été fournis par le Pr J. Portoukalian (Laboratoire de recherche en dermatologie, Lyon, France). Après 2 lavages au PBS-0,5 % BSA, les cellules sont incubées pendant une heure à 4° C avec un anti-IgM et un anti-IgG couplé au l'Alexa Fluor[®] 488, tous deux dilués au 1/1000 dans une solution de PBS-0,5 % de BSA. La sous-unité β cholérique couplée au FITC, fournie par le Docteur Slomianny, est utilisée pour détecter le G_{M1} (dilution au 1/1000). Les cellules ainsi marquées sont analysées par cytométrie en flux à l'aide d'un appareil FACScalibur (Becton Dickinson).

5. Etude de la prolifération cellulaire

Le test de prolifération est effectué par un test colorimétrique MTS (Promega, Charbonnières-les-bains, France) suivant le protocole du kit. 2.10^3 cellules contrôle ou clones sont ensemencées dans des plaques à 96 puits (Thermo Fisher Scientifics, Langenselbold, Germany) dans un milieu contenant 10% ou 0% SVF. Le nombre de cellules est estimé après, 24, 48, 72, 96 et 120 heures par l'ajout de MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium], deux heures avant la lecture de l'absorbance à 490 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

6. Test de migration

Les cellules (5×10^4) ont été ensemencées sur la face supérieure d'un puits Transwell (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) et cultivées 12 heures dans du milieu DMEM supplémenté avec 0,1% de SVF. Après incubation, les cellules ont été fixées avec du PAF 3 % 20 minutes à température ambiante et les noyaux ont été colorés avec du DAPI (Sigma-Aldrich) (15 minutes dans le noir). Puis, les cellules se trouvant sur la face supérieure des membranes

ont été grattées à l'aide d'un coton tige et les membranes lavées plusieurs fois avec du PBS de manière à enlever les débris cellulaire. Les membranes ont été découpées au scalpel et déposées sur lame via un montage au glycergel (Dako, Trappes, France). 10 champs par membrane ont ensuite été analysés au microscope, avec un grossissement de 20x.

7. Test de blessure

Le test de blessure des cellules MDA-MB-231 a été réalisé à l'aide du culture-insert-Dish (ibidi, Martinsried, Germany) composé de deux pochoirs en silicone stérile (zone de croissance par pochoir 0,22 cm²) séparées par un insert d'épaisseur 500 µm. L'insert été collé dans la plaque 12 puis et 10 000 cellules sont déposées dans chaque pochoir. Après attachement cellulaire quelques heures à 37 °C, les cellules sont placées en conditions de sevrage pendant une nuit. Ensuite, l'insert est retiré pour former la blessure. Des photos sont prises dans une zone précise à 0 et 12 heures afin de visualiser la blessure à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse Ti-U.

8. Analyse de phospho-RTK array et phospho-kinase array

L'analyse du statut de phosphorylation des RTKs et des kinases dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ et dans les cellules contrôles a été effectuée en conditions de sevrage (0% SVF). Pour cela, les cellules ont été cultivées 48h sans sérum dans le milieu de culture DMEM. Les cellules ont été lysées en utilisant le tampon de lyse du kit Phospho-RTK ou Phospho-kinase array (R&S System Europe, Lille, France). La détection de la phosphorylation a été réalisée selon le protocole du fournisseur.

Références bibliographiques

- Aixinjueluo, W., Furukawa, K., Zhang, Q., Hamamura, K., Tokuda, N., Yoshida, S., Ueda, R., and 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, M.P., and Yu, R.K. (2008). Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. *J. Lipid Res.* *49*, 1157–1175.
- Awada, A., Bozovic-Spasojevic, I., and 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.
- Bajorin, D.F., Chapman, P.B., Wong, G.Y., Cody, B.V., Cordon-Cardo, C., Dantes, L., Templeton, M.A., Scheinberg, D., Oettgen, H.F., and Houghton, A.N. (1992). Treatment with high dose mouse monoclonal (anti-GD3) antibody R24 in patients with metastatic melanoma. *Melanoma Res.* *2*, 355–362.
- Bane, A., Vilorio-Petit, A., Pinnaduwa, D., Mulligan, A.M., O'Malley, F.P., and Andrulis, I.L. (2013). Clinical-pathologic significance of cancer stem cell marker expression in familial breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.* *140*, 195–205.
- 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., et al. (2012). Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* *122*, 2066–2078.
- Berra, B., Gaini, S.M., and Riboni, L. (1985). Correlation between ganglioside distribution and histological grading of human astrocytomas. *Int. J. Cancer* *36*, 363–366.
- Bertheau, P., Espié, M., Turpin, E., Lehmann, J., Plassa, L.-F., Varna, M., Janin, A., and de Thé, H. (2008). TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiology* *75*, 132–139.
- Bieberich, E., Freischütz, B., Liour, S.S., and Yu, R.K. (1998). Regulation of ganglioside metabolism by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Neurochem.* *71*, 972–979.
- Bieberich, E., and Yu, R.K. (1999). Multi-enzyme kinetic analysis of glycolipid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1432*, 113–124.
- Birklé, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R.K., and Aubry, J. (2003). Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie* *85*, 455–463.
- Bobowski, M., Vincent, A., Steenackers, A., Colomb, F., Van Seuning, I., Julien, S., and Delannoy, P. (2013). Estradiol Represses the GD3 Synthase Gene ST8SIA1 Expression in Human Breast Cancer Cells by Preventing NFκB Binding to ST8SIA1 Promoter. *PLoS ONE* *8*, e62559.
- 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., et al. (2009). Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* *459*, 1005–1009.
- Bundred, N., Gardovskis, J., Jaskiewicz, J., Eglitis, J., Paramonov, V., McCormack, P., Swaisland, H., Cavallin, M., Parry, T., Carmichael, J., et al. (2013). Evaluation of the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the PARP inhibitor olaparib: a Phase I multicentre trial in patients scheduled for elective breast cancer surgery. *Invest New Drugs*.

- Carcel-Trullols, J., Stanley, J.S., Saha, R., Shaaf, S., Bendre, M.S., Monzavi-Karbassi, B., Suva, L.J., and 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.
- Cartellieri, M., Bachmann, M., Feldmann, A., Bippes, C., Stamova, S., Wehner, R., Temme, A., and Schmitz, M. (2010). Chimeric antigen receptor-engineered T cells for immunotherapy of cancer. *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*, 956304.
- Carubia, J.M., Yu, R.K., Macala, L.J., Kirkwood, J.M., and Varga, J.M. (1984). Gangliosides of normal and neoplastic human melanocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *120*, 500–504.
- 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.
- Cazet, A., Groux-Degroote, S., Teylaert, B., Kwon, K.-M., Lehoux, S., Slomianny, C., Kim, C.-H., Le Bourhis, X., and 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., 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.
- Chalat, M., Menon, I., Turan, Z., and Menon, A.K. (2012). Reconstitution of glucosylceramide flip-flop across endoplasmic reticulum: implications for mechanism of glycosphingolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* *287*, 15523–15532.
- Cheung, I.Y., Lo Piccolo, M.S., Kushner, B.H., and Cheung, N.-K.V. (2003). Early molecular response of marrow disease to biologic therapy is highly prognostic in neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* *21*, 3853–3858.
- Cheung, I.Y., Sahota, A., and Cheung, N.-K.V. (2004). Measuring circulating neuroblastoma cells by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. *Cancer* *101*, 2303–2308.
- Chiavegatto, S., Sun, J., Nelson, R.J., and Schnaar, R.L. (2000). A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Exp. Neurol.* *166*, 227–234.
- Christgen, M., Christgen, H., Heil, C., Krech, T., Länger, F., Kreipe, H., and Lehmann, U. (2009). Expression of KAI1/CD82 in distant metastases from estrogen receptor-negative breast cancer. *Cancer Sci.* *100*, 1767–1771.
- Chung, T.-W., Kim, S.-J., Choi, H.-J., Kim, K.-J., Kim, M.-J., Kim, S.-H., Lee, H.-J., Ko, J.-H., Lee, Y.-C., Suzuki, A., et al. (2009). Ganglioside GM3 inhibits VEGF/VEGFR-2-mediated angiogenesis: direct interaction of GM3 with VEGFR-2. *Glycobiology* *19*, 229–239.
- Connolly, R., and Stearns, V. (2012). Epigenetics as a therapeutic target in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *17*, 191–204.
- Dae, H.-M., Kwon, H.-Y., Kang, N.-Y., Song, N.-R., Kim, K.-S., Kim, C.-H., Lee, J.-H., and 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., Zurita, A.R., Trindade, V.M.T., and Maccioni, H.J.F. (2002). GD3 expression in CHO-K1 cells increases growth rate, induces morphological changes, and affects cell-substrate interactions. *Neurochem. Res.* *27*, 1421–1429.
- Degroote, S., Wolthoorn, J., and van Meer, G. (2004). The cell biology of glycosphingolipids. *Semin. Cell Dev. Biol.* *15*, 375–387.
- Dippold, W.G., Lloyd, K.O., Li, L.T., Ikeda, H., Oettgen, H.F., and Old, L.J. (1980). Cell surface antigens of human malignant melanoma: definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *77*, 6114–6118.
- Dong, Y., Ikeda, K., Hamamura, K., Zhang, Q., Kondo, Y., Matsumoto, Y., Ohmi, Y., Yamauchi, Y., Furukawa, K., Taguchi, R., et al. (2010). GM1/GD1b/GA1 synthase expression results in the reduced cancer phenotypes with modulation of composition and raft-localization of gangliosides in a melanoma cell line. *Cancer Sci.* *101*, 2039–2047.
- Durrant, L.G., Noble, P., and Spendlove, I. (2012). Immunology in the clinic review series; focus on cancer: glycolipids as targets for tumour immunotherapy. *Clin. Exp. Immunol.* *167*, 206–215.
- Eckhardt, B.L., Francis, P.A., Parker, B.S., and Anderson, R.L. (2012). Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nat Rev Drug Discov* *11*, 479–497.
- Faletto, D.L., Tsarfaty, I., Kmiecik, T.E., Gonzatti, M., Suzuki, T., and Vande Woude, G.F. (1992). Evidence for non-covalent clusters of the c-met proto-oncogene product. *Oncogene* *7*, 1149–1157.
- Feizi, T., and Chai, W. (2004). Oligosaccharide microarrays to decipher the glyco code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 582–588.
- Ferguson, M.A., Kinoshita, T., and Hart, G.W. (2009). Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press),.
- Fishman, P.H. (1982). Role of membrane gangliosides in the binding and action of bacterial toxins. *J. Membr. Biol.* *69*, 85–97.
- Fukumoto, S., Mutoh, T., Hasegawa, T., Miyazaki, H., Okada, M., Goto, G., Furukawa, K., and 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., and 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., Horie, M., Okutomi, K., Sugano, S., and Furukawa, K. (2003). Isolation and functional analysis of the melanoma specific promoter region of human GD3 synthase gene. *Biochim. Biophys. Acta* *1627*, 71–78.
- Giraud, C.G., Daniotti, J.L., and 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.
- Gu, X., Preuss, U., Gu, T., and Yu, R.K. (1995). Regulation of sialyltransferase activities by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Neurochem.* *64*, 2295–2302.

- Gupta, G., and Suroliya, A. (2010). Glycosphingolipids in microdomain formation and their spatial organization. *FEBS Lett.* *584*, 1634–1641.
- Hakomori, S. (2008). Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochim. Biophys. Acta* *1780*, 325–346.
- Halter, D., Neumann, S., van Dijk, S.M., Wolthoorn, J., de Mazière, A.M., Vieira, O.V., Mattjus, P., Klumperman, J., van Meer, G., and Sprong, H. (2007). Pre- and post-Golgi translocation of glucosylceramide in glycosphingolipid synthesis. *J. Cell Biol.* *179*, 101–115.
- Hamamura, K., Furukawa, K., Hayashi, T., Hattori, T., Nakano, J., Nakashima, H., Okuda, T., Mizutani, H., Hattori, H., Ueda, M., et al. (2005). Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 11041–11046.
- Hamamura, K., Tsuji, M., Hotta, H., Ohkawa, Y., Takahashi, M., Shibuya, H., Nakashima, H., Yamauchi, Y., Hashimoto, N., Hattori, H., et al. (2011). Functional activation of Src family kinase yes protein is essential for the enhanced malignant properties of human melanoma cells expressing ganglioside GD3. *J. Biol. Chem.* *286*, 18526–18537.
- Hamamura, K., Tsuji, M., Ohkawa, Y., Nakashima, H., Miyazaki, S., Urano, T., Yamamoto, N., Ueda, M., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2008). Focal adhesion kinase as well as p130Cas and paxillin is crucially involved in the enhanced malignant properties under expression of ganglioside GD3 in melanoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1780*, 513–519.
- Hanada, K. (2010). Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* *86*, 426–437.
- Haraguchi, M., Yamashiro, S., Furukawa, K., Takamiya, K., Shiku, H., and 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., and 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.
- Hatano, K., Miyamoto, Y., Nonomura, N., and Kaneda, Y. (2011). Expression of gangliosides, GD1a, and sialyl paragloboside is regulated by NF- κ B-dependent transcriptional control of α 2,3-sialyltransferase I, II, and VI in human castration-resistant prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* *129*, 1838–1847.
- Hedberg, K.M., Dellheden, B., Wikstrand, C.J., and Fredman, P. (2000). Monoclonal anti-GD3 antibodies selectively inhibit the proliferation of human malignant glioma cells in vitro. *Glycoconj. J.* *17*, 717–726.
- Herman, J.G., and Baylin, S.B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* *349*, 2042–2054.
- Hettmer, S., Ladisch, S., and Kaucic, K. (2005). Low complex ganglioside expression characterizes human neuroblastoma cell lines. *Cancer Lett.* *225*, 141–149.
- Hettmer, S., Malott, C., Woods, W., Ladisch, S., and Kaucic, K. (2003). Biological stratification of human neuroblastoma by complex “B” pathway ganglioside expression. *Cancer Res.* *63*, 7270–7276.

- Holliday, D.L., and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* *13*, 215.
- Houghton, A.N., Mintzer, D., Cordon-Cardo, C., Welt, S., Fliegel, B., Vadhan, S., Carswell, E., Melamed, M.R., Oettgen, H.F., and Old, L.J. (1985). Mouse monoclonal IgG3 antibody detecting GD3 ganglioside: a phase I trial in patients with malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *82*, 1242–1246.
- Huang, X., Li, Y., Zhang, J., Xu, Y., Tian, Y., and Ma, K. (2013). Ganglioside GM3 inhibits hepatoma cell motility via down-regulating activity of EGFR and PI3K/AKT signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* *114*, 1616–1624.
- Hyuga, S., Kawasaki, N., Hyuga, M., Ohta, M., Shibayama, R., Kawanishi, T., Yamagata, S., Yamagata, T., and Hayakawa, T. (2001). Ganglioside GD1a inhibits HGF-induced motility and scattering of cancer cells through suppression of tyrosine phosphorylation of c-Met. *Int. J. Cancer* *94*, 328–334.
- Iber, H., van Echten, G., Klein, R.A., and Sandhoff, K. (1990). pH-dependent changes of ganglioside biosynthesis in neuronal cell culture. *Eur. J. Cell Biol.* *52*, 236–240.
- Ichikawa, N., Iwabuchi, K., Kurihara, H., Ishii, K., Kobayashi, T., Sasaki, T., Hattori, N., Mizuno, Y., Hozumi, K., Yamada, Y., et al. (2009). Binding of laminin-1 to monosialoganglioside GM1 in lipid rafts is crucial for neurite outgrowth. *J. Cell. Sci.* *122*, 289–299.
- Irie, R.F., and Morton, D.L. (1986). Regression of cutaneous metastatic melanoma by intralesional injection with human monoclonal antibody to ganglioside GD2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *83*, 8694–8698.
- Ishii, A., Ikeda, T., Hitoshi, S., Fujimoto, I., Torii, T., Sakuma, K., Nakakita, S., Hase, S., and Ikenaka, K. (2007). Developmental changes in the expression of glycogenes and the content of N-glycans in the mouse cerebral cortex. *Glycobiology* *17*, 261–276.
- Kabuss, R., Ashikov, A., Oelmann, S., Gerardy-Schahn, R., and Bakker, H. (2005). Endoplasmic reticulum retention of the large splice variant of the UDP-galactose transporter is caused by a dilysine motif. *Glycobiology* *15*, 905–911.
- Kang, N.-Y., Kim, C.-H., Kim, K.-S., Ko, J.-H., Lee, J.-H., Jeong, Y.-K., and Lee, Y.-C. (2007). Expression of the human CMP-NeuAc:GM3 alpha2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) gene through the NF-kappaB activation in human melanoma SK-MEL-2 cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1769*, 622–630.
- Kawashima, N., Yoon, S.-J., Itoh, K., and 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., and Valentino, L.A. (2003). Gangliosides regulate tumor cell adhesion to collagen. *Clin. Exp. Metastasis* *20*, 311–319.
- Kellokumpu, S., Sormunen, R., and Kellokumpu, I. (2002). Abnormal glycosylation and altered Golgi structure in colorectal cancer: dependence on intra-Golgi pH. *FEBS Lett.* *516*, 217–224.
- Kim, Y.J., Kim, K.S., Do, S., Kim, C.H., Kim, S.K., and Lee, Y.C. (1997). Molecular cloning and expression of human alpha2,8-sialyltransferase (hST8Sia V). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *235*, 327–330.

- Kirkwood, J.M., Mascari, R.A., Edington, H.D., Rabkin, M.S., Day, R.S., Whiteside, T.L., Vlock, D.R., and Shipe-Spotloe, J.M. (2000). Analysis of therapeutic and immunologic effects of R(24) anti-GD3 monoclonal antibody in 37 patients with metastatic melanoma. *Cancer* 88, 2693–2702.
- Ko, K., Furukawa, K., Takahashi, T., Urano, T., Sanai, Y., Nagino, M., Nimura, Y., and Furukawa, K. (2006). Fundamental study of small interfering RNAs for ganglioside GD3 synthase gene as a therapeutic target of lung cancers. *Oncogene* 25, 6924–6935.
- Kolter, T. (2011). A view on sphingolipids and disease. *Chem. Phys. Lipids* 164, 590–606.
- Kroes, R.A., He, H., Emmett, M.R., Nilsson, C.L., Leach, F.E., 3rd, Amster, I.J., Marshall, A.G., and Moskal, J.R. (2010). Overexpression of ST6GalNAcV, a ganglioside-specific alpha2,6-sialyltransferase, inhibits glioma growth in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 12646–12651.
- Kuphal, S., Bauer, R., and Bosserhoff, A.-K. (2005). Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 24, 195–222.
- Kwak, D.H., Seo, B.B., Chang, K.T., and Choo, Y.K. (2011). Roles of gangliosides in mouse embryogenesis and embryonic stem cell differentiation. *Exp. Mol. Med.* 43, 379–388.
- Kwon, H.-Y., Dae, H.-M., Song, N.-R., Kim, K.-S., Kim, C.-H., and 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.
- Ladisich, S., Chang, F., Li, R., Cogen, P., and Johnson, D. (1997). Detection of medulloblastoma and astrocytoma-associated ganglioside GD3 in cerebrospinal fluid. *Cancer Lett.* 120, 71–78.
- Lai, D., Visser-Grieve, S., and Yang, X. (2012). Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Biosci. Rep.* 32, 361–374.
- Lapidus, R.G., Nass, S.J., Butash, K.A., Parl, F.F., Weitzman, S.A., Graff, J.G., Herman, J.G., and Davidson, N.E. (1998). Mapping of ER gene CpG island methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res.* 58, 2515–2519.
- Ledeen, R.W., and Wu, G. (2008). Nuclear sphingolipids: metabolism and signaling. *J. Lipid Res.* 49, 1176–1186.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134.
- Levine, A.J., and Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat. Rev. Cancer* 9, 749–758.
- Li, Y., Huang, X., Zhong, W., Zhang, J., and Ma, K. (2013). Ganglioside GM3 promotes HGF-stimulated motility of murine hepatoma cell through enhanced phosphorylation of cMet at specific tyrosine sites and PI3K/Akt-mediated migration signaling. *Mol. Cell. Biochem.*
- Liu, Y., Li, R., and Ladisich, S. (2004). Exogenous ganglioside GD1a enhances epidermal growth factor receptor binding and dimerization. *J. Biol. Chem.* 279, 36481–36489.
- Lluis, J.M., Llacuna, L., von Montfort, C., Bárcena, C., Enrich, C., Morales, A., and Fernandez-Checa, J.C. (2009). GD3 synthase overexpression sensitizes hepatocarcinoma cells to hypoxia and reduces tumor growth by suppressing the cSrc/NF-kappaB survival pathway. *PLoS ONE* 4, e8059.

- Lorusso, G., and Rüegg, C. (2012). New insights into the mechanisms of organ-specific breast cancer metastasis. *Semin. Cancer Biol.* *22*, 226–233.
- Louis, C.U., Savoldo, B., Dotti, G., Pule, M., Yvon, E., Myers, G.D., Rossig, C., Russell, H.V., Diouf, O., Liu, E., et al. (2011). Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma. *Blood* *118*, 6050–6056.
- Lu, S., Singh, K., Mangray, S., Tavares, R., Noble, L., Resnick, M.B., and Yakirevich, E. (2013). Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. *Mod. Pathol.* *26*, 485–495.
- Maccioni, H.J.F., Quiroga, R., and Spessott, W. (2011). Organization of the synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex. *FEBS Lett.* *585*, 1691–1698.
- Maglione, V., Marchi, P., Di Pardo, A., Lingrell, S., Horkey, M., Tidmarsh, E., and Sipione, S. (2010). Impaired ganglioside metabolism in Huntington's disease and neuroprotective role of GM1. *J. Neurosci.* *30*, 4072–4080.
- Malhotra, G.K., Zhao, X., Band, H., and Band, V. (2010). Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* *10*, 955–960.
- Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L.E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., Perez, R., and Ando, S. (1996). Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res.* *56*, 5165–5171.
- Martina, J.A., Daniotti, J.L., and 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., and Maccioni, H.J. (2000). GM1 synthase depends on N-glycosylation for enzyme activity and trafficking to the Golgi complex. *Neurochem. Res.* *25*, 725–731.
- Merrill, A.H., Jr (2011). Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem. Rev.* *111*, 6387–6422.
- Miljan, E.A., and Bremer, E.G. (2002). Regulation of growth factor receptors by gangliosides. *Sci. STKE* *2002*, re15.
- Mirkin, B.L., Clark, S.H., and Zhang, C. (2002). Inhibition of human neuroblastoma cell proliferation and EGF receptor phosphorylation by gangliosides GM1, GM3, GD1A and GT1B. *Cell Prolif.* *35*, 105–115.
- Mitsuzuka, K., Handa, K., Satoh, M., Arai, Y., and 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., and Yamaguchi, K. (2012). Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology* *22*, 880–896.
- Molander-Melin, M., Blennow, K., Bogdanovic, N., Dellheden, B., Månsson, J.-E., and 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.

- Morales, A., Colell, A., Mari, M., Garcia-Ruiz, C., and Fernandez-Checa, J.C. (2004). Glycosphingolipids and mitochondria: role in apoptosis and disease. *Glycoconj. J.* *20*, 579–588.
- Nagata, Y., Lan, K.-H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F.J., Sahin, A.A., Klos, K.S., Li, P., Monia, B.P., Nguyen, N.T., et al. (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* *6*, 117–127.
- Nakano, J., Yasui, H., Lloyd, K.O., and 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.
- Nakashima, H., Hamamura, K., Houjou, T., Taguchi, R., Yamamoto, N., Mitsudo, K., Tohnai, I., Ueda, M., Urano, T., Furukawa, K., et al. (2007). Overexpression of caveolin-1 in a human melanoma cell line results in dispersion of ganglioside GD3 from lipid rafts and alteration of leading edges, leading to attenuation of malignant properties. *Cancer Sci.* *98*, 512–520.
- Nakayama, J., Fukuda, M.N., Hirabayashi, Y., Kanamori, A., Sasaki, K., Nishi, T., and Fukuda, M. (1996). Expression cloning of a human GT3 synthase. GD3 AND GT3 are synthesized by a single enzyme. *J. Biol. Chem.* *271*, 3684–3691.
- Nara, K., Watanabe, Y., Maruyama, K., Kasahara, K., Nagai, Y., and Sanai, Y. (1994). Expression cloning of a CMP-NeuAc:NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-4Glc beta 1-1'Cer alpha 2,8-sialyltransferase (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., and Chapman, P.B. (1997). Anti-melanoma effects of R24, a monoclonal antibody against GD3 ganglioside. *Melanoma Res.* *7 Suppl 2*, S155–162.
- Ngamukote, S., Yanagisawa, M., Ariga, T., Ando, S., and Yu, R.K. (2007). Developmental changes of glycosphingolipids and expression of glycozymes in mouse brains. *J. Neurochem.* *103*, 2327–2341.
- Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massagué, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 274–284.
- Nohara, K., Wang, F., and Spiegel, S. (1998). Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* *48*, 149–157.
- Oblinger, J.L., Pearl, D.K., Boardman, C.L., Saqr, H., Prior, T.W., Scheithauer, B.W., Jenkins, R.B., Burger, P.C., and Yates, A.J. (2006). Diagnostic and prognostic value of glycosyltransferase mRNA in glioblastoma multiforme patients. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* *32*, 410–418.
- Ohkawa, Y., Miyazaki, S., Hamamura, K., Kambe, M., Miyata, M., Tajima, O., Ohmi, Y., Yamauchi, Y., Furukawa, K., and Furukawa, K. (2010). Ganglioside GD3 enhances adhesion signals and augments malignant properties of melanoma cells by recruiting integrins to glycolipid-enriched microdomains. *J. Biol. Chem.* *285*, 27213–27223.
- Ohtani, Y., Tamai, Y., Ohnuki, Y., and Miura, S. (1996). Ganglioside alterations in the central and peripheral nervous systems of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurodegeneration* *5*, 331–338.
- Okada, T., Wakabayashi, M., Ikeda, K., and 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.

- Olivier, M., Langerød, A., Carrieri, P., Bergh, J., Klaar, S., Eyfjord, J., Theillet, C., Rodriguez, C., Lidereau, R., Bièche, I., et al. (2006). The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin. Cancer Res.* *12*, 1157–1167.
- Owens, M.A., Horten, B.C., and Da Silva, M.M. (2004). HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin. Breast Cancer* *5*, 63–69.
- Pan, B., Fromholt, S.E., Hess, E.J., Crawford, T.O., Griffin, J.W., Sheikh, K.A., and 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., et al. (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.
- Di Pardo, A., Maglione, V., Alpaugh, M., Horkey, M., Atwal, R.S., Sassone, J., Ciammola, A., Steffan, J.S., Fouad, K., Truant, R., et al. (2012). Ganglioside GM1 induces phosphorylation of mutant huntingtin and restores normal motor behavior in Huntington disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 3528–3533.
- Polyak, K., and Kalluri, R. (2010). The role of the microenvironment in mammary gland development and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a003244.
- Ponzo, M.G., and Park, M. (2010). The Met receptor tyrosine kinase and basal breast cancer. *Cell Cycle* *9*, 1043–1050.
- Portoukalian, J., Zwingelstein, G., and Doré, J.F. (1979). Lipid composition of human malignant melanoma tumors at various levels of malignant growth. *Eur. J. Biochem.* *94*, 19–23.
- Posse de Chaves, E., and Sipione, S. (2010). Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Lett.* *584*, 1748–1759.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* *12*, R68.
- Prat, A., and Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol* *5*, 5–23.
- Prinetti, A., Loberto, N., Chigorno, V., and Sonnino, S. (2009). Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 184–193.
- Rabu, C., McIntosh, R., Jurasova, Z., and Durrant, L. (2012). Glycans as targets for therapeutic anti-tumor antibodies. *Future Oncol* *8*, 943–960.
- Regina Todeschini, A., and 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.

- Rivinoja, A., Hassinen, A., Kokkonen, N., Kauppila, A., and Kellokumpu, S. (2009). Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases. *J. Cell. Physiol.* *220*, 144–154.
- Roy, P.G., and Thompson, A.M. (2006). Cyclin D1 and breast cancer. *Breast* *15*, 718–727.
- Ruan, S., Raj, B.K., and Lloyd, K.O. (1999). Relationship of glycosyltransferases and mRNA levels to ganglioside expression in neuroblastoma and melanoma cells. *J. Neurochem.* *72*, 514–521.
- Ruckhäberle, E., Karn, T., Rody, A., Hanker, L., Gätje, R., Metzler, D., Holtrich, U., and Kaufmann, M. (2009). Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *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.
- Sandhoff, K. (2012). My journey into the world of sphingolipids and sphingolipidoses. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* *88*, 554–582.
- Sano, R., Annunziata, I., Patterson, A., Moshiah, S., Gomero, E., Opferman, J., Forte, M., and d' Azzo, A. (2009). GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca²⁺-dependent mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell* *36*, 500–511.
- Sasaki, K., Kurata, K., Kojima, N., Kurosawa, N., Ohta, S., Hanai, N., Tsuji, S., and Nishi, T. (1994). Expression cloning of a GM3-specific alpha-2,8-sialyltransferase (GD3 synthase). *J. Biol. Chem.* *269*, 15950–15956.
- Scaringi, R., Piccoli, M., Papini, N., Cirillo, F., Conforti, E., Bergante, S., Tringali, C., Garatti, A., Gelfi, C., Venerando, B., et al. (2013). NEU3 sialidase is activated under hypoxia and protects skeletal muscle cells from apoptosis through the activation of the epidermal growth factor receptor signaling pathway and the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *J. Biol. Chem.* *288*, 3153–3162.
- Schauer, R. (2009). Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *19*, 507–514.
- Schnaar, R.L. (2010). Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Lett.* *584*, 1741–1747.
- Schnaar, R.L., Suzuki, A., and Stanley, P. (2009). Glycosphingolipids. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press),.
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., and Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 5795–5800.
- Scott, A.M., Lee, F.T., Hopkins, W., Cebon, J.S., Wheatley, J.M., Liu, Z., Smyth, F.E., Murone, C., Sturrock, S., MacGregor, D., et al. (2001). Specific targeting, biodistribution, and lack of immunogenicity of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma: results of a phase I trial. *J. Clin. Oncol.* *19*, 3976–3987.

- Scott, A.M., Liu, Z., Murone, C., Johns, T.G., MacGregor, D., Smyth, F.E., Lee, F.-T., Cebon, J., Davis, I.D., Hopkins, W., et al. (2005). Immunological effects of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immun.* 5, 3.
- Scully, O.J., Bay, B.-H., Yip, G., and Yu, Y. (2012). Breast cancer metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 9, 311–320.
- Sergina, N.V., and Moasser, M.M. (2007). The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med* 13, 527–534.
- Seyfried, T.N., and Mukherjee, P. (2010). Ganglioside GM3 Is Antiangiogenic in Malignant Brain Cancer. *J Oncol* 2010, 961243.
- Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.
- Shinoura, N., Dohi, T., Kondo, T., Yoshioka, M., Takakura, K., and Oshima, M. (1992). Ganglioside composition and its relation to clinical data in brain tumors. *Neurosurgery* 31, 541–549.
- Sonnino, S., Aureli, M., Loberto, N., Chigorno, V., and Prinetti, A. (2010). Fine tuning of cell functions through remodeling of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycohydrolases. *FEBS Lett.* 584, 1914–1922.
- Sorice, M., Matarrese, P., Manganeli, V., Tinari, A., Giammarioli, A.M., Mattei, V., Misasi, R., Garofalo, T., and Malorni, W. (2010). Role of GD3-CLIPR-59 association in lymphoblastoid T cell apoptosis triggered by CD95/Fas. *PLoS ONE* 5, e8567.
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 10869–10874.
- Spessott, W., Crespo, P.M., Daniotti, J.L., and Maccioni, H.J.F. (2012). Glycosyltransferase complexes improve glycolipid synthesis. *FEBS Lett.* 586, 2346–2350.
- 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_{O3} and G_{P3} in Breast Cancer Cells Expressing the G_{D3} Synthase. *Molecules* 17, 9559–9572.
- Stroop, C.J., Weber, W., Gerwig, G.J., Nimtz, M., Kamerling, J.P., and Vliegenthart, J.F. (2000). Characterization of the carbohydrate chains of the secreted form of the human epidermal growth factor receptor. *Glycobiology* 10, 901–917.
- Surma, M.A., Klose, C., and Simons, K. (2012). Lipid-dependent protein sorting at the trans-Golgi network. *Biochim. Biophys. Acta* 1821, 1059–1067.
- Suzuki, J., Chen, Y.-Y., Scott, G.K., Devries, S., Chin, K., Benz, C.C., Waldman, F.M., and 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., and Yu, R.K. (2011). Histone acetylation-mediated glycosyltransferase gene regulation in mouse brain during development. *J. Neurochem.* 116, 874–880.
- SVENNERHOLM, L. (1964). THE GANGLIOSIDES. *J. Lipid Res.* 5, 145–155.

- Tao, K., Fang, M., Alroy, J., and Sahagian, G.G. (2008). Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer* 8, 228.
- Tettamanti, G. (2004). Ganglioside/glycosphingolipid turnover: new concepts. *Glycoconj. J.* 20, 301–317.
- Tringali, C., Lupo, B., Silvestri, I., Papini, N., Anastasia, L., Tettamanti, G., and Venerando, B. (2012). The plasma membrane sialidase NEU3 regulates the malignancy of renal carcinoma cells by controlling β 1 integrin internalization and recycling. *J. Biol. Chem.* 287, 42835–42845.
- Valaperta, R., Chigorno, V., Basso, L., Prinetti, A., Bresciani, R., Preti, A., Miyagi, T., and Sonnino, S. (2006). Plasma membrane production of ceramide from ganglioside GM3 in human fibroblasts. *FASEB J.* 20, 1227–1229.
- Vandenhoute, E., Sevin, E., Hallier-Vanuxeem, D., Dehouck, M.-P., and 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.
- Vilcaes, A.A., Demichelis, V.T., and Daniotti, J.L. (2011). Trans-activity of plasma membrane-associated ganglioside sialyltransferase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 286, 31437–31446.
- Wang, B. (2009). Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu. Rev. Nutr.* 29, 177–222.
- Weigelt, B., Geyer, F.C., and Reis-Filho, J.S. (2010). Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol* 4, 192–208.
- Weis, F.M., and Davis, R.J. (1990). Regulation of epidermal growth factor receptor signal transduction. Role of gangliosides. *J. Biol. Chem.* 265, 12059–12066.
- Wen, F.Q., Jabbar, A.A., Patel, D.A., Kazarian, T., and 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., and Sandhoff, K. (2000). Degradation of membrane-bound ganglioside GM1. Stimulation by bis(monoacylglycerol)phosphate and the activator proteins SAP-B and GM2-AP. *J. Biol. Chem.* 275, 35814–35819.
- Xu, J., Chen, Y., and Olopade, O.I. (2010). MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer* 1, 629–640.
- Yamashita, T., Allende, M.L., Kalkofen, D.N., Werth, N., Sandhoff, K., and Proia, R.L. (2005). Conditional LoxP-flanked glucosylceramide synthase allele controlling glycosphingolipid synthesis. *Genesis* 43, 175–180.
- Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., and Proia, R.L. (1999). A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 9142–9147.
- Yanagisawa, K. (2007). Role of gangliosides in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1943–1951.
- Yanagisawa, K. (2011). Pathological significance of ganglioside clusters in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 116, 806–812.

- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* *117*, 927–939.
- Yoon, S.-J., Nakayama, K., Hikita, T., Handa, K., and 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., and Furukawa, K. (2001). Ganglioside G(D2) in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res.* *61*, 4244–4252.
- Yoshida, T., Eguchi, H., Nakachi, K., Tanimoto, K., Higashi, Y., Suemasu, K., Iino, Y., Morishita, Y., and Hayashi, S. (2000). Distinct mechanisms of loss of estrogen receptor alpha gene expression in human breast cancer: methylation of the gene and alteration of trans-acting factors. *Carcinogenesis* *21*, 2193–2201.
- Yowler, B.C., Kensinger, R.D., and Schengrund, C.-L. (2002). Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing synaptotagmin I. *J. Biol. Chem.* *277*, 32815–32819.
- Yu, R.K., Bieberich, E., Xia, T., and Zeng, G. (2004). Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. *J. Lipid Res.* *45*, 783–793.
- Yu, R.K., Nakatani, Y., and Yanagisawa, M. (2009). The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *J. Lipid Res.* *50 Suppl*, S440–445.
- Yu, R.K., Tsai, Y.-T., and Ariga, T. (2012). Functional roles of gangliosides in neurodevelopment: an overview of recent advances. *Neurochem. Res.* *37*, 1230–1244.
- Yu, R.K., Tsai, Y.-T., Ariga, T., and Yanagisawa, M. (2011). Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--an overview. *J. Oleo Sci* *60*, 537–544.
- Yvon, E., Del Vecchio, M., Savoldo, B., Hoyos, V., Dutour, A., Anichini, A., Dotti, G., and Brenner, M.K. (2009). Immunotherapy of metastatic melanoma using genetically engineered GD2-specific T cells. *Clin. Cancer Res.* *15*, 5852–5860.
- Zeng, G., Gao, L., Birklé, S., and 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.
- Zeng, G., Li, D.D., Gao, L., Birklé, S., Bieberich, E., Tokuda, A., and Yu, R.K. (1999). Alteration of ganglioside composition by stable transfection with antisense vectors against GD3-synthase gene expression. *Biochemistry* *38*, 8762–8769.
- Zhang, L., Wang, Y., Wang, L., Cao, T., Hyuga, S., Sato, T., Wu, Y., Yamagata, S., and Yamagata, T. (2011). Ganglioside GD1a negatively regulates hepatocyte growth factor expression through caveolin-1 at the transcriptional level in murine osteosarcoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1810*, 759–768.

