

THÈSE DE DOCTORAT
Présentée à l'Université de Lille
École Doctorale de Biologie Santé-Lille
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Régulation de l'expression du ganglioside OAcGD2 dans le cancer du sein : vers de nouvelles cibles thérapeutiques

Soutenue publiquement par
Angéline Kasprovicz

Le 14 juin 2024 devant le jury composé de :

Président	Pr Tony Lefebvre	Université de Lille
Rapporteurs	Pr Christelle Breton	CERMAV, Grenoble
	Pr Abderrahman Maftah	Université de Limoges
Examineurs	Dr Jean-Marc Le Doussal	OGD2 Pharma, Nantes
	Dr Audrey Vincent	Canther, Lille
Directrice	Pr Sophie Groux-Degroote	Université de Lille

Ce travail a été réalisé au sein de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle (UGSF), UMR CNRS 8576 sous la direction du Pr Sophie Groux-Degroote, en collaboration avec la société OGD2 Pharma (thèse CIFRE).

Pour des raisons de confidentialité, les travaux sur la cytotoxicité médiée par les différents variants d'anticorps anti-OAcGD2, produits par OGD2 Pharma, sur les cellules de neuroblastome, de cancer du sein et de gliome pédiatrique ne sont pas présentés dans le manuscrit.

Remerciements

Mes premiers remerciements vont au Docteur Christelle Breton et au Docteur Abderrahman Maftah qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je voudrais également remercier le Docteur Audrey Vincent pour avoir suivi ce travail au cours de ces trois années, en tant que membre de mes CSI, mais aussi en étant examinatrice lors du jury de thèse.

Je souhaite remercier le Professeur Tony Lefebvre pour me faire l'honneur de présider le jury. Merci Tony d'avoir cru en moi, c'est en partie grâce à toi si j'en suis arrivée là.

Merci au Docteur Jean-Marc Le Doussal, président d'OGD2 Pharma, pour avoir soutenu financièrement ce projet et pour m'avoir offert l'opportunité de collaborer à l'interface entre le milieu académique et l'industrie.

Merci infiniment Sophie pour l'encadrement exceptionnel. Je suis admirative de toute la bienveillance dont tu fais preuve. Merci de m'avoir fait confiance, de m'avoir encouragée, de m'avoir aidée à surmonter mes peurs. Tes conseils et ton soutien m'ont vraiment donné confiance tout au long de la thèse. Je suis très reconnaissante du travail de relecture et de corrections que tu as fait pour ce manuscrit.

Merci Anne de m'avoir accueillie dans l'équipe. Merci pour ces discussions et les encouragements.

Merci Philippe d'avoir suivi le projet, d'avoir participé aux réunions. Merci pour tes remarques mais aussi pour tes conseils.

Merci Yann de m'avoir accueillie au sein de l'UGSF et merci pour ta bienveillance.

Merci infiniment Christophe B pour tes précieux conseils et ta confiance constante en moi.

Merci à l'équipe d'OGD2 Pharma. Mylène, un immense merci pour avoir pris le temps de

répondre à toutes mes interrogations, pour ta gentillesse, et pour tes corrections sur ce manuscrit. Brigitte et Emilie, je suis reconnaissante pour vos relectures attentives des différents rapports tout au long de cette thèse qui m'ont beaucoup aidée. Nina et Paul, je vous adresse également mes remerciements pour votre aide précieuse dans l'analyse des résultats et pour votre contribution au dossier présenté au comité d'éthique.

Merci aux personnes qui m'ont accueillie, aidée et avec qui j'ai pu collaborer, à l'IRCL puis à Oncolille. Je pense notamment à Samuel Meignan, Christine Bal, Nicolas Jonckheere, Suman Mitra, Adeline Cozzani, Silvia Gaggero. Merci également à Sofia Titah et Aurélie Guillemette d'avoir partagé des moments de détente autour de la table.

Merci Dorothée et Céline de m'avoir soutenue. Merci d'avoir toujours répondu à mes interrogations techniques, j'étais persuadée d'avoir toujours une réponse auprès de vous. Merci Virginie pour ta bonne humeur. Je suis ravie d'avoir pu travailler avec des collègues exceptionnels.

Merci Corentin pour toute l'aide que tu m'as apportée, tu es le king de la microscopie et de l'informatique. Merci de toujours penser à moi quand il s'agit de médiation scientifique.

Merci aux stagiaires, Maxime, Lucie, Clairène, Clément, Elias, Meidine, qui sont passés dans le laboratoire et qui m'ont permis d'avancer dans ma recherche. Je m'excuse si j'ai été exigeante avec vous. Mon souhait était de vous transmettre au moins le sens du sérieux et de la rigueur dans notre travail. Je suis contente que Clairène, Maxime et Lucie, vous continuiez à travailler dans l'équipe, je vous souhaite beaucoup de réussite.

Merci à tous les enseignants avec qui j'ai eu l'opportunité de partager des séances de travaux pratiques. C'est grâce à vous que j'ai pu explorer différentes dimensions de l'enseignement.

Merci à toutes les personnes qui ont pris le temps de discuter, manger, rigoler, que ce soit de science ou d'autres sujets. En réalité, je peux remercier tout le C9. Nous sommes

privilegiés d'avoir des collègues exceptionnels.

Merci à Vincent et Clémence pour leur amitié. Merci Vincent pour ton soutien, tu as toujours les mots justes. Merci Clémence d'être cette oreille attentive. Je suis heureuse que chacun s'épanouisse professionnellement et personnellement.

Merci à mes parents qui ont toujours tout donné pour ma réussite, et qui continuent de le faire. Maintenant que je suis maman, je réalise combien le bonheur de son/ses enfants est essentiel pour son propre bonheur. Merci Papa, Maman, Victoria d'être présents pour Lila, pour moi, pour Alexis. Et moi aussi je suis fière de vous !

Merci Alexis de partager ma vie, de me soutenir comme tu le fais. Merci d'avoir été là dans les moments plus difficiles, de doutes. Je suis reconnaissante de la façon dont tu me pousses à être la meilleure version de moi-même. Je suis fière de ce que tu fais, de cette force qui te caractérise, de ce que tu fais pour notre famille. Je suis fière que notre fille ait un papa comme toi. A la folie !

Lila, mon amour, merci d'être arrivée dans nos vies et particulièrement la mienne. Tu m'as permis d'appréhender cette thèse avec beaucoup de sérénité. Je suis fière de la grande fille que tu es. Je t'aime plus que tout au monde !

A toutes ces personnes que je n'ai pas citées mais qui ont participé à rendre cette aventure si intéressante : MERCI

Publications

Angelina Kasprowicz, Sumeyye Cavdarli, Philippe Delannoy, Xavier Le Guezennec, Clémence Defebvre, Corentin Spriet, Nicolas Jonckheere, Jean-Marc le Doussal, Suman Mitra, Samuel Meignan, Sophie Groux-Degroote. « **Anti-OAcGD2 antibody in combination with ceramide kinase inhibitor mediate potent antitumor cytotoxicity against breast cancer and diffuse intrinsic pontine glioma cells** ». Soumis à *Molecular and Cellular Biochemistry*.

Sophie Groux-Degroote, Philippe Delannoy, Sumeyye Cavdarli, Jean-Marc Le Doussal, **Angéline Kasprowicz**. “**Use of CASD1 as a biomarker of a cancer expressing the O-Acetylated GD2 ganglioside**”. Brevet PCT/EP2022/065896 Juin 2022.

Kasprowicz A, Sophie GD, Lagadec C, Delannoy P. “**Role of GD3 Synthase ST8Sia I in Cancers**”. *Cancers* (Basel). 2022, **14**(5):1299. doi:10.3390/cancers14051299. PMID: 35267607; PMCID: PMC8909605.

Communications par affiches

« Rôle de la Sialyl-O-Acétyltransférase CASD1 dans l'O-Acétylation du ganglioside GD2 dans les cancers de type neuroectodermiques »

Angéline Kasprowicz, Sumeyye Cavdarli, Larissa Schrôter, Malena Albers, Anna-Maria Baumann, Dorothée Vicogne, Jean-Marc Le Doussal, Martina Mulhenoff, Philippe Delannoy et Sophie Groux-Degroote.

Présenté aux congrès suivants :

- 31th Joint Glycobiology meeting, visioconférence, Septembre 2021
- 14^{èmes} journées du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France, Mai 2022

« Deciphering and targeting GD2 ganglioside O-acetylation pathways in neuroectoderm-derived cancers »

Angéline Kasprowicz, Sumeyye Cavdarli, Christine Bal, Tiziano Ingegnere, Silvia Gaggero, Suman Mitra, Nicolas Jonckheere, Jean-Marc Le Doussal, Samuel Meignan, Philippe Delannoy, Sophie Groux-Degroote.

Présenté aux congrès suivants :

- OncoLille Days, Lille, Lille, France, Novembre 2022
- 15^{èmes} journées du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville, France, Mai 2023
- 15th Jenner Glycobiology and Medicine, Porto, Portugal, Juin 2023 – **Prix du meilleur poster**

« Inhibition of ceramide kinase boosts anti-OAcGD2 immunotherapy in neuroectoderm-derived cancer cell lines »,

Angéline Kasprowicz, Sumeyye Cavdarli, Philippe Delannoy, Xavier Le Guezennec, Clémence Defebvre, Corentin Spriet, Nicolas Jonckheere, Jean-Marc le Doussal, Suman Mitra, Samuel Meignan, Sophie Groux-Degroote.

Sera présenté au congrès SialoGlyco 2024, Lille, France, Juin 2024

« Inflammatory bone marrow microenvironnement impairs responses to daratumumab and lenalidomide in multiple myeloma. A correlative study of the IFM2017-03 trial »

*Cheng W, Gaggero S, Ouelkdite A, Escure G, Cozzani A, Tchantchou Njosse Y, Carlier N, Leprohon M, **Kasprowicz A**, Groux S, Hasan Bou Issa L, Villenet C, Figeac M, Moreaux J, Arnulf B, Corre J, Martinet L, Leleu X, Facon T, Jin W, Mitra S, Manier S.*

Sera présenté au congrès EHA 2024, Madrid, Espagne, Juin 2024

Communications orales

« Deciphering and targeting GD2 ganglioside O-acetylation pathways in neuroectoderm-derived cancers »

***Angéline Kasprowicz**, Sumeyye Cavdarli, Christine Bal, Tiziano Ingegnere, Nicolas Jonckheere, Jean-Marc Le Doussal, Samuel Meignan, Philippe Delannoy, Sophie Groux-Degroote*

Présenté aux congrès suivants :

- 32nd Joint Glycobiology meeting, Utrecht, Pays Bas, Septembre 2022
- Communication orale par le Pr Sophie Groux-Degroote au congrès Sialoglyco 2022, Nagoya, Japon Septembre 2022
- Séminaire hebdomadaire de l'UGSF, Octobre 2022

<i>Liste des figures</i>	14
<i>Liste des tableaux</i>	17
<i>Résumé</i>	18
<i>Abstract</i>	20
<i>Liste des abréviations</i>	22
<i>Introduction</i>	26
<i>Partie I : Structures et fonctions des gangliosides</i>	27
1. Structure des glycosphingolipides	27
1.1. Structure du céramide	27
1.2. Structure de la partie glycanique	28
2. Nomenclature des gangliosides	30
3. Métabolisme des gangliosides	32
3.1. Biosynthèse	32
3.2. Gangliosides O-acétylés	34
3.2.1. Les acides sialiques et leurs modifications	35
3.2.2. Les sialate-O-acétyl-estérases (SOAE)	36
3.2.3. Les sialate-O-acétyl-transférases (SOAT)	36
3.2.4. Expression des gangliosides O-acétylés	38
3.3. Catabolisme	39
3.4. Régulation de l'expression des gangliosides	41
3.4.1. Lien entre expression des ARNm de glycosyltransférases, activité glycosyltransférasiques et structures glycaniques synthétisées	42
3.4.2. Régulation transcriptionnelle	43
3.4.3. La disponibilité de substrat et l'organisation supramoléculaire sont des éléments de régulation de l'expression des gangliosides	44
3.4.4. Modifications post traductionnelles	45
4. Distribution et propriétés biologiques des gangliosides	46
4.1. Tissus sains	47
4.2. Tissus Cancéreux	49

<i>Partie II : Immunothérapie ciblant les gangliosides</i>	53
1. Les cellules immunitaires	54
2. Cytotoxicité des cellules NK	55
3. Structures et fonctions des anticorps	57
4. Mécanismes anti-tumoraux des anticorps thérapeutiques	61
4.1. Activité cytotoxique dépendante du complément (CDC)	62
4.2. Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)	62
5. Ingénierie des anticorps	63
6. L'immunothérapie anti-GD2	64
6.1. Anticorps murins	64
6.1.1. L'anticorps 3F8	64
6.1.2. L'anticorps 14G2a	65
6.2. Anticorps chimériques	66
6.2.1. Dinutuximab (=Unitixin)	66
6.2.2. Quarziba	67
6.3. Anticorps humanisés	68
6.3.1. Naxitamab	68
6.3.2. Anticorps monoclonal hu14.18K322A	68
7. Anticorps anti-OAcGD2	69
8. Autres stratégies de ciblage des gangliosides	70
8.1. Les immunocytokines	70
8.2. Les anticorps bi ou tri-spécifiques	70
8.3. Les cellules CAR-T	71
<i>Partie III : Cancer du sein</i>	75
1. Origine neuroectodermique	75
2. La glande mammaire	76
3. Les différents sous-types de cancers du sein	76
4. Traitements	78

<i>Contexte</i>	81
1. Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha (<i>PIK3C2A</i>)	88
1.1. Les différentes classes de PI3K	88
1.2. Fonctions de PIK3C2A	90
1.3. Rôles de PIK3C2A dans le cancer	91
1.4. Stratégies de ciblage de PIK3C2A	92
2. CERK	92
2.1. Rôles de la céramide kinase (CERK) et du céramide-1-phosphate (C1P)	92
2.2. CERK et cancer	94
2.3. Stratégie de ciblage de CERK	95
<i>Objectifs de la thèse</i>	96
<i>Travaux de recherche</i>	97
Régulation de l'expression du ganglioside OAcGD2 dans le cancer du sein : vers de nouvelles cibles thérapeutiques	98
1. Matériels et méthodes	98
1.1. Analyses transcriptomiques	98
1.2. Culture cellulaire	98
1.3. Anticorps et inhibiteurs	99
1.4. Transfections par siARN	99
1.5. RT-qPCR (Reverse transcription – PCR quantitative)	100
1.6. Immunohistochimie et microscopie confocale	101
1.7. Tests de migration en chambres de Boyden	102
1.8. Western Blot	102
1.9. Cytométrie en flux	103
1.10. Antibody-dependant Cell cytotoxicity ADCC	103
2. Résultats	104
2.1. Etude de la survie globale chez les patients atteints de cancers d'origine neuroectodermique exprimant des enzymes impliquées dans la biosynthèse d'OAcGD2	104

2.2.	Etude de l'expression de GD2 et d'OAcGD2, ainsi que celle des gènes impliqués dans leur biosynthèse, dans les cancers d'origine neuroectodermique	107
2.3.	Effet de l'inhibition de PIK3C2A sur l'expression d'OAcGD2	109
2.3.1.	Inhibition de PIK3C2A par siARN	109
2.3.2.	Inhibition de PIK3C2A par PIK90	111
2.4.	Effet de l'inhibition de <i>CERK</i> sur l'expression d'OAcGD2	112
2.4.1.	Inhibition de <i>CERK</i> par siARN	112
2.4.2.	Inhibition de <i>CERK</i> par le NVP231	113
2.5.	Etude de l'inhibition de <i>CERK</i> sur les capacités de migration des cellules de cancer du sein	115
2.6.	Etude de l'inhibition de <i>CERK</i> sur l'induction de l'apoptose dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+	117
2.7.	Etude de la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps anti-OAcGD2 médiée par les cellules NK	119
2.8.	Etude de combinaisons thérapeutiques pour le traitement de cancers d'origine neuroectodermique ciblant <i>CERK</i> et l'OAcGD2	120
2.8.1.	Etude par cytométrie en flux de l'inhibition de <i>CERK</i> sur l'expression d'OAcGD2	120
2.8.2.	Etude de la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps anti-OAcGD2 médiée par les cellules NK ; effet de l'inhibition de <i>CERK</i> .	121
2.9.	Etude d'autres combinaisons thérapeutiques ciblant les HDAC et l'OAcGD2 pour le traitement de cancers d'origine neuroectodermique	123
3.	Conclusion	124
Projet annexe : Etude du profil gangliosidique de lignées d'ostéosarcomes : lien avec la résistance à la doxorubicine.		126
1.	Introduction	126
2.	Matériels et méthodes	130
2.1.	Culture cellulaire	130
2.2.	RT-qPCR (Reverse transcription – PCR quantitative)	131
2.3.	Western Blot	132

2.4.	Cytométrie en flux	133
2.5.	Extraction et purification des glycosphingolipides	133
2.6.	Spectrométrie de masse	134
2.7.	Hydrolyse des Acides sialiques et dérivation au DMB	134
3.	Résultats	135
3.1.	Etude de la résistance des cellules à la doxorubicine	135
3.2.	Etude de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des gangliosides dans les cellules d'ostéosarcomes par RT-qPCR	136
3.3.	Etude du profil ganglioside des cellules d'ostéosarcome par cytométrie en flux	137
3.4.	Analyse des glycosphingolipides par spectrométrie de masse	139
3.5.	Analyse des acides sialiques	141
4.	Conclusion	142
	<i>Discussion générale et perspectives</i>	145
	<i>Bibliographie</i>	156

Liste des figures

Figure 1 : Représentation du céramide.	28
Figure 2 : Biosynthèse des gangliosides.	34
Figure 3 : Principales structures d'acides sialiques rencontrées chez les vertébrés.	36
Figure 4 : : Implication de la sialate- <i>O</i> -acétyltransférase CASD1 dans la biosynthèse du ganglioside OAcGD2.	38
Figure 5 : Métabolisme et trafic intracellulaire des gangliosides.	40
Figure 6 : Dégradation lysosomale du ganglioside OAcGD2.	41
Figure 7 : Implication des gangliosides GD3 et GD2 dans l'activation des MAPKs dans différents cancers d'origine neuro-ectodermique.	52
Figure 8 : Représentation des cellules immunitaires dérivant des cellules souches hématopoïétiques.	55
Figure 9 : Les différentes régions d'un immunoglobuline G	59
Figure 10 : Structure des anticorps murin, humain, chimérique et humanisé.	61
Figure 11 : Les mécanismes de cytotoxicité liés à l'anticorps, exemple de l'anticorps anti-OAcGD2.	63
Figure 12 : Mécanismes d'action du dinutuximab dans les cellules de neuroblastome.	67
Figure 13 : Structures des récepteurs antigéniques chimériques (CAR).	72
Figure 14 : Mécanismes de cytotoxicité des cellules CART-T, CAR-K-NK et CAR-M.	73
Figure 15 : Diagramme représentant l'évolution des feuilletts embryonnaires.	76
Figure 16 : Stades du cancer du sein en utilisant le système TNM.	77
Figure 17 : Les différents sous-types de cancer de sein	78
Figure 18 : Classification et options thérapeutiques pour les différents sous types de cancer du sein triple négatif.	80
Figure 19 : Le criblage par siARN révèle des régulateurs positifs et négatifs de l'expression d'OAcGD2.	84
Figure 20 : Gènes identifiés dans le criblage haut débit comme augmentant l'expression d'OAcGD2.	86
Figure 21 : Gènes identifiés dans le criblage haut débit comme diminuant l'expression d'OAcGD2.	87

Figure 22 : Regroupement de gènes impliqués dans la biosynthèse du OAcGD2 (identifiés par criblage par siARN haut débit) par famille fonctionnelle (Gene Ontology, GO).	88
Figure 23 : Structure des trois isoformes de phosphoinositide 3-kinase de classe II (PI3KC2)	89
Figure 24 : Fonction des différentes isoformes de PIK3C2.	91
Figure 25 : Métabolisme des sphingolipides.	93
Figure 26 : Rôle du C1P dans la tumorigenèse	95
Figure 27 : Carte de chaleur montrant le hazard ratio et l'intervalle de confiance à 95% pour de hauts et faibles niveaux d'expression des gènes <i>ST8SIA1</i> , <i>β4GALNT1</i> , <i>CASD1</i> , <i>CERK</i> et <i>PIK3C2A</i> seuls ou en combinaisons dans les cohortes TCGA des cancers d'origine neuroectoderme.	105
Figure 28 : Expression de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides complexes et expression d'OAcGD2 dans des cancers d'origine neuroectodermique	108
Figure 29 : Effet de l'inhibition de <i>PIK3C2A</i> par siARN sur l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ et les cellules de neuroblastome Kelly	110
Figure 30 : Effet de l'inhibition de <i>PIK3C2A</i> par l'inhibiteur PIK90 sur l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ (A) et les cellules de neuroblastome Kelly (B).	111
Figure 31 : Effet de l'inhibition de <i>CERK</i> par siARN sur l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ (A) et les cellules de neuroblastome Kelly (B).	113
Figure 32 : Effet de l'inhibition de <i>CERK</i> par le NVP231 sur l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ (A) et les cellules de neuroblastome Kelly (B).	114
Figure 33 : Effet de l'inhibition de <i>CERK</i> analysé sur la migration cellulaire, étudiée par utilisation de chambres de Boyden (A et B) et tests de blessures (C et D).	116
Figure 34 : Etude de l'inhibition de <i>CERK</i> sur l'induction de l'apoptose dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+.	118

Figure 35 : Taux de cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps médiée par les cellules effectrices NK dans les cellules de cancer du sein et les cellules de gliome pédiatrique	119
Figure 36 : Etude de l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ et de gliome pédiatrique DIPG13 lorsque CERK est inhibé par le NVP23.	121
Figure 37 : Etude de l'effet de combinaison thérapeutique ciblant CERK et l'OAcGD2 sur la cytotoxicité des cellules de cancer du sein et de gliome pédiatrique	122
Figure 38 : Etude de l'effet de combinaison thérapeutique ciblant les HDAC et l'OAcGD2 sur la cytotoxicité des d'anticorps anti-OAcGD2 sur des cellules du cancers du sein MDA-MB-231 GD3S+.	123
Figure 39 : Schéma simplifié de la biosynthèse des gangliosides pour l'étude du profil gangliosidique des cellules d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine.	130
Figure 40 : Expression de MDR1 dans les lignées d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine.	135
Figure 41 : Expression de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides dans les cellules d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine par RT-qPCR	136
Figure 42 : Etude de l'expression des gangliosides dans les lignées d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine par cytométrie en flux.	138
Figure 43 : Profil des glycosphingolipides de lignées d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine par spectrométrie de masse MALDI-TOF.	140
Figure 44 : Quantification de l'acide <i>N</i> -acétylneuraminique (Neu5Ac) et d'acide <i>N</i> -acétylneuraminique 9- <i>O</i> -acétylé (Neu5,9Ac ₂) des gangliosides des lignées d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine.	142

Liste des tableaux

Tableau 1 : Structure glycaniques permettant de définir les différentes séries de glycosphingolipides des mammifères.	29
Tableau 2 : Nomenclatures et structures des gangliosides.	31
Tableau 3 : Caractéristiques et propriétés des isotypes d'anticorps.	58
Tableau 4 : Séquences cibles des siARN.	100
Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR.	101
Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR des cellules d'ostéosarcome.	131
Tableau 7 : Synthèse des résultats obtenus lors des analyses d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des gangliosides et l'expression des gangliosides.	144

Résumé

Les gangliosides complexes émergent comme des marqueurs tumoraux d'intérêt pour la thérapie anti-cancéreuse. L'anticorps anti-GD2 dinutuximab a reçu l'approbation de la Food and Drug Administration en 2015, puis de l'Agence Européenne du médicament en 2017. Cependant, l'utilisation de cet anticorps se heurte à une forte cytotoxicité en raison de l'expression du ganglioside GD2 sur les nerfs périphériques des patients. L'OAcGD2, la forme O-acétylée du GD2, est exprimée spécifiquement dans les tissus cancéreux et n'est pas exprimée sur les nerfs périphériques, représentant une cible thérapeutique d'intérêt.

La société OGD2 Pharma, partenaire de ce projet, se concentre sur le développement d'anticorps thérapeutiques dirigés contre le ganglioside OAcGD2. Dans de nombreux cancers d'origine neuroectodermique, les gangliosides complexes sont réexprimés, impliqués dans le développement tumoral, et associés à un mauvais pronostic. Des travaux effectués dans le cadre d'une collaboration antérieure entre le Pr Sophie Groux-Degroote de l'équipe « Régulation de la glycosylation terminale » de l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, avec la société OGD2 Pharma (Nantes) ont permis d'identifier l'OAcGD2 comme marqueur de cellules cancéreuses mammaires, et d'identifier l'enzyme CASD1 responsable de l'O-acétylation du GD2 dans le cancer du sein.

Néanmoins, les mécanismes contrôlant l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer dérivés du neuroectoderme restent très mal compris. A l'aide d'une technologie de screening à haut débit ciblant le phosphatome/kinome couplée à la microscopie, nous avons identifié 2 gènes, *PIK3C2A* et *CERK*, dont l'inhibition augmente significativement l'expression du ganglioside OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231 stablement transfectées par la GD3 synthétase (GD3S+).

En utilisant des siARN et des inhibiteurs nous avons confirmé l'implication de *CERK* dans l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein et de neuroblastome. L'inhibition de *CERK* entraîne également une diminution de la migration des cellules de cancer du sein. Nos résultats ont également montré qu'un anticorps anti-OAcGD2 induit une cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC) dans les cellules de cancer du sein triple négatif et de gliome pédiatrique. Cette cytotoxicité est amplifiée en couplant l'inhibiteur de *CERK* à l'immunothérapie anti-OAcGD2. Nos résultats mettent en évidence que l'inhibition de *CERK*

augmente l'expression d'OAcGD2, et que cette stratégie pourrait potentialiser l'efficacité de l'anticorps anti-OAcGD2 chez les patients atteints de différents cancers d'origine neuroectodermique exprimant l'OAcGD2.

En parallèle, nous avons entrepris l'étude du profil gangliosidique de cellules d'ostéosarcomes sensibles et résistantes à la chimiothérapie par la doxorubicine. Ce projet, hautement collaboratif, suggère que l'OAcGD2 pourrait être une cible thérapeutique prometteuse pour les cancers résistants aux traitements.

Ce projet met en lumière l'importance de connaître les mécanismes de régulation de biosynthèse d'OAcGD2 dans les cancers neuroectodermiques, et ouvre de nouvelles perspectives de ciblage d'OAcGD2 pour les cancers résistants aux thérapies.

Abstract

Complex gangliosides are emerging as tumour markers of interest for therapy. The anti-GD2 antibody Dinutuximab received approval from the Food and Drug Administration in 2015 and then from the European Medicines Agency in 2017. However, the use of this antibody is hampered by high cytotoxicity due to the expression of the GD2 ganglioside on peripheral nerves of patients. OAcGD2, the *O*-acetylated form of GD2, is specifically expressed in cancerous tissues, and represents a new therapeutic target of interest.

OGD2 Pharma, our partner in this project, is focusing on the development of therapeutic antibodies directed against OAcGD2. In many cancers of neuroectodermal origin, complex gangliosides are re-expressed, implicated in tumour development and associated with a poor prognosis. Previous work carried out as part of a collaboration between Pr Sophie Groux-Degroote of the "Regulation of terminal glycosylation" team in the Structural and Functional Glycobiology Unit, and OGD2 Pharma, led to the identification of OAcGD2 as a marker for breast cancer cells, and to the identification of the CASD1 enzyme responsible for *O*-acetylation of GD2 in breast cancer.

However, the mechanisms controlling OAcGD2 expression in neuroectoderm-derived cancer cells remain poorly understood. Using a high-throughput phosphatome/kinome targeted screening technology coupled with microscopy, we identified 2 genes, *PIK3C2A* and *CERK*, whose inhibition significantly increases OAcGD2 expression in MDA-MB231 triple negative breast cancer cells stably transfected with GD3 synthase (GD3S+).

Using siRNAs and inhibitors we confirmed the involvement of *CERK* in OAcGD2 expression in breast cancer and neuroblastoma cells. Inhibition of *CERK* also leads to reduced migration of breast cancer cells. Our results also showed that anti-OAcGD2 antibody induced antibody-dependent cytotoxicity (ADCC) in triple-negative breast cancer and pediatric glioma cells. This cytotoxicity was increased by coupling the *CERK* inhibitor to anti-OAcGD2 immunotherapy. Our results show that *CERK* inhibition increases OAcGD2 expression, and that this strategy could potentiate the efficacy of anti-OAcGD2 antibody in patients with cancers of neuroectodermal origin.

In parallel, we have undertaken a study of the ganglioside profile of osteosarcoma cells sensitive and resistant to doxorubicin chemotherapy. Our preliminary data suggest that OAcGD2 could be a promising therapeutic target for doxorubicin-resistant osteosarcoma.

This project highlights the importance of deciphering GD2 *O*-acetylation mechanisms in cancer and opens new targeting prospects for therapy-resistant cancers.

Liste des abréviations

ADCC = *Antibody dependent cellular cytotoxicity* (Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps)

ADCP = *Antibody dependent cellular phagocytosis* (Phagocytose cellulaire dépendante des anticorps)

ADNc = Acide désoxyribonucléique complémentaire

BC = Breast cancer

C1P = Céramide-1-phosphate

CASD1 = CAS1 domain containing 1 protein

CAR = *Chimeric antigen receptor* (Récepteur chimérique d'antigène)

CDC = *Complement dependant cytotoxicity* (Cytotoxicité dépendante du complément)

CDR = *Complementarity determining region* (Région déterminant la complémentarité)

CERK = Céramide kinase (gène)

CerS = Céramide synthétase

CERT = Céramide transport protein (Protéine de transfert du céramide)

ch14.18 mAb = *chimeric human/mouse anti-GD2 human IgG1 14.18 monoclonal antibody*

c-MET = récepteur de l'hepatocyte growth factor

coA = Coenzyme A

CSC = Cellule souche cancéreuse

DIPG = Diffuse intrinsic pontline glioma

ER = Récepteur aux oestrogènes

Fab = Fragment antigen-binding

FAK = focal adhesion kinase

Fc = Fragment cristallisable

FcR = Récepteur de Fc

FCS = Fetal calf serum

FDA = Food and drug administration

Gal = Galactose

GalNAc = *N*-acétylgalactosamine

GD2L: GD2/lactone

Glc = glucose
GlcCer = glucosylcéramide
GlcNAc = *N*-acétylglucosamine
GM2-AP = *GM2 activator protein*
GM-CSF = *Granulocytes-macrophages colony stimulating factor*
GSL = glycosphingolipide
GT = glycosyltransférase
ICK = immunocytokine
Ig = Immunoglobuline
ITIM = *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitor motif* (motif d'inhibition des récepteurs immuns basé sur la tyrosine)
ITAM = *Immunoreceptor tyrosine-based activator motif* (motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine)
HACA = *Human anti-chimeric antibody* (Anticorps humain anti-anticorps chimérique)
HAMA = *Human anti-mouse antibodies* (Anticorps humain anti-anticorps de souris)
HC = *Heavy chain* (chaîne lourde)
HDAC = Histone déacétylase
HER2 = *Human epidermal growth factor receptor 2* (Récepteur humain du facteur de croissance épidermique 2)
HPRT = Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase
KLH = Keyhole limpet hemocyanin
LacCer = Lactosylcéramide
LC = *Light chain* (chaîne légère)
MAPK = *Mitogen-activator protein kinase*
MPLA = Monophosphoryl-lipide A
Neu = Neuraminidase
Neu5Ac = Acide-*N*-acétylneuraminique
Neu5Gc = Acide-*N*-aglycolylneuraminique
NF- κ B = *Nuclear factor κ B*
NK = *Natural killer*
NVP231 = *N*-[2-(Benzoylamino)-6-benzothiazolyl]tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-carboxamide

OAcGD2 = *O-acetylated GD2* (GD2 9-O-acétylé)

PAT = Palmitoyltransférase

PBMC = *Peripheral blood mononuclear cells* (cellules mononucléées du sang périphérique)

PI = Phosphatidylinositol

PI3K = Phosphoinositide 3-kinase

PIK3C2A = Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase subunit type 2 alpha

PR = Récepteur à la progestérone

RE = Réticulum endoplasmique

RTK = Récepteur à activité tyrosine kinase

SAHA = *Suberoylanilide hydroxamic acid*

SAP = *Sphingolipid Activator Proteins*

ScFv = *Single chain fragment variable* (Fragment variable à chaîne unique)

SIAE = Sialate-O-acétylestérase

siARN = Petit ARN interférent

Siglec = *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin*

siNT = *non-targeting control siRNA*

SOAT = Sialate O-acétyltransférase

SphK = Sphingosine kinase

SPT = Sérine palmitoyl-transférase

ST3GAL5 = GM3 synthétase

ST8SIA1 = GD3 synthétase

TACA = *Tumor-associated carbohydrate antigen* (antigène glucidique associé aux tumeurs)

TMD = *Transmembrane domain* (domaine transmembranaire)

TNBC = *Triple negative breast cancer* (cancer du sein triple négatif)

TNF = *Tumor necrosis factor* (facteur de nécrose des tumeurs)

UDP = Uridine diphosphate

UGCG = UGP-glucose : céramide glucosyltransférase

14.18 mAb = anti-GD2 murine IgG3 14.18 monoclonal antibody

3-KSR = 3-kétosphinganine réductase

8B6 mAb = anti-OAcGD2 murine IgG3 8B6 monoclonal antibody

β4GALNT1 = GM2/GD2 synthétase

β 4GALT5 = β 4-galactosyltransférase 5

β 4GALT6 = β 4-galactosyltransférase 6

Introduction

Partie I : Structures et fonctions des gangliosides

Les gangliosides ont été pour la première fois identifiés par Ernst Klenk en 1942 (Klenk, 1942). Ce sont des glycosphingolipides (GSL) portant un ou plusieurs résidus d'acides sialiques, et sont appelés respectivement gangliosides simples ou gangliosides complexes. Les gangliosides sont des composants importants de la membrane cellulaire, ancrés dans un feuillet de la bicouche lipidique grâce à leur partie lipidique, le céramide, et dont la chaîne oligosaccharidique est orientée vers le milieu extracellulaire (Hakomori, 1981). Ils sont concentrés dans les radeaux lipidiques où ils interagissent avec plusieurs protéines transmembranaires dont les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) pouvant ainsi moduler plusieurs voies de signalisation cellulaire, aboutissant par exemple à des modifications des capacités de prolifération, de migration, et d'invasion cellulaire. Les gangliosides présentent une grande hétérogénéité de structure. Ils ont en commun un « noyau » Gal β 1,4Glc β 1,1Cer ou lactosylcéramide (LacCer), pouvant être allongé par d'autres monosaccharides comme la *N*-acétylgalactosamine (GalNAc), le galactose (Gal) et des résidus d'acides sialiques (Acide *N*-acétylneuraminique chez l'homme, Neu5Ac). Ces derniers peuvent subir des modifications telle que la *O*-acétylation, ce qui module les rôles biologiques des glycanes sialylés (Schauer, 2009). Ce chapitre permettra de définir la structure générale des glycosphingolipides puis des gangliosides, et enfin le métabolisme et les fonctions des gangliosides dans un contexte physiologique et pathologique.

1. Structure des glycosphingolipides

1.1. Structure du céramide

Les glycosphingolipides (GSL) sont des molécules dérivées du céramide. Le céramide constitue la partie hydrophobe des glycosphingolipides. Il est formé d'un acide gras lié à une base sphingoïde par une liaison amide (Figure 1) et présente donc une hétérogénéité liée à ces deux composants. En effet, les acides gras sont de longues chaînes carbonées de 16 à 24 carbones et peuvent être saturés, insaturés, ou même hydroxylés. Les bases sphingoïdes, qui ont en commun une longue chaîne aliphatique et une extrémité 2-amino, 1,3 diol, peuvent

varier en longueur, en nombre d'insaturations et d'hydroxylation. La base sphingoïde majoritaire chez les mammifères est la sphingosine avec 18 carbones et une insaturation entre le C4 et le C5. La structure du céramide peut influencer la localisation et les fonctions des glycosphingolipides au sein de la membrane plasmique (Iwabuchi *et al.*, 2008).

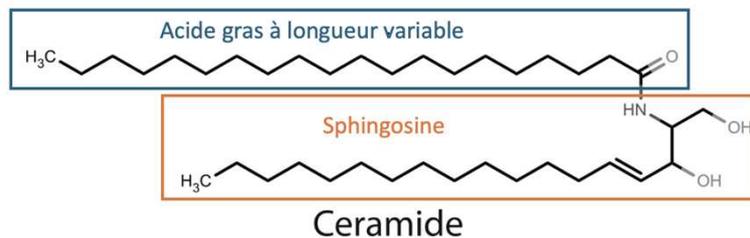


Figure 1 : Représentation du céramide.

Une base sphingoïde (ici la sphingosine) est liée à un acide gras de longueur variable par liaison amide

1.2. Structure de la partie glycanique

Les GSL complexes dérivés du glucosylcéramide (GlcCer) sont synthétisés par ajout successifs de résidus de monosaccharides à partir de leurs précurseurs, des nucléotides-sucres activés, sur le GlcCer. La partie oligosaccharidique est généralement composée de glucose (Glc), Gal, GalNAc, N-acétylglucosamine (GlcNAc), et Neu5Ac qui permettent la classification des GSL en 5 séries principales chez les mammifères : lacto, néolacto, globo, isoglobo et ganglio, en fonction de la composition de la nature des deux monosaccharides transférés sur le LacCer et de la nature des liaisons entre ces monosaccharides (Sonnino *et al.*, 1988) (Tableau 1).

Tableau 1: Structure glycaniques permettant de définir les différentes séries de glycosphingolipides des mammifères.

Glc : glucose, Gal : galactose, GalNAc : N-Acétylgalactosamine, Cer : céramide. Adapté de (Degroote *et al.*, 2004)

Série	Symbole	Structure
Lacto	Lac	Gal β 1-3GlcNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer
NeoLacto	nLac	Gal β 1-4GlcNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Globo	Gb	GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Isoglobo	iGb	GalNAc β 1-3Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer
Ganglio	Gg	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer

Les glycosphingolipides peuvent également être classés selon 3 catégories :

- Les glycosphingolipides neutres, dont l'oligosaccharide est constitué de monosaccharides neutres comme le glucosylcéramide. Ce sont essentiellement les glycosphingolipides des séries globo et lacto/néolacto, exprimés sur les cellules sanguines et les fibroblastes.
- Les glycosphingolipides sulfatés, contenant un sulfate notamment le galactosylcéramide-sulfate et le lactosylcéramide-sulfate. Les glycosphingolipides sulfatés sont exprimés dans les oligodendrocytes producteurs de myéline dans le système nerveux central et périphérique.
- Les glycosphingolipides acides ou gangliosides, dont l'oligosaccharide contient un ou plusieurs résidus d'acides sialiques. La majorité des gangliosides appartiennent à la série ganglio, mais des glycosphingolipides sialylés des séries globo, lacto et néolacto ont été caractérisés. Par exemple, une expression élevée de trois types de disialogangliosides a été caractérisée dans le carcinome rénal : deux sont basées sur une structure de la série lacto de type 1 (disialosyl Lc(4), GalNAc disialosyl Lc(4)), l'autre est basée sur une structure de la série globo (disialosyl globopentaosylcéramide ; disialosyl Gb5) (Ito *et al.*, 2001). Les gangliosides de la série ganglio porteurs de plusieurs résidus d'acide sialique ont été caractérisés pour la première fois dans les neurones.

La chaîne oligosaccharidique des gangliosides est caractérisée par la présence d'acides sialiques. Les acides sialiques forment une famille diversifiée de monosaccharides à neuf atomes de carbone, conférant une charge négative aux gangliosides. Chez la plupart des mammifères, il existe deux formes principales d'acides sialiques : l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) et l'acide *N*-glycolylneuraminique (Neu5Gc). Le Neu5Ac représente l'acide sialique majoritaire chez l'homme (Varki, 2001). A l'opposé, le Neu5Gc n'est retrouvé qu'en quantités infimes dans les tissus humains, à l'exception de certaines tumeurs et des tissus fœtaux (Malykh *et al.*, 2001).

2. Nomenclature des gangliosides

Dans la nomenclature définie par Svennerholm en 1963 (Svennerholm, 1980), les gangliosides de la série ganglio sont définis par deux lettres et un chiffre. Le préfixe G correspond au ganglioside ; les lettres M, D, T, Q et P se réfèrent au nombre d'acides sialiques : GM pour monosialoganglioside, GD pour disialoganglioside, GT pour trisialoganglioside, GQ pour tétrasialoganglioside, GP pour pentasialoganglioside. Les chiffres arabes se réfèrent à la migration des gangliosides en chromatographie sur couche mince, par exemple le GM1 a la plus faible migration parmi les gangliosides monosialylés (Tableau 2). Une autre classification a été recommandée par la Commission Internationale de Nomenclature Biochimique (IUPAC-IUB, 1977) (The nomenclature of lipids (recommendations 1976). IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, 1978) (Tableau 2). Cette nomenclature a été fondée sur la connaissance précise de la structure de l'oligosaccharide. L'abréviation Cer est précédée soit de l'abréviation Lac pour indiquer le lactose de la chaîne glucidique ou du mot ose indicé du nombre de résidus glucidiques présents et précédé des lettres Gg pour la série ganglio. La position de l'acide sialique est indiquée par un chiffre romain et son point d'ancrage sur le carbone par un chiffre arabe. Ces nomenclatures restent imparfaites pour nommer précisément les modifications des sucres ; par exemple, elles ne permettent pas de préciser la position du groupement *O*-acétylé sur les acides sialiques des gangliosides.

Tableau 2 : Nomenclatures et structures des gangliosides.

La colonne de gauche représente la classification donnée par Svennerholm, la colonne centrale est la classification recommandée par la Commission Internationale de Nomenclature Biochimique IUPAC-IUB. Glc : glucose, Gal : galactose, GalNAc : *N*-Acétylgalactosamine, Neu5Ac : acide *N*-acétylneuraminique Adapté de (Mauri *et al.*, 2018).

Nomenclature de Svennerholm	Nomenclature IUPAC-IUB	Structure
GM3	II ³ Neu5AcLacCer	Cer—
GD3	II ³ (Neu5Ac) ₂ LacCer	Cer—
GT3	II ³ (Neu5Ac) ₃ LacCer	Cer—
GM2	II ³ Neu5AcGg ₃ Cer	Cer—
GD2	II ³ (Neu5Ac) ₂ Gg ₃ Cer	Cer—
GM1a	II ³ Neu5AcGg ₄ Cer	Cer—
GM1b	IV ³ Neu5AcGg ₄ Cer	Cer—
GD1b	II ³ (Neu5Ac) ₂ Gg ₄ Cer	Cer—
GT1c	II ³ (Neu5Ac) ₃ Gg ₄ Cer	Cer—
GQ1c	IV ³ Neu5Ac ³ (Neu5Ac) ₃ Gg ₄ Cer	Cer—
GP1c	IV ³ (Neu5Ac) ₂ II ³ (Neu5Ac) ₃ Gg ₄ Cer	Cer—

● Glc ● Gal ■ GalNAc ◆ Neu5Ac

3. Métabolisme des gangliosides

3.1. Biosynthèse

La principale voie de biosynthèse des gangliosides commence dans le réticulum endoplasmique (RE) avec la formation du céramide. Cette synthèse est catalysée en quatre étapes par les enzymes liées à la membrane sur la face cytosolique du réticulum endoplasmique (Merrill, 2002; Merrill, 2011). Tout d'abord, la sérine palmitoyl-transférase (SPT) condense la L-sérine et le palmitoyl-CoA en 3-kétosphinganine. Cette dernière est ensuite réduite en sphinganine par la 3-kétosphinganine réductase (3-KSR). La sphinganine est acétylée par un coenzyme A (CoA) provenant d'un acide gras à longue chaîne pour former le dihydrocéramide qui peut être déhydrogéné grâce à une désaturase et générer le céramide (Rother *et al.*, 1992; Michel *et al.*, 1997). Les céramides synthétases (CerS) sont un groupe d'acyltransférases liées à la membrane du réticulum endoplasmique qui catalysent la *N*-acylation des bases sphingoïdes (Figure 2). Il existe six CerS qui ont différentes spécificités de substrat, exprimées de manière spécifique selon le type cellulaire (Wegner *et al.*, 2016).

Le céramide est ensuite transporté vers l'appareil de Golgi, soit par des vésicules au niveau du cis-Golgi, soit par un transport impliquant la protéine CERT (Ceramide transport protein) au niveau du trans-Golgi. La céramide glucosyltransferase (UGP-glucose céramide glucosyltransférase, UGCG) se trouve dans l'appareil de Golgi, avec la particularité d'avoir son domaine catalytique sur la face cytosolique de la membrane. L'enzyme UGCG transfère le glucose à partir de l'UDP-glucose sur le céramide et le dihydrocéramide liés à la membrane qui proviennent du transport vésiculaire (D'Angelo *et al.*, 2013). Les céramides provenant du transport par la protéine CERT sont impliqués dans la biosynthèse des sphingomyélines (Hanada *et al.*, 2003). Une fraction du GlcCer est ensuite transloqué dans la lumière de l'appareil de Golgi par FAPP2 (Yamaji *et al.*, 2008) et est glycosylé en plusieurs étapes pour former les glycosphingolipides, et en particulier les gangliosides. Les lactosylcéramides synthétases, β 4-galactosyltransférase 5 (β 4GALT5) et β 4-galactosyltransférase 6 (β 4GALT6), permettent la galactosylation du GlcCer pour former le lactosylcéramide (Lannert *et al.*, 1994) (Figure 2).

Au niveau de la lumière de l'appareil de Golgi, différentes sialyltransférases catalysent la synthèse des dérivés du LacCer. Ainsi les sialyltransférases ST3GAL5 (GM3 synthétase), ST8SIA1 (GD3 synthétase) et ST8SIA5 (GT3 synthétase) génèrent respectivement les gangliosides GM3, le GD3 et le GT3. Ces gangliosides servent de précurseurs pour les gangliosides des séries a, b et c (Figure 2). C'est principalement le niveau d'activité de la GM3 synthétase et de la GD3 synthétase qui déterminent la prédominance d'une série ou d'une autre. La plupart des enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides plus complexes ne sont pas spécifiques de leurs substrats (Iber *et al.*, 1992). Le LacCer et ses trois dérivés gangliosidiques peuvent être glycosylés au niveau du trans-Golgi par l'action coordonnée et successive de plusieurs glycosyltransférases (GT) : une *N*-acétylgalactosaminyltransférase (GD2/GM2 synthétase β 4GALNT1), une galactosyltransférase (β 3GALT4) et des sialyltransférases (ST3GAL2 et ST8SIA5) (Figure 2). Les gangliosides ainsi formés sont transportés par des vésicules d'exocytose vers leur destination principale, la membrane plasmique.

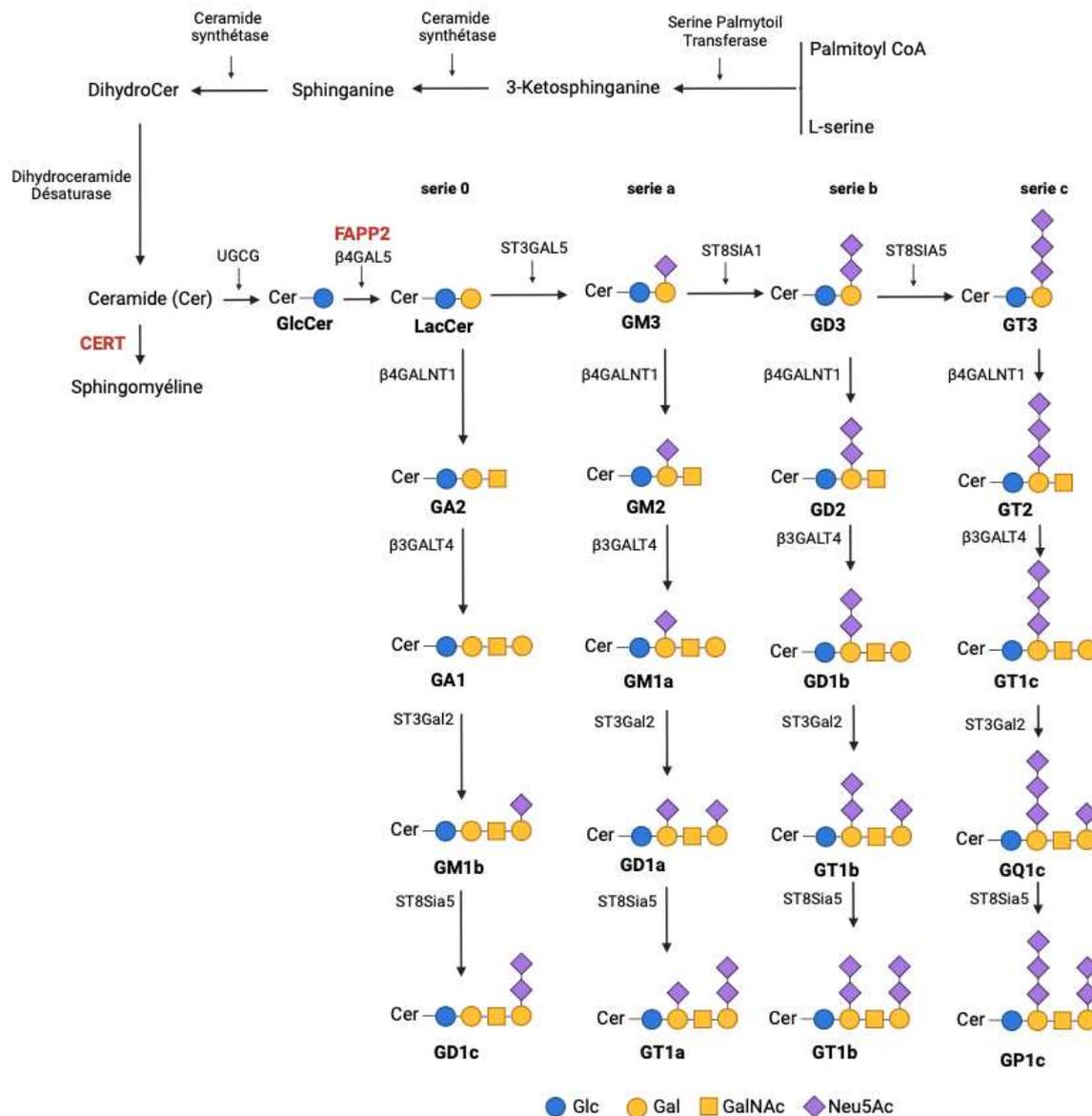


Figure 2 : Biosynthèse des gangliosides.

Les gangliosides sont classés en 4 séries en fonction du nombre de résidus d'acides sialiques lié au lactosylcéramide (LacCer). La serie 0 est directement synthétisée à partir du LacCer et les précurseurs des autres séries sont synthétisés par des sialyltransférases : ST3GAL5 (GM3 synthétase), ST8SIA1 (GD3 synthétase), ST8SIA5 (GT3 synthétase). L'élongation se fait par addition de résidus de N-acétylgalactosamine (GalNAc) grâce à l'enzyme β 4GALNT1, de résidus de galactose (Gal) par la galactosyltransférase β 3GALT4 et d'autres résidus d'acides sialiques (Neu5Ac) par les sialyltransférases (ST3GAL2 et ST8Sia5). Les protéines FAPP2 et CERT impliquées dans le transport du céramide respectivement pour la biosynthèse du glucosylcéramide et de la sphingomyéline sont identifiées en rouge. Glc : glucose. Adapté de (Cavdarli *et al.*, 2019b; Machy *et al.*, 2023)

3.2. Gangliosides O-acétylés

Les gangliosides *O*-acétylés sont considérés comme des marqueurs oncofoétaux dans le cancer. La réaction d'*O*-acétylation a lieu dans l'appareil de Golgi. Elle est spécifique du type de cellule et régulée pendant le développement (Mandal *et al.*, 2015). La synthèse et la dégradation des glycolipides *O*-acétylés sont des processus finement régulés. La réaction d'acétylation dépend de la disponibilité des accepteurs, des substrats, des transporteurs Golgi-ER, de l'internalisation des gangliosides dépendante de la clathrine, et l'équilibre entre les activités sialyl-*O*-acétyltransférase (SOAT) et sialyl-*O*-acétylestérase (SIAE). L'activité SOAT et l'expression des gangliosides *O*-acétylés sont étroitement liées. Une activité SOAT réduite diminue l'acétylation, tandis qu'une activité SOAT accrue augmente l'*O*-acétylation et diminue l'hyposialylation par la sialidase membranaire (Corfield *et al.*, 1999). Ces processus finement régulés donnent lieu à un profil d'expression des gangliosides *O*-acétylés spécifique à chaque tissu/type de cellule (Visser *et al.*, 2021).

3.2.1. Les acides sialiques et leurs modifications

Comme nous l'avons vu, les acides sialiques sont des monosaccharides acides à 9 carbones qui dérivent de l'acide neuraminique (acide 5-amino, 3,5-dideoxy-D-glycero-D-galactononulosonique). Le premier niveau de diversité provient des groupements portés par le C5 (Figure 3A), et les trois espèces majeures sont l'acide le Neu5Ac, le Neu5Gc, et l'acide 3-désoxy-non-2-ulosonique (KdN). Un niveau de complexité supplémentaire résulte de substitutions par des groupements *O*-acétyl, *O*-méthyl, *O*-sulfate, *O*-lactyl et même par des groupements phosphate en différentes positions (Figure 3B).

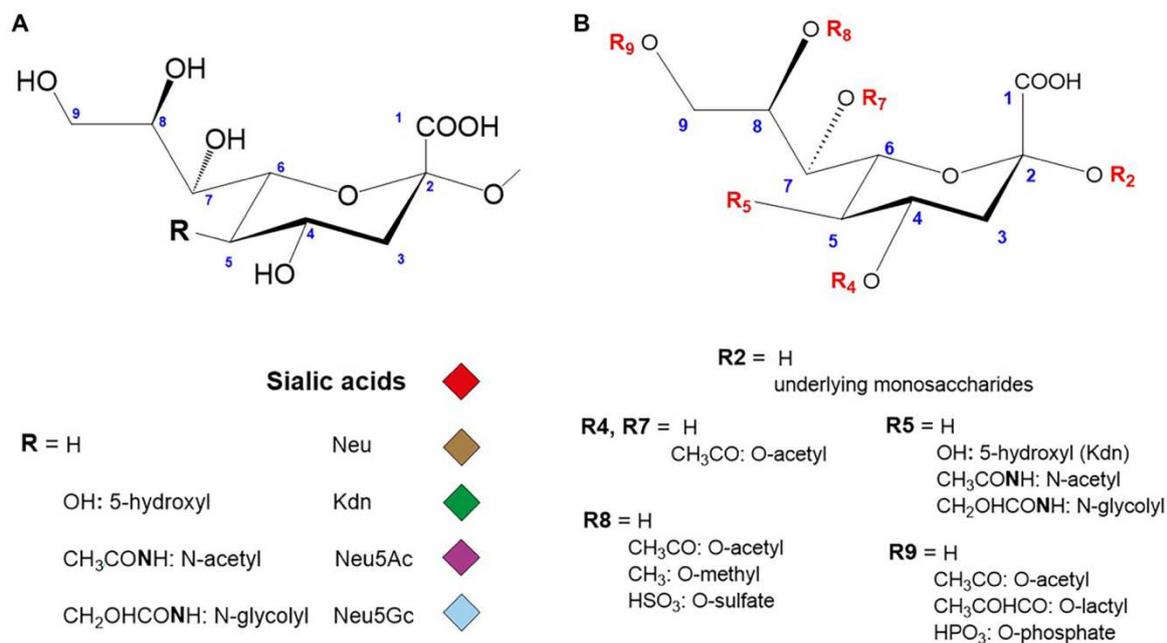


Figure 3 : Principales structures d'acides sialiques rencontrées chez les vertébrés.

A. Les acides sialiques sont représentés par des losanges de couleur selon la nomenclature SNFG (Symbol Nomenclature for Glycans) (Varki *et al.*, 2015). B. Les modifications des acides sialiques avec les groupements *O*-acétyl, *O*-méthyl, *O*-lactyl, *O*-phosphate et *O*-sulfate sont représentées sur chaque atome de carbone de l'acide sialique numéroté en bleu (Harduin-Lepers, 2023).

3.2.2. Les sialate-*O*-acétyl-estérases (SOAE)

Les sialyl-*O*-acétyl-estérases (SIAE) peuvent cliver les groupements *O*-acétyl des C4 et C9 des résidus d'acides sialiques liés aux glycoconjugués, ou des acides sialiques libres libérés des glycoconjugués par les sialidases. La dé-*O*-acétylation peut avoir lieu dans le compartiment lysosomal par une SIAE (Lse) liée à la membrane, ou dans le cytoplasme par SIAE soluble. Les études de Takematsu et collaborateurs suggèrent que la Lse pleine longueur est localisée principalement dans les lysosomes, tandis qu'un variant d'épissage à l'extrémité 5' (dépourvue de peptide signal) code pour une SIAE cytoplasmique. L'expression des SIAE est régulée de manière tissu-spécifique. Alors que les ARNm codant pour la Lse sont exprimés de manière ubiquiste, ceux codant pour la SIAE cytoplasmique sont principalement exprimés dans le foie, l'ovaire et le cerveau (Takematsu *et al.*, 1999).

3.2.3. Les sialate-*O*-acétyl-transférases (SOAT)

La modification majeure des acides sialiques est la *O*-acétylation (Cheresh *et al.*, 1984). L'acétyl-CoA sert de substrat pour cette réaction qui a lieu dans l'appareil de Golgi, catalysée par une (ou des) enzyme(s) appelée(s) sialate-*O*-acétyltransférase (SOAT). Cette *O*-acétylation peut se produire sur les résidus d'acide sialique sur les groupements OH des carbones 4/7/8/9, ces modifications sont alors notées comme suit : Neu4,5Ac₂, Neu5,7Ac₂, Neu5,8Ac₂, Neu5,9Ac₂. La *O*-acétylation peut aussi se produire simultanément sur plusieurs positions donnant des acides sialiques di- ou tri-*O*-acétylés comme le Neu5,7,9Ac₃ ou Neu5,7,8,9Ac₄. Initialement, le principal site de *O*-acétylation semble se situer sur le C7, mais sous des conditions physiologiques de pH et de température, il y a une migration spontanée du groupement *O*-acétyl de la position C7 vers la position C8 ou C9, plus stables (Vandamme-Feldhaus and Schauer, 1998). La *O*-acétylation en position C9 reste la plus courante, cette modification peut affecter aussi bien les acides sialiques terminaux que les acides sialiques internes (Cavdarli *et al.*, 2021).

L'isolement des SOAT par des procédures biochimiques a conduit à la mise en évidence de différentes activités. Par exemple, la SOAT isolée à partir de microsomes préparés à partir de glandes sous-maxillaires bovines transfère préférentiellement des groupes *O*-acétylés sur le C7 du résidu d'acide sialique, ces groupes *O*-acétyl migrant ensuite spontanément en C8 puis en C9 en raison du pH acide (Vandamme-Feldhaus and Schauer, 1998). Par contre, la SOAT isolée à partir de fractions golgiennes de foie de cochon d'Inde transfère les groupes *O*-acétyl sur le C4 du résidu d'acide sialique (Park, 2019). Certaines observations suggèrent que des activités SOAT distinctes existent dans les cellules, en raison d'une spécificité préférentielle envers les résidus d'acides sialiques liés en α 2-8 plutôt qu'en α 2-3 (Chen *et al.*, 2006).

En 2011, la protéine CASD1 (CAS1 Domain-Containing Protein 1) a été identifiée comme une SOAT chez l'Homme (Arming *et al.*, 2011). Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de CASD1 dans la *O*-acétylation des gangliosides (Figure 4). La suppression de CASD1 dans des cellules haploïdes HAP1 entraîne une absence de biosynthèse du ganglioside OAcGD3 (Baumann *et al.*, 2015). Les expériences *in vitro* de Baumann et collaborateurs suggèrent que CASD1 agirait sur le donneur d'acide sialique activé, le CMP-Neu5Ac, et non sur le glycolipide sialylé lui-même (Figure 4B). Néanmoins, une action directe sur le ganglioside reste un mécanisme possible. Dans des cellules de cancer du sein SUM159PT, une diminution

de l'expression d'OAcGD2 est observée lors de l'inhibition de CASD1, tandis qu'une surexpression de CASD1 entraîne une augmentation d'OAcGD2 en surface des cellules (Cavdarli *et al.*, 2021). CASD1 semble être la seule SOAT chez l'Homme et chez les mammifères en général. En effet, dans un modèle murin déficient pour CASD1, la 9-O-acétylation des acides sialiques à la surface des cellules érythroïdes, myéloïdes et des cellules T CD4+ est totalement perdue, ce qui suggère que CASD1 est la seule enzyme impliquée dans la O-acétylation des acides sialiques (Mahajan *et al.*, 2019).

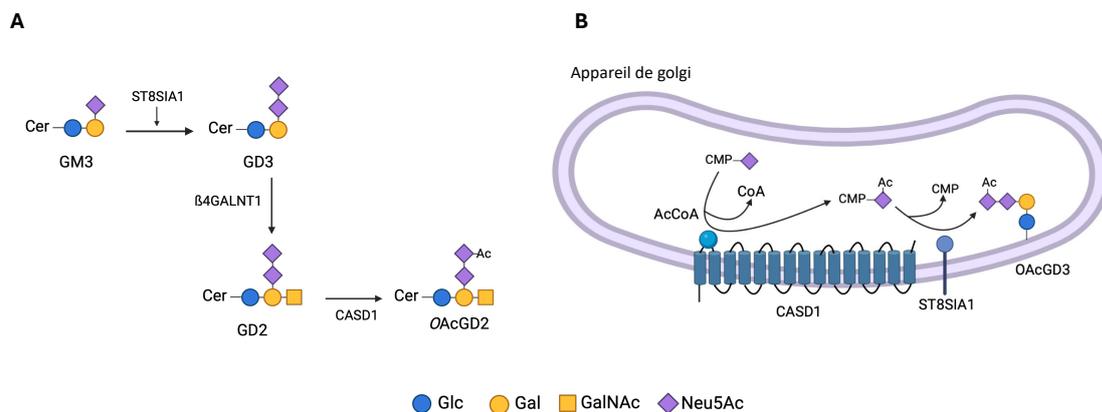


Figure 4 : : Implication de la sialate-O-acétyltransférase CASD1 dans la biosynthèse du ganglioside OAcGD2.

A. Biosynthèse d'OAcGD2 à partir du GM3. B. Voies de biosynthèse d'OAcGD2. La SOAT CASD1 acétyle le CMP-NeuAc en position C-7 ou C-9 en utilisant l'acétyl-CoA comme donneur de groupement acétyl, ou peut agir directement sur le ganglioside. Adapté de (Visser *et al.*, 2021)

3.2.4. Expression des gangliosides O-acétylés

Le GD3 O-acétylé (OAcGD3) a été le premier ganglioside O-acétylé identifié et est donc le mieux étudié. L'OAcGD3 est exprimé durant le développement embryonnaire, dans les cellules du cerveau en développement tel que les neuroblastes mais est absent du cerveau adulte chez la souris (Miyakoshi *et al.*, 2012). L'OAcGD3 est également exprimé durant le développement embryonnaire du rat dans le système nerveux central, dans le système nerveux périphérique, mais aussi dans la rétine et le rein (Constantine-Paton *et al.*, 1986). Les cortex cérébraux fœtaux de rat, de souris, de poulet contiennent des taux élevés d'OAcGD3 et d'OAcGT3 qui diminuent fortement après la naissance (Hirabayashi *et al.*, 1989; Dubois *et al.*, 1990). Ces données suggèrent que les gangliosides O-acétylés jouent un rôle dans le

développement embryonnaire, au niveau du système nerveux central et périphérique. Néanmoins, lorsque CASD1 est invalidé en modèle murin, la 9-O-acétylation des acides sialiques est abolie, et les souris restent viables, ce qui soulève des interrogations sur l'importance de l'O-acétylation des gangliosides au cours du développement.

Les gangliosides O-acétylés sont absents des tissus adultes sains à quelques exceptions. Par exemple, l'OAcGD3 est un marqueur de prolifération après activation des lymphocytes T et B humains (Reivinen *et al.*, 1994). L'expression d'OAcGD3 a la particularité d'être induite par les cytokines IL-4 et IL-3 sécrétées par les lymphocytes T activés (Skov *et al.*, 1997).

Les gangliosides O-acétylés sont donc absents des tissus adultes sains, mais ré-exprimés dans certains cancers. L'OAcGD3 est notamment un marqueur du mélanome (Cheresh *et al.*, 1984) et de leucémie lymphoblastique aigüe (ALL) (Parameswaran *et al.*, 2013). Dans l'ALL, l'OAcGD3 a un rôle anti-apoptotique qui protège les lymphoblastes de l'apoptose induite par le GD3 (Malisan *et al.*, 2002; Mukherjee *et al.*, 2008). Des gangliosides O-acétylés, tels que l'OAcGD3 et l'OAcGT3, ont été décrits dans le cancer du sein ductal invasif (Marquina *et al.*, 1996), et nous avons caractérisé dans l'équipe de multiples gangliosides O-acétylés dans des lignées cancéreuses mammaires : OAcGD2, OAcGD3, OAcGT2, OAcGT3 et OAcGM1 (Cavdarli *et al.*, 2020). L'OAcGD2 est également exprimé dans de nombreux cancers d'origine neuro-ectodermique dont le glioblastome (Mennel *et al.*, 2000), le neuroblastome (Alvarez-Rueda *et al.*, 2011) et le cancer du sein (Cavdarli *et al.*, 2020).

3.3. Catabolisme

A la membrane, les gangliosides sont recyclés suite aux mécanismes d'endocytose. Les gangliosides internalisés peuvent être redirigés à la membrane plasmique (recyclage), ou vers l'appareil de Golgi où ils servent de substrat pour la synthèse de nouveaux gangliosides, ou bien dirigés vers les endosomes tardifs et les lysosomes où a lieu leur catabolisme (Tettamanti, 2003) (Figure 5).

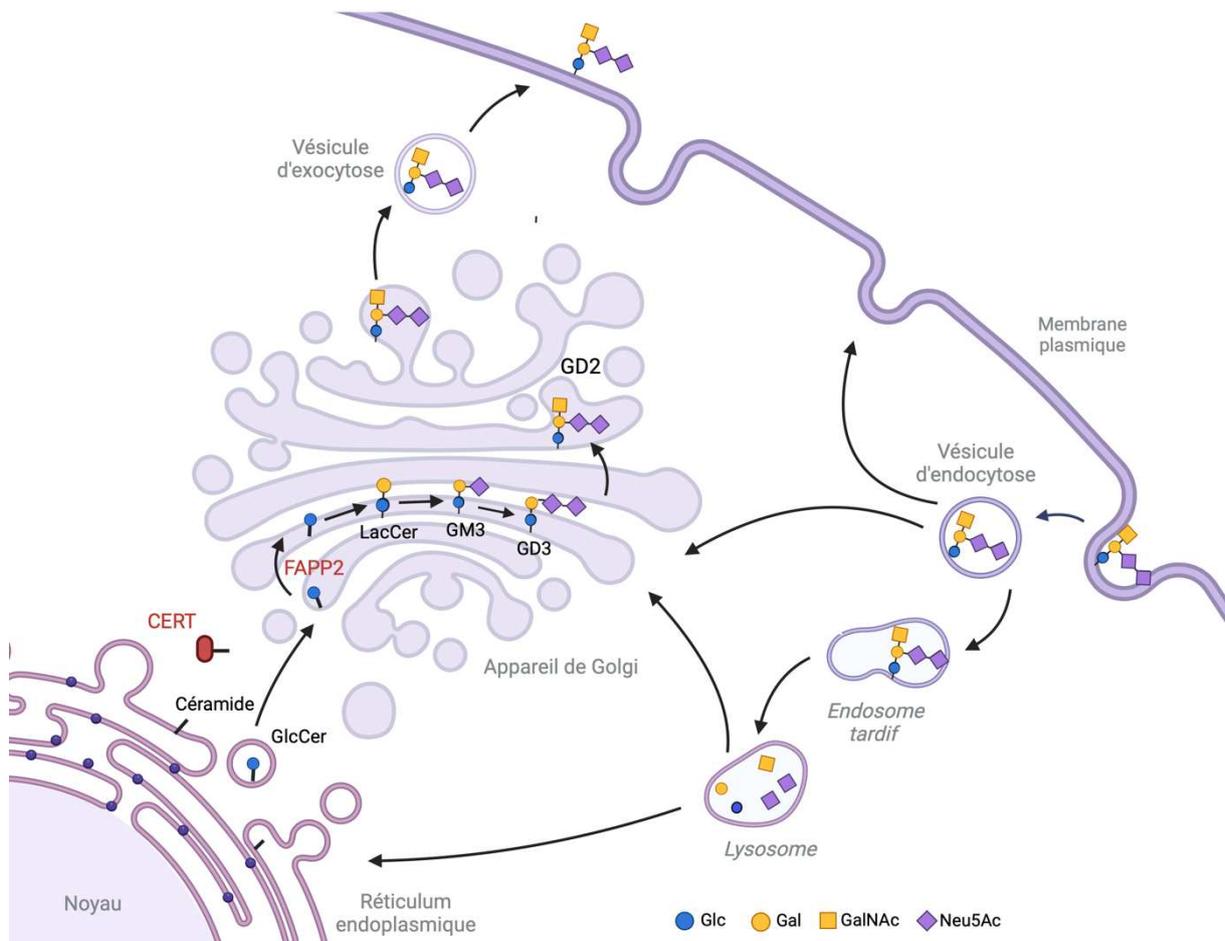


Figure 5 : Métabolisme et trafic intracellulaire des gangliosides.

La biosynthèse des gangliosides commence dans le réticulum endoplasmique par la synthèse du céramide. Le céramide est exporté dans l'appareil de Golgi par des vésicules ou CERT. La protéine FAPP2 serait impliquée dans le transport du GlcCer du cis-Golgi vers le réseau trans-Golgien où, après translocation dans le lumen (par un transporteur de GlcCer encore mal défini), le GlcCer est converti en GSL complexes. Les GSL peuvent ensuite être exportés à la membrane par des vésicules d'exocytose. L'endocytose des gangliosides permet leur recyclage ou leur dégradation.

Les gangliosides sont dégradés en différentes étapes décrites ci-après, et la dégradation d'OAcGD2 est illustrée en Figure 6 à titre d'exemple. Le groupement *O*-acétyl des gangliosides *O*-acétylés est d'abord clivé par une SIAE (*cf.* partie 3.2.2). La deuxième étape est effectuée par les sialidases, ou neuraminidases, qui hydrolysent les acides sialiques terminaux des gangliosides. Les neuraminidases Neu1, Neu4 et Neu3 sont les principales chez les mammifères, et seule la Neu3 exprimée au niveau de la membrane plasmique est décrite comme étant spécifique des gangliosides. Elle joue un rôle important dans la signalisation cellulaire, notamment dans les phénomènes d'interactions cellule-cellule, cellule-matrice et dans la régulation de l'apoptose, en contrôlant le taux des gangliosides au niveau de la membrane plasmique. Après l'action des neuraminidases, différentes exoglycosidases clivent

les résidus de monosaccharides de manière successive. Ces hydrolases requièrent l'aide de protéines liant les lipides comme les saposines, aussi appelés SAP (Sphingolipid Activator Proteins), pour effectuer leur action. Ainsi, SAP-A et SAP-B se lient au GM1 et GM2, tandis que SAP-C et SAP-D contribuent à la dégradation du céramide. Le GM2-Activator Protein (GM2-AP) se lie au GM2, GM1 ou GM3 (Hama *et al.*, 1997). Enfin, la Sap C se lie avec la GlcCer- β -glucosidase permettant la dégradation du GlcCer en Cer, et la liaison entre l'acide gras et la base sphingoïde est hydrolysée par la céramidase acide en présence de Sap D.

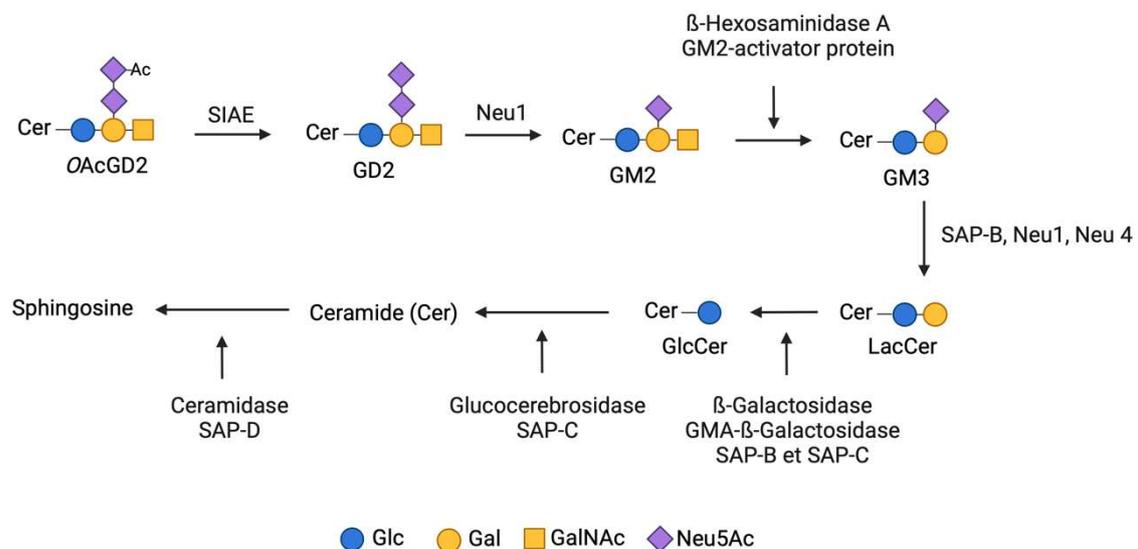


Figure 6 : Dégradation lysosomale du ganglioside OAcGD2.

Le ganglioside OAcGD2 perd son groupement *O*-acétylé suite à l'action de la sialate-*O*-acétylestérase (SIAE). Le ganglioside complexe GD2, de série b est converti en ganglioside simple de la série a (GM2) par clivage de l'acide sialique par la sialidase Neu1. Le GM2 est dégradé en GM3 par clivage du résidu de GalNAc par la β -hexosaminidase A en présence de GM2-AP. Plusieurs sialidases peuvent être impliquées dans la désialylation du GM3 en LacCer. Une β -galactosidase clive ensuite le résidu de galactose du LacCer pour obtenir le GlcCer. Enfin, le céramide est obtenu après l'action de glucocérebrosidase et de saposine (SAP). Adapté de (Schuette *et al.*, 1999; Tettamanti, 2003)

3.4. Régulation de l'expression des gangliosides

Les mécanismes régissant la machinerie de biosynthèse-dégradation des gangliosides, leur adaptation aux besoins physiologiques et leur dérégulation dans de nombreuses pathologies demeurent encore largement méconnus. Les enzymes clés impliquées dans la biosynthèse des gangliosides sont les glycosyltransférases (GT), exprimées de manière spécifique dans les différents tissus et types cellulaires. La régulation de l'expression des

activités glycosyltransférasiques se produit principalement au niveau transcriptionnel (Zeng and Yu, 2008). De nombreux paramètres peuvent également moduler l'expression des gangliosides, tels que le flux membranaire (qui va déterminer la demi-vie des gangliosides), la compétition entre les enzymes agissant sur les mêmes substrats (GT et/ou hydrolases), la régulation traductionnelle des enzymes et leur localisation précise dans l'appareil de Golgi, ainsi que les variations de concentration des substrats accepteurs et des nucléotides-sucres, ou encore des variations de pH intra-golgien (Yu and Bieberich, 2001; Tettamanti, 2003; Yu *et al.*, 2004).

3.4.1. Lien entre expression des ARNm de glycosyltransférases, activité glycosyltransférasiques et structures glycaniques synthétisées

Dans la littérature, de nombreux exemples illustrent une corrélation entre le niveau des ARNm des enzymes impliquées dans la glycosylation et leur activité enzymatique, suggérant ainsi que la glycosylation est régulée par la transcription des gènes concernés. Par exemple, une relation entre la nature des gangliosides exprimés et l'expression de certains gènes de GT (notamment *β 4GALNT1* et *ST8SIA1*) a été observée dans des lignées cellulaires de neuroblastome et de mélanome (Ruan *et al.*, 1999). De manière similaire, notre équipe a démontré que la transfection de l'ADNc codant pour la *ST8SIA1* dans les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 entraîne la biosynthèse de gangliosides de la série b, avec respectivement l'accumulation de gangliosides GD2 et GD1b à la surface des cellules (Cazet *et al.*, 2009; Steenackers *et al.*, 2012)

Chez la souris, l'expression du gène *ST8SIA1* est plus élevée aux premiers stades du développement cérébral, tandis que l'expression du gène *β 4GALNT1* augmente aux stades plus tardifs, ce qui est en corrélation avec les changements d'expression des gangliosides impliqués dans le développement du cerveau (Yamamoto *et al.*, 1996). De la même manière, chez le rat, Yu et collaborateurs ont mis en évidence des changements dans la composition et la biosynthèse des gangliosides dans le cerveau du rat pendant le développement embryonnaire entre E14 (jour 14 du développement embryonnaire) et la naissance, en accord avec les activités glycosyltransférasiques mesurées. Dans le cerveau à E14, les gangliosides GM3 et GD3 sont prédominants, alors que à E16, les gangliosides de la série b, tels que GD1b,

GT1b et GQ1b augmentent. Après E18, les gangliosides de la série a, tels que GM1, GD1a et GT1a, deviennent majoritaires (Yu *et al.*, 1988)

3.4.2. Régulation transcriptionnelle

De nombreux promoteurs de gènes de GT ont été identifiés, ce qui permet une meilleure compréhension de la réponse aux différents signaux physiologiques et stimuli dans divers types cellulaires. Par exemple, l'analyse des gènes de sialyltransférases humaines *ST3GAL2* et *ST3GAL5* a révélé l'existence de multiples exons non traduits en 5' et de sites d'initiation de la transcription (TSS : Transcription Start Site) hétérogènes, ce qui engendre la production de multiples isoformes d'ARNm, pouvant différer dans leur efficacité de traduction ou leur stabilité. L'analyse des séquences génomiques en 5' de ces gènes de sialyltransférases a permis d'identifier des régions promotrices alternatives. Certaines de ces régions promotrices sont impliquées dans l'expression spécifique de ces gènes de sialyltransférases dans un tissu ou un type cellulaire donné, ou à différents moments de l'embryogenèse. Par contre, d'autres gènes de sialyltransférases impliquées dans la biosynthèse des GSLs comme *ST3GAL1*, *ST6GALNAC3*, *ST6GALNAC5*, *ST6GALNAC6*, *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 (Audry *et al.*, 2011).

Du fait de son expression augmentée dans de nombreux cancers et de son rôle crucial dans la biosynthèse des gangliosides complexes impliqués dans la tumorigenèse, la région promotrice du gène *ST8SIA1* a été étudiée dans différents types de cellules, comme le mélanome, le glioblastome, le neuroblastome, et le cancer du sein (Kang *et al.*, 2007; Kwon *et al.*, 2009). La revue que j'ai signée en première auteure "Role of GD3 Synthase ST8Sia I" dans le journal *Cancers*, fait état de nos connaissances générales sur l'expression et la régulation du gène *ST8SIA1* (régulation transcriptionnelle, régulation épigénétique), de son rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse et la progression du cancer, et des différentes approches ciblant l'expression de la *ST8SIA1* dans les cancers (Kasprowicz *et al.*, 2022).

L'organisation génomique et les promoteurs des principaux gènes impliqués dans la synthèse des gangliosides (*β 4GALNT1*, *ST8SIA1*, *ST3GAL5*, *β 3GALT4*, *UGCG*) ont été étudiés.

Les promoteurs de ces gènes partagent une caractéristique commune : ils ne possèdent ni boîte TATA ni boîte CAAT. En revanche, ils comportent plusieurs sites de liaison pour le facteur de transcription général SP1, situés à proximité des sites d'initiation de la transcription (Yu *et al.*, 2004). L'implication de certains facteurs de transcription dans la régulation transcriptionnelle de ces GT impliquées dans la biosynthèse des GSL a été démontrée. Par exemple, dans les lignées cellulaires de prostate, l'expression des gènes de sialyltransférases *ST3GAL1* et *ST3GAL2*, impliquées dans la synthèse de GD1a à partir de GM1, est contrôlée par le facteur de transcription NF- κ B, en particulier par la sous-unité RelB (Hatano *et al.*, 2011). De même, nous avons montré dans l'équipe que le facteur de transcription NF- κ B est impliqué dans l'activation transcriptionnelle de *ST8SIA1* dans les lignées cellulaires de cancer du sein (Bobowski *et al.*, 2013).

Un autre mécanisme de régulation de l'expression des gènes de GT concerne les phénomènes épigénétiques, qui désignent des modifications ou des facteurs capables de moduler l'expression des gènes sans altérer la séquence nucléotidique, comme la méthylation de l'ADN ou des modifications des histones par acétylation. Peu de données sont disponibles sur la régulation épigénétique des GT impliquées dans la biosynthèse des gangliosides. Le niveau d'expression des ARNm de *β GALNT1* et *ST8SIA1* est étroitement lié au niveau d'acétylation des histones H3 (Suzuki *et al.*, 2011). Une étude plus récente suggère que l'expression du gène *ST8SIA1* est également régulée par la méthylation de l'ADN dans les régions promotrices, ce qui conduit à la régulation des phénotypes tumoraux dans des lignées de glioblastome (Yamamoto *et al.*, 2023).

3.4.3. La disponibilité de substrat et l'organisation supramoléculaire sont des éléments de régulation de l'expression des gangliosides

Les GT sont des protéines membranaires de type II comportant une courte queue cytoplasmique N-terminale, un unique domaine transmembranaire (TMD) et un domaine catalytique luminal dans la lumière de l'appareil de Golgi. La localisation subcellulaire précise des GT dans l'appareil de Golgi joue un rôle important dans la régulation de la synthèse des gangliosides. Alors que la synthèse des gangliosides simples se produit dans les régions proximales de l'appareil de Golgi, la synthèse des gangliosides complexes a lieu dans les

régions plus distales (Giraudo and Maccioni, 2003). La LacCer synthétase et la GM3 synthétase (ST3GAL5) forment un complexe enzymatique localisé dans le cis-Golgi pour la synthèse de GM3 dans les cellules CHO-K1. La surexpression de *ST8SIA1* dans ces cellules conduit à la formation d'un complexe trimérique LacCer synthétase - ST3GAL5 - ST8SIA1 localisé dans le réseau trans-golgien, et à la formation de gangliosides de la série b (Giraudo and Maccioni, 2003; Uliana *et al.*, 2006). Les extrémités *N*-terminales de ces GT jouent un rôle dans leur interaction et la formation de complexes, comme le mettent en évidence des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Giraudo *et al.*, 2001).

Comme nous l'avons vu précédemment, certaines GT comme la β 4GALNT1 peuvent agir sur des substrats différents (GM2 et GD2), donc la présence de substrats spécifiques détermine le profil des gangliosides exprimés. 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 stable de *ST8SIA1* dans les cellules de hamster CHO-K1 induit une accumulation des gangliosides GD3 et GT3 (Daniotti *et al.*, 2002). Par contre, l'expression de la même enzyme dans la lignée neuronale PC12 provoque l'accumulation des gangliosides GD1b et GT1b (Fukumoto *et al.*, 2000).

3.4.4. Modifications post traductionnelles

- **N-glycosylation**

Les glycosyltransférases sont des enzymes de type II, souvent pourvues de plusieurs sites de *N*-glycosylation, qui peuvent modifier leur localisation intracellulaire et leur activité. Par exemple, la GM1 synthétase β 3GALT4 porte un *N*-glycane. L'inhibition de la *N*-glycosylation par la tunicamycine ou par des mutations ponctuelles conduit à la synthèse d'un polypeptide de 40 kDa sans activité enzymatique, incapable de quitter le réticulum endoplasmique (Martina *et al.*, 2000). De même, la β 4GALNT1 possède trois sites de *N*-glycosylation, et la diminution de la glycosylation d'un de ces sites entraîne une baisse significative de l'activité enzymatique. Une déglycosylation totale réduit son activité de près de 90%, sans altérer sa localisation intracellulaire (Haraguchi *et al.*, 1995). En outre, la *N*-

glycosylation de ST8SIA1 est essentielle pour son activité catalytique et pour son transport du RE vers l'appareil de Golgi (Martina *et al.*, 1998)

- **Phosphorylation.**

La régulation de plusieurs sialyltransférases, en particulier ST3GAL5 et ST3GAL1, par phosphorylation par les protéines kinase C (PKC) et kinase A (PKA), a été démontrée. Dans des cellules de neuroblastome, l'activation des PKC et PKA entraîne une augmentation de l'activité de la β 4GANT1 et diminue celle des sialyltransférases ST3GAL1 et ST3GAL2, ce qui conduit à une accumulation de GM1 : la PKC phosphoryle des résidus de sérine et thréonine dans les queues cytoplasmiques de la β 4GANT1 et de la ST3GAL1, ce qui modifie l'activité de ces enzymes (Yu and Bieberich, 2001).

- **S-acylation**

La S-acylation, communément appelée palmitoylation, est catalysée par une famille de palmitoyltransférases (PAT) qui sont principalement localisées dans le complexe de Golgi, mais aussi dans le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. Les GT ST3GAL5, ST8SIA1 et β 4GALNT1 sont S-acylés sur des résidus de cystéine conservés situés près de la bordure cytoplasmique de leur TMD. ST3GAL2, une sialyltransférase qui agit sur les glycolipides et les glycoprotéines, est également S-acylée au niveau d'une cystéine conservée située dans la queue cytoplasmique N-terminale (Chumpen Ramirez *et al.*, 2017). Les cystéines qui sont la cible de la S-acylation sur la β 4GALNT1 et la ST3GAL2 sont également impliquées dans la formation d'homodimères par le biais de liaisons disulfures, ce qui suggère une balance entre S-acylation et formation des homodimères de GTs.

4. Distribution et propriétés biologiques des gangliosides

Les gangliosides sont principalement localisés à la membrane plasmique. Ce sont des composants majeurs des microdomaines enrichis en sphingolipides et cholestérol appelés radeaux lipidiques. Les gangliosides sont capables de se lier et d'interagir avec de nombreuses protéines, au sein d'un même feuillet membranaire (interactions en cis) ou avec des molécules présentes sur une autre cellule (interactions en trans). Ils jouent un rôle crucial dans la

maintenances de l'intégrité des tissus et leur fonction. Leur nature et leur distribution varient en fonction du stade du développement, du tissu ou du type cellulaire. Des modifications d'expression des gangliosides sont associées à de multiples pathologies, comme les cancers ou les maladies neuro-dégénératives. Les gangliosides complexes, en particulier *O*-acétylés, sont exprimés au cours de l'embryogenèse, disparaissent dans les tissus sains adultes, mais sont re-exprimés au cours du développement tumoral et sont donc considérés comme des marqueurs des cancers d'origine neuroectodermique.

4.1. Tissus sains

Les gangliosides sont particulièrement abondants dans le système nerveux et plus particulièrement dans le cerveau. Les gangliosides simples, comme le GM3, prédominent dans la plupart des tissus périphériques (Prokazova *et al.*, 2009), tandis que plus de 90% de la masse des gangliosides du cerveau est constituée de quatre gangliosides des séries a et b : GM1, GD1a, GD1b et GT1b. Le ganglioside GD3 a une proportion stable de 5 % dans le cerveau, de la gestation au cerveau adulte. Le GD2, quant à lui, représente 5 à 7 % des gangliosides du cerveau durant la gestation, sa proportion décline progressivement jusqu'à seulement 2 % dans le cerveau adulte (Svennerholm *et al.*, 1989; Svennerholm *et al.*, 1991).

Les gangliosides contribuent à la stabilité et à la structure des membranes cellulaires, en particulier dans les neurones. Leur présence aide à maintenir l'intégrité de la membrane et à faciliter les interactions entre les cellules. Les gangliosides agissent comme des molécules de signalisation cellulaire, modulant les interactions entre les cellules et leur environnement. Les gangliosides sont des ligands fonctionnels des lectines de la famille des Siglec (Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin) qui jouent des rôles variés dans l'adhésion et la signalisation. Dans le système nerveux, la glycoprotéine MAG (glycoprotéine associée à la myéline, ou Siglec 4) des cellules myélinisantes se lie aux gangliosides GD1a et GT1b des axones des cellules nerveuses pour assurer des interactions stables entre l'axone et la myéline (Schnaar, 2023). Dans le système immunitaire, la Siglec-7 des cellules NK se lie aux gangliosides GD3 et GD2, ce qui inhibe la signalisation cellulaire. La Siglec-1 (sialoadhésine, CD169) sur les macrophages se lie aux gangliosides sur les tumeurs et les virus enveloppés.

Les gangliosides sont également impliqués dans des processus tels que la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Dans le système nerveux, les gangliosides jouent un rôle crucial dans le développement, la fonction et la plasticité synaptique (régulation de la croissance des neurites, formation et la stabilisation des synapses, transmission synaptique). Par exemple, le GM1 peut interagir avec ses récepteurs à la surface des cellules pour activer des processus tels que la migration et l'extension neuronale, le développement cortical néonatal et la croissance des axones (Willinger and Schachner, 1980). Le GM1 est donc considéré comme un marqueur de différenciation neuronale. Le GM1 et la GQ1b, mais pas d'autres gangliosides, stimulent la neuritogenèse dans les cellules de neuroblastome, et le GM1 accélère la croissance des neurites dans les neurones primaires périphériques et centraux (Skaper *et al.*, 1985). Les mécanismes par lesquels le GM1 active la croissance et différenciation neuronale sont peu décrits, mais vraisemblablement médiés par l'activation de récepteurs en surface des cellules et l'activation de voies de signalisation intracellulaires. Par exemple, le GM1 déclenche la phosphorylation et l'activation des récepteurs Trk et Erk (Duchemin *et al.*, 2002), l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase, et la libération de neurotrophine-3 en stimulant l'autophosphorylation de TrkC (Duchemin *et al.*, 2002).

Certains gangliosides ont un rôle essentiel au niveau des membranes de l'enveloppe nucléaire. Les gangliosides GM1 et GD1a sont associés à deux sialidases, Neu3 dans la membrane interne et Neu1 dans la membrane externe. Les deux isoformes convertissent le GD1a en GM1 dans leurs membranes respectives. Le GM1 joue un rôle important dans la régulation de la concentration de calcium (Ca^{2+}) dans à la fois au niveau de la membrane plasmique et de l'enveloppe nucléaire, mais de manière différente. Au niveau de la membrane nucléaire, le GM1 aide à contrôler la concentration de Ca^{2+} à l'intérieur du noyau en potentialisant l'activité d'un échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ situé dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire (Ledeen and Wu, 2011). A la membrane plasmique, le GM1 régule la concentration de Ca^{2+} dans le cytosol en modulant l'activité d'un canal calcique voltage-indépendant. De plus, des études menées sur des cellules de neuroblastomes suggèrent que la concentration de GM1 augmente dans l'enveloppe nucléaire lors du déclenchement de l'axonogenèse. De plus, le GM1 nucléaire protégerait les cellules de l'apoptose (Ledeen and Wu, 2011).

4.2. Tissus Cancéreux

Les gangliosides complexes sont exprimés au cours de l'embryogenèse, perdus chez l'adulte, et ré-exprimés dans de nombreux cancers ; la modification du profil gangliosidique dans les cellules tumorales contribue à la malignité et la progression du cancer, avec en règle générale une augmentation des capacités de prolifération, migration, invasion, et de métastase des cellules cancéreuses, mais aussi une augmentation de l'angiogenèse et un rôle des gangliosides complexes dans l'échappement au système immunitaire (Sarkar *et al.*, 2023). Les mécanismes responsables de l'expression des gangliosides complexes sont multiples, avec notamment une augmentation d'expression de ST8SIA1 qui permet le passage des gangliosides simples de la série a aux gangliosides complexes des séries b et c. Le GD3, ainsi que le GD2, sont connus comme marqueurs du mélanome, du neuroblastome ou du cancer du poumon à petites cellules (Yoshida *et al.*, 2001; Furukawa *et al.*, 2006).

De manière générale, il semble que les gangliosides monosialylés comme GM3 et GM1 ont tendance à diminuer les propriétés tumorales (Haga *et al.*, 2008; Dong *et al.*, 2010) et que les gangliosides disialylés comme le GD3 et le GD2 ont tendance à l'augmenter. Par exemple, le GM3 et le GM1 inhibent la prolifération cellulaire dans les gliomes (Ledeen and Wu, 2018), les carcinomes épidermoïdes (Bremer *et al.*, 1986), le neuroblastome (Mirkin *et al.*, 2002) et les astrocytomes. L'inhibition de la croissance cellulaire se produit de concert avec l'inactivation de récepteurs de facteurs de croissance et l'induction de l'apoptose. Mirkin *et al.* ont montré que le traitement par les gangliosides de la série a GM1, GM3 et GD1a inhibe la prolifération des cellules de neuroblastome par inhibition de la phosphorylation et de l'activation de l'EGFR. En outre, l'ajout de GM1 exogène à des cellules de cancer de sein inhibe la prolifération en modifiant la localisation de l'EGFR des radeaux lipidiques vers les cavéoles (Zhuo and Guan, 2019).

Les travaux de notre équipe dans des cellules de mélanome SK-Mel28, de neuroblastome LAN-1 et dans plusieurs lignées de cancer du sein ont démontré une forte expression de gangliosides simples GM1, GM2, GM3, mais surtout de gangliosides complexes GD2, GD3, GT2, GT3 et de leurs homologues O-acétylés (OAcGD2, OAcGD3, OAcGT2, OAcGT3) (Dewald *et al.*, 2018; Cavdarli *et al.*, 2020). De nombreuses études ont montré l'implication du GD2 dans l'agressivité des cellules cancéreuses. Le GD2 est associé à l'activation du

récepteur cMET (Cazet *et al.*, 2012) mais aussi à l'activation des voies de signalisation PI3K/AKT et ERK/MAPK (Cazet *et al.*, 2010) dans des cellules de cancer de sein triple négatif, induisant l'augmentation de la prolifération, de la migration et de la croissance tumorale en modèle murin. D'autres études ont montré que le GD2 est associé à la voie de signalisation FAK/AKT dans les cellules de mélanomes (Yesmin *et al.*, 2022), les cellules de gliomes (Iwasawa *et al.*, 2018), les cellules de cancer du sein triple négatif (Nguyen *et al.*, 2018) et les ostéosarcomes (Liu *et al.*, 2014). Les RTK et voies de signalisation activées par le GD2 dans les cancers sont représentés dans la figure 7.

Les études montrent le lien entre un environnement tumoral inflammatoire et l'expression des gangliosides. La surexpression du facteur de nécrose des tumeurs (TNF) induit une surexpression de *ST8SIA1*, l'enzyme responsable de l'expression des gangliosides complexes (Dewald *et al.*, 2018), et la surexpression de la *ST8SIA1* dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 augmente la prolifération des cellules (Cazet *et al.*, 2009). De plus, une forte expression de *ST8SIA1* a été décrite comme étant de mauvais pronostic pour plusieurs cancers comme les glioblastomes (Ohkawa *et al.*, 2021) ou cancer du sein (Ruckhäberle *et al.*, 2009).

Les gangliosides complexes sont également considérés comme des marqueurs de cellules souches cancéreuses (CSC), c'est le cas du ganglioside GD2 identifié comme marqueur des cellules souches de cancer du sein CD44^{hi}CD24^{lo}. De plus, les gènes responsables de la biosynthèse du GD2 comme *ST3GAL5*, *β4GALNT1* et *ST8SIA1* sont fortement exprimés dans ces cellules (Battula *et al.*, 2012). L'inhibition de l'expression de *ST8SIA1* et *β4GALNT1* diminue l'expression de GD2 et GD3 dans les cellules souches de cancer du sein modifiant leur phénotype en cellules de cancer non souches (Liang *et al.*, 2013). Ces études montrent que les gangliosides sont impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse des CSC.

Une autre étude montre que les gangliosides sont impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse : dans des cellules de cancer du sein MCF-7 la surexpression de *β3GALT4*, l'enzyme responsable de la synthèse du GM1, induit une augmentation du GM1 mais aussi une sécrétion élevée de vésicules extracellulaires. Ces vésicules enrichies en GM1, mises en contact avec les cellules mammaires saines MCF10A, permettent d'augmenter les capacités migratoires des cellules et leurs caractéristiques mésenchymateuses (Ma *et al.*, 2022).

Les gangliosides sont également présents sur les lymphocytes dans un contexte pathologique. L'étude des gangliosides sur les lymphocytes de patients atteints de mélanome a montré que le GD2 est exprimé à la fois sur les lymphocytes T et les lymphocytes B, alors que le GD3 est principalement exprimé sur les lymphocytes T (Hersey and Jamal, 1989). Les Siglec-7 et Siglec-1 sont connues pour s'associer aux gangliosides permettant l'évasion du système immunitaire dans les cancers (Hugonnet *et al.*, 2021). Les gangliosides des cellules cancéreuses ont des rôles immunomodulateurs envers différents types de cellules lymphoïdes. Par exemple, les gangliosides modifient la réponse des lymphocytes T par différentes voies, en induisant l'apoptose et en les orientant vers un phénotype Th2. Les gangliosides disialylés peuvent également inhiber la cytotoxicité des cellules NK par interaction avec la Siglec-7 et en bloquant l'interaction entre l'IFN- β et son récepteur. Dans le cas des lymphocytes B, les gangliosides peuvent stimuler ou inhiber la sécrétion d'IgA, d'IgM et d'IgG, selon le type de ganglioside (van der Haar Àvila *et al.*, 2023).

Certains gangliosides complexes favorisent la vascularisation de la tumeur. Par exemple, les gangliosides GD1a (Lang *et al.*, 2001), GM2 et GD2 favorisent l'angiogenèse (Yoshida *et al.*, 2020) contrairement au GM3 qui lui a un rôle anti-angiogénique (Chung *et al.*, 2009).

Enfin, le GD3 induit l'apoptose des lymphomes à cellules (Rippo *et al.*, 2000). En revanche, l'OAcGD3 a un rôle opposé, avec des propriétés anti-apoptotiques, son accumulation entraîne un blocage de l'apoptose médiée par FAS (Birks *et al.*, 2011)

Au vu des multiples rôles pro-tumoraux des gangliosides complexes, les enzymes responsables de la synthèse des gangliosides sont des cibles de stratégies thérapeutiques, c'est le cas par exemple de ST8SIA1 (Kasprowicz *et al.*, 2022). Le promoteur du gène *ST8SIA1* contient des sites liant le facteur de transcription NF- κ B. Le ciblage de NF- κ B par l'intermédiaire de l'oestradiol (Bobowski *et al.*, 2013) ou à l'aide d'un inhibiteur de NF- κ B (Kwon *et al.*, 2010) diminue la synthèse de *ST8SIA1*.

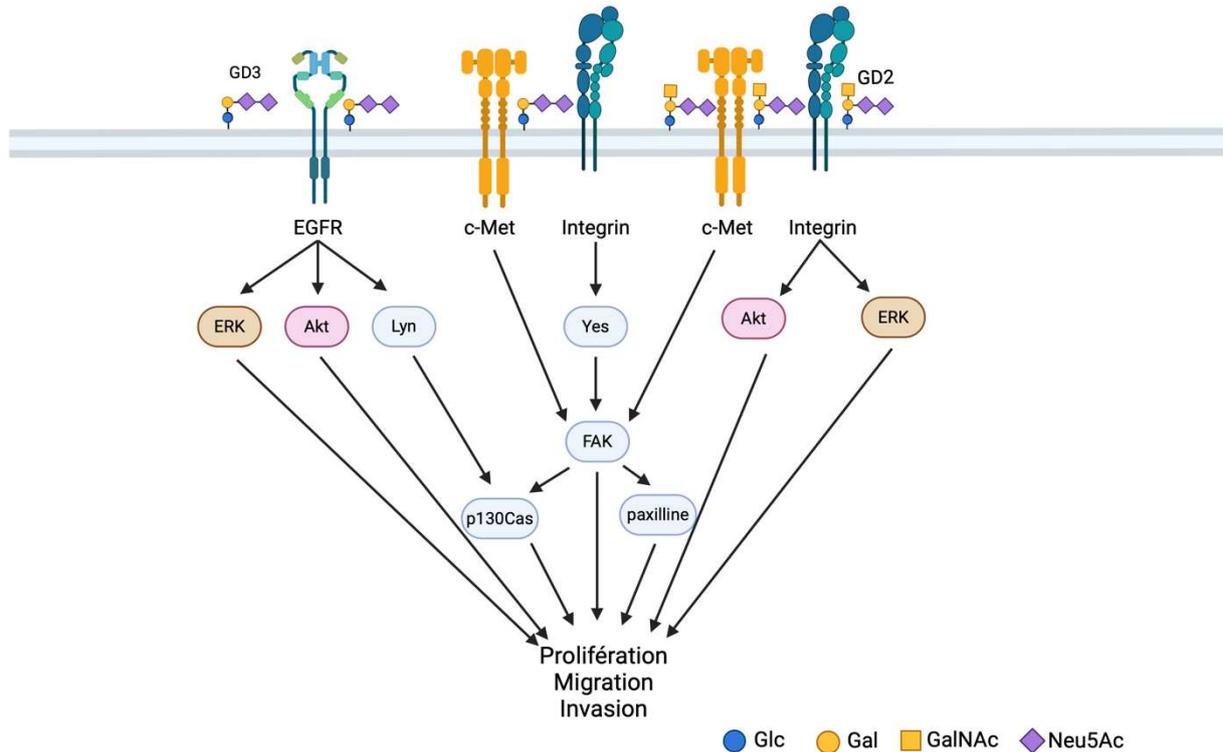


Figure 7 : Implication des gangliosides GD3 et GD2 dans l'activation des MAPKs dans différents cancers d'origine neuro-ectodermique.

Adapté de (Cavdarli *et al.*, 2019b)

Les gangliosides émergent donc comme des marqueurs significatifs de cellules cancéreuses, suscitant un intérêt croissant en tant que cibles thérapeutiques. Dans la section suivante, nous explorerons en détail les stratégies de ciblage du GD2 par immunothérapie. L'OAcGD2, présent dans les tissus cancéreux exprimant également le GD2, se distingue par son absence sur les nerfs périphériques et le cerveau humain, contrairement au GD2 (Alvarez-Rueda *et al.*, 2011). De plus, l'OAcGD2 est détecté dans les cellules souches des cancers du sein, soulignant son importance potentielle comme cible thérapeutique dans différents contextes tumoraux (Cheng *et al.*, 2021). La partie suivante de cette introduction présente donc les bases moléculaires et cellulaires de l'immunothérapie ciblant le GD2 et l'OAcGD2 dans les cancers.

Partie II : Immunothérapie ciblant les gangliosides

Dans la lutte contre le cancer, plusieurs axes thérapeutiques sont utilisés seuls ou en combinaison. La chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie font partie des traitements standard utilisés en clinique. Toutefois, leur efficacité est souvent entravée par les mécanismes de résistance développés par les cellules tumorales, entraînant des rechutes chez les patients. Face à cette problématique, de nombreuses approches novatrices sont explorées, parmi lesquelles l'immunothérapie occupe une place croissante. Fondée sur la stimulation du système immunitaire, l'immunothérapie se décline généralement en deux grandes approches : l'immunothérapie active et l'immunothérapie passive.

L'immunothérapie active vise à mobiliser directement le système immunitaire du patient à travers diverses méthodes, tandis que l'immunothérapie passive consiste à administrer des anticorps monoclonaux ciblant des antigènes spécifiques. Actuellement 114 anticorps ayant différentes cibles ont été approuvés par l'agence européenne du médicament pour le traitement de cancers, maladies immunitaires, maladies infectieuses et maladies hématologiques (Lyu *et al.*, 2022).

Le ganglioside GD2 est retrouvé dans plusieurs types de cancers d'origine neuroectodermique comme le neuroblastome, le rétinoblastome, le mélanome, ainsi que dans le cancer du poumon à petites cellules. On observe également son expression dans des cancers cérébraux comme le gliome, ainsi que dans l'ostéosarcome et le sarcome d'Ewing. Plus récemment, le GD2 a été détecté dans les cellules souches du cancer du sein. Le développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre le GD2 a permis de traiter les patients atteints de neuroblastome de haut grade. La Food and Drug Administration (FDA) a approuvé l'utilisation du dinutuximab (ch14.18) en 2015 (Dhillon, 2015) et du naxitamab (hu3F8) en 2020 (Markham, 2021) aux Etats-Unis . En Europe, le dinutuximab beta (Qarziba) est utilisé pour le traitement de neuroblastome depuis 2017 (Raiser *et al.*, 2024). Cependant, l'utilisation des anticorps anti-GD2 se heurte à des toxicités sévères due à l'expression du GD2 sur les nerfs périphériques des patients. Contrairement au GD2, la forme O-acétylée du GD2 est exclusivement exprimée dans les tissus cancéreux, et ce ganglioside apparait comme une cible alternative moins toxique pour l'immunothérapie anticancéreuse (Alvarez-Rueda *et al.*, 2011). De plus, l'anticorps anti-OAcGD2 c.8b6 est aussi efficace que le dinutuximab pour traiter le

neuroblastome chez la souris sans induire d'allodynie (Terme *et al.*, 2014). Après avoir exposé les principes fondamentaux de l'immunothérapie, cette section se concentrera sur les différents anticorps dirigés contre le GD2 et l'OAcGD2.

1. Les cellules immunitaires

Le système immunitaire est divisé en immunité innée dite naturelle et en immunité adaptative. L'immunité innée est rapide, elle constitue la première ligne de défense. L'immunité adaptative est qualifiée d'immunité acquise, elle se construit en fonction des micro-organismes rencontrés au cours de la vie de l'individu. Ces deux immunités, innée et acquise, coopèrent pour l'élimination des micro-organismes.

Le système immunitaire est composé de plusieurs types cellulaires. Les cellules hématopoïétiques issues de la moelle osseuse se différencient en deux grandes lignées : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde (Figure 8). Chaque cellule de ces lignées, selon son origine, exerce une ou plusieurs fonctions spécifiques dans la réponse immunitaire. La lignée myéloïde comprend plusieurs types de cellules. Les basophiles libèrent des granules principalement pour combattre les parasites. Les neutrophiles sont spécialisés dans la phagocytose et la production de cytokines pour déclencher une réponse inflammatoire. Les éosinophiles, en réponse aux parasites, libèrent des granules contenant des enzymes spécifiques et ont également une capacité phagocytaire. Les macrophages, similaires aux neutrophiles, sont responsables de la phagocytose et de la production de cytokines pour induire une réponse inflammatoire et recruter d'autres cellules immunitaires. Les cellules dendritiques captent les antigènes et les présentent à d'autres cellules immunitaires. Elles sont les principales cellules présentatrices d'antigènes, contribuant à activer la réponse immunitaire adaptative. Les mastocytes libèrent des granules contenant des médiateurs inflammatoires tels que l'histamine. La lignée lymphoïde se divise en trois types cellulaires distincts : (i) les lymphocytes T sont chargés de reconnaître l'antigène et d'initier la réponse immunitaire adaptative ; (ii) les cellules B sont responsables de la production d'anticorps et peuvent également présenter des antigènes aux lymphocytes T ; (iii) les cellules Natural Killer (NK), font partie du système immunitaire inné. Elles jouent un rôle crucial dans la détection et

l'élimination des cellules infectées par des virus ainsi que des cellules tumorales (Charles A Janeway *et al.*, 2001).

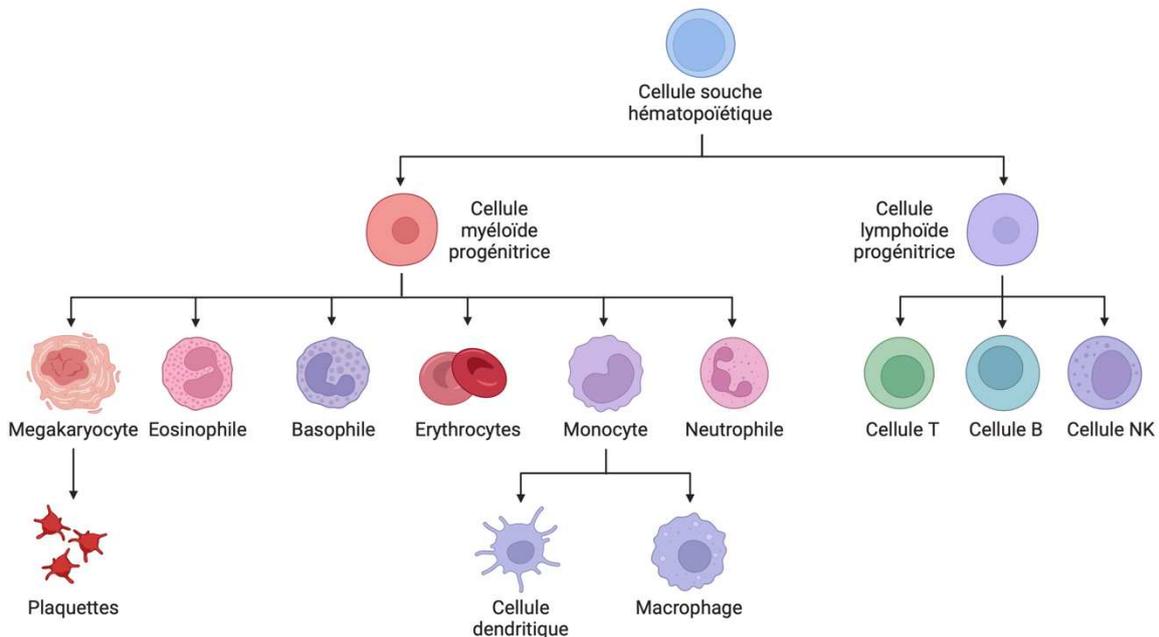


Figure 8 : Représentation des cellules immunitaires dérivant des cellules souches hématopoïétiques.

Les cellules NK représentent 15% des lymphocytes sanguins, leur demi-vie est d'une dizaine de jours. Les cellules NK possèdent des récepteurs leur permettant d'identifier des cellules cibles. Ces cellules NK sont alors capables de lyser les cellules tumorales ou les cellules infectées par un virus.

2. Cytotoxicité des cellules NK

Les cellules NK détectent la présence de signaux de détresse ou d'infection et veillent à ce que les molécules qui devraient normalement être exprimées ne le soient plus. Les récepteurs activateurs des cellules NK reconnaissent des molécules virales à la surface de la cellule ou des molécules de stress induites par une infection ou une transformation cancéreuse. En revanche, les récepteurs inhibiteurs des cellules NK identifient les molécules à la surface de la cellule qui indiquent son état normal, généralement les molécules de classe I du CMH ou apparentées, qui présentent les marqueurs du soi. L'absence de ces marqueurs

sur une cellule entraîne une absence d'engagement des récepteurs inhibiteurs, ce qui libère les cellules NK de toute inhibition et favorise leur activation. Le comportement des cellules NK vis-à-vis de la cible est déterminé par la somme des signaux inhibiteurs et activateurs qu'elles reçoivent.

La liaison aux récepteurs Fc (FcRs) présents sur les cellules leucocytaires représente l'un des mécanismes par lequel les anticorps induisent une réponse immunitaire adaptative pour éliminer les cellules infectées ou malignes. Parmi les FcRs, les FcγRs, qui se lient aux anticorps d'isotype IgG *via* leur région charnière inférieure, sont les mieux caractérisés et les plus importants pour les anticorps thérapeutiques actuels. Chez l'homme, six FcγRs sont identifiés (FcγRII/CD64, FcγRIIa/CD32a, FcγRIIb/CD32b, FcγRIIc/CD32c, FcγRIIIa/CD16a et FcγRIb/CD16b) et diffèrent en termes d'affinité de liaison à l'IgG et de réponse après liaison (Stewart *et al.*, 2014). Alors que la plupart des FcγRs ont une faible affinité pour l'IgG, ne se liant qu'aux complexes immunitaires oligomériques, le FcγRI se lie avec une forte affinité aux concentrations physiologiques d'IgG1, IgG3 et IgG4 monomériques. On pense que le FcγRI est constamment occupé par l'IgG monomérique, libéré lors de la formation de complexes immunitaires plus volumineux. Bien que le FcγRI contienne un domaine extracellulaire supplémentaire de type IgG par rapport aux FcγRs à faible affinité (trois au lieu de deux), ce domaine supplémentaire n'est pas le principal déterminant de son affinité élevée pour l'IgG (Hanson and Barb, 2015). Le FcγRIIb est le seul FcγR immuno-inhibiteur, comportant un motif inhibiteur intracellulaire appelé "immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif" (ITIM), impliqué dans une inhibition des voies de signalisation en aval. Les tyrosines phosphorylées dans les ITIM recrutent des phosphatases contenant des domaines SH-2, comme SHP-1 et SHP-2 qui ont différents substrats impliqués dans l'activation des cellules. Inversement, certains FcγRs contiennent, ou sont associés à, une sous-unité qui contient un motif tyrosine activateur (ITAM) et sont donc des récepteurs activateurs. L'exception est le FcγRIIIb, qui émet un signal par l'intermédiaire d'un domaine glycosyl-phosphatidylinositol.

L'expression de chaque FcγR est spécifique à des sous-populations particulières de cellules immunitaires, ce qui leur permet d'initier des fonctions effectrices cliniquement importantes. Par exemple, le FcγRIIIa (CD16) est abondamment exprimé sur les cellules Natural Killer (NK). Après fixation de l'anticorps au récepteur FcγRIIIa, la cellule NK libère des granules de perforine et granzyme pour induire la mort de la cellule ciblée, c'est le phénomène

de cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC) (Stewart *et al.*, 2014). De même, les cellules myéloïdes telles que les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques expriment les récepteurs FcγRI et FcγRIIa. Ces récepteurs interviennent dans la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP), un autre mécanisme immunitaire utilisé pour éliminer les cellules tumorales ou les cellules infectées. Dans ces contextes, l'activation des cellules effectrices et les mécanismes cytotoxiques qui en découlent dépendent de la mise en cluster des FcγRs à la surface des cellules.

Ces interactions entre les anticorps et les récepteurs FcγRs résultent de la structure moléculaire complexe des immunoglobulines. Cette liaison précise des anticorps aux récepteurs sur les cellules immunitaires initie une série d'événements cruciaux pour leur activité effectrice.

3. Structures et fonctions des anticorps

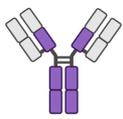
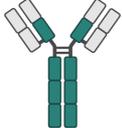
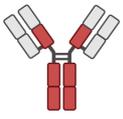
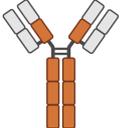
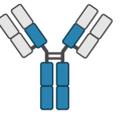
Les anticorps aussi appelés immunoglobulines (Ig), sont des glycoprotéines globulaires synthétisées par les plasmocytes et retrouvés dans le plasma et d'autres liquides biologiques. Les immunoglobulines sont composées de deux chaînes identiques constituées d'environ 450 acides aminés (50 kDa) appelées chaînes lourdes (HC, Heavy chains) et deux chaînes identiques constituées d'environ 220 acides aminés (25 kDa), appelées chaînes légères (LC, Light chains). Les chaînes sont reliées entre elles par des ponts disulfures et des interactions non covalentes (liaisons hydrogène, liaisons ioniques, interactions hydrophobes, interactions de van der Waals). Ainsi, un anticorps monomérique composé de quatre chaînes, présente une masse de 150 kDa.

Chez l'homme, il existe 5 classes d'immunoglobulines ou isotypes qui se distinguent en termes de séquence, de structure et de fonction.

Chaque classe définie par le type de chaîne lourde α , δ , ϵ , γ ou μ , donne respectivement naissance aux immunoglobulines de type IgA, IgD, IgE, IgG et IgM. Les IgA sont subdivisés en IgA1 et IgA2, tandis que les anticorps IgG peuvent être classés en sous-groupes IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Les différences structurelles entre ces cinq classes incluent le nombre de domaines de type Ig (quatre par chaîne α , δ ou γ , contre cinq par chaîne ϵ ou μ), les arrangements oligomériques (dimères pour IgA et pentamères/hexamères pour IgM), ainsi

que divers schémas de liaisons disulfure et de glycosylation au niveau de la charnière (Tableau 3). Bien que chaque classe d'anticorps soit caractérisée par sa chaîne lourde, elles partagent des chaînes légères communes, pouvant être de classe κ ou λ dont la séquence en acide aminé est différente. Environ deux tiers des anticorps endogènes possèdent des chaînes légères κ , de ce fait, la plupart des anticorps cliniques utilisent également des chaînes légères κ (Molé *et al.*, 1994).

Tableau 3 : Caractéristiques et propriétés des isotypes d'anticorps.

Classe	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Sous classe	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4		IgGA1, IgGA2		
Type de chaîne lourde	γ	μ	α	ϵ	δ
Masse moléculaire (kDa)	150 à 165	190 à 970	160 à 435	190	175
Nombre de paratopes	2	2 ou 10	2 ou 4	2	2
ADCC	+++	-	++	++	-
ADCP	+++	+	++	-	-
CDC	++	+++	+	-	-
Schéma					

Chaque chaîne des immunoglobulines, lourde ou légère, comporte deux régions : une région variable (VH) et une région constante (CH). La région variable présente une grande diversité de séquences en acides aminés entre immunoglobulines. Cette région détermine la spécificité de l'anticorps. La région dite constante est principalement composée des domaines CH1, CH2, CH3 pour les IgA, IgD et IgG et elle comporte un domaine additionnel CH4 pour les

IgE et IgM. La région constante comporte une très faible variation de séquence en acide aminés entre immunoglobulines de même classe et sa structure primaire est relativement conservée.

Trois régions d'une dizaine d'acides aminés de variabilité très élevée ont été mises en évidence au sein de chaque domaine variable, ce sont les régions hypervariables (HV). Elles constituent le paratope et sont complémentaires de l'épitope, c'est pourquoi les régions HV sont aussi appelées régions déterminant la complémentarité (CDR). Les quatre segments présentant une faible variabilité sont nommés région armature ou charpente (Framework region, FR).

Les fragments de liaison à l'antigène (Fab) sont composés du domaine CH et de tous les domaines variables (VH, VL). La région charnière (Hinge) est une zone flexible permettant d'adapter l'angle entre les deux bras de Fab de 60° à 180° pour faciliter l'interaction avec l'antigène. Les domaines CH2 et CH3 (voire CH4) forment le fragment cristallisable (Fc). La partie Fc participe à l'ensemble des fonctions effectrices des immunoglobulines : activation du complément, opsonisation, ADCC. Les domaines CH2 des IgG portent des chaînes glycaniques greffées sur un site de *N*-glycosylation. Ces chaînes glycaniques créent un environnement favorable à la fixation des FcγRs et des composants du complément au cours de son activation. (Figure 9) (Goulet and Atkins, 2020).

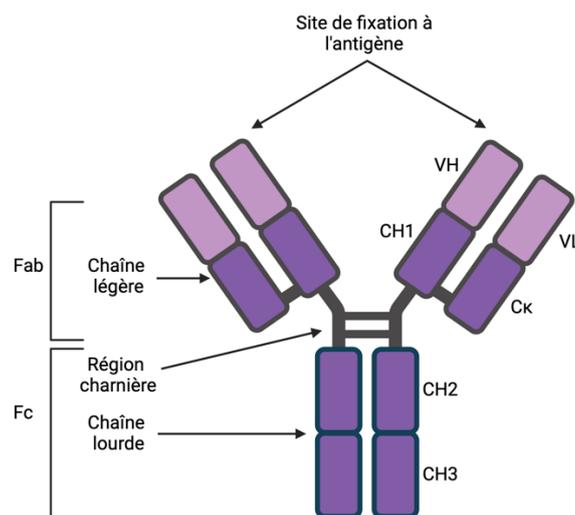


Figure 9 : Les différentes régions d'un immunoglobuline G

Les régions constantes sont représentées en violet foncé. Les régions variables sont représentées en violet clair. Fab = fragment de liaison à l'antigène, Fc = fragment cristallisable responsable des fonctions effectrices.

Les anticorps utilisés en recherche peuvent être monoclonaux ou polyclonaux. Un anticorps monoclonal est capable de reconnaître un seul épitope antigénique alors que l'anticorps polyclonal est capable de reconnaître plusieurs épitopes d'un même antigène. Les traitements par immunothérapie reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux permettant de reconnaître une cible précise dans l'organisme.

La technologie des hybridomes mise au point par Kohler et Milstein (Köhler and Milstein, 1975) a permis d'obtenir des anticorps monoclonaux. Les hybridomes sont produits en fusionnant des plasmocytes, cellules de la rate qui produisent des anticorps, provenant de souris, de rats ou de lapins immunisés, avec des lignées cellulaires immortelles de myélome. Les cellules de myélome sont caractérisées par leur déficience en hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT). Cette particularité est exploitée pour la sélection clonale d'hybridomes produisant des anticorps monoclonaux dans un milieu enrichi en hypoxanthine aminoptérine thymidine (HAT). Ces clones sélectionnés sont capables de proliférer indéfiniment et de sécréter continuellement des anticorps monoclonaux (Köhler and Milstein, 1975). Cependant, le développement de la réponse immunitaire des patients traités avec des anticorps murins induit une clairance rapide de ces anticorps car ils sont captés par des anticorps humain anti-anticorps murin (HAMA) limitant ainsi les fonctions effectrices (Sahagan *et al.*, 1986). Des anticorps chimériques ou humanisés ont donc été développés afin de diminuer l'immunogénicité des IgG et ainsi de limiter la réponse HAMA des patients. Dans les anticorps chimériques, les domaines variables murins sont fusionnés avec la partie constante humaine des immunoglobulines (Morrison *et al.*, 1984). Cette chimérisation a permis de réduire les réponses HAMA et bien que les anticorps chimériques soient moins immunogéniques que les anticorps murins, il peut toutefois persister une immunogénicité résiduelle avec la formation d'anticorps humains dirigés contre les anticorps chimériques (HACA). C'est pourquoi, il a semblé nécessaire de rendre les anticorps encore plus humains. L'humanisation est un processus consistant à intégrer les régions hypervariables murines dans le framework d'un anticorps humain. Le processus d'humanisation est essentiel pour le développement des anticorps thérapeutiques car il permet de réduire l'immunogénicité des molécules injectées aux patients et donc de diminuer leur réponse humorale mais aussi d'augmenter les propriétés pharmacologiques des anticorps (demi-vie augmentée et meilleure fonction effectrice) (Hwang and Foote, 2005) (Figure 10).

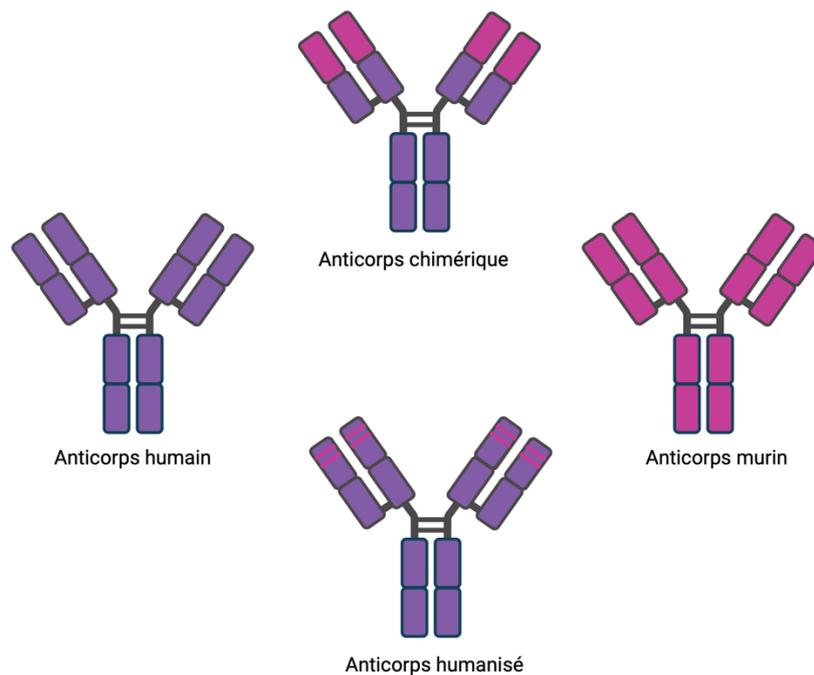


Figure 10 : Structure des anticorps murin, humain, chimérique et humanisé.

L'anticorps murin est représenté en violet, l'anticorps humain est représenté en rose. Les portions de chaque anticorps sont représentées dans les anticorps chimérique et humanisé.

L'IgG est l'isotype le plus utilisé dans le développement de thérapies anticancéreuses. C'est en effet, la sous-classe possédant le plus fort potentiel dans l'immunothérapie tumorale et ce grâce à sa diversité d'activités cytotoxiques. Ces différentes activités seront explorées dans les paragraphes à venir.

4. Mécanismes anti-tumoraux des anticorps thérapeutiques

Lorsqu'un anticorps se lie à un antigène de surface cellulaire, cela peut déclencher la mort cellulaire par apoptose (Figure 11A). Ce mécanisme n'étant pas le principal utilisé par les anticorps, nous ne détaillerons pas davantage cette partie. En revanche, la liaison de l'anticorps à l'antigène peut également provoquer des effets cytotoxiques sur la cellule ciblée par l'intermédiaire d'effecteurs immunitaires *via* le système du complément (activité cytotoxique dépendante du complément, CDC) ou les cellules NK (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps, ADCC) qui seront décrites ci-dessous.

4.1. Activité cytotoxique dépendante du complément (CDC)

L'activité de la cytotoxicité dépendante du complément (CDC) se produit lorsque le fragment cristallisable (Fc) de l'immunoglobuline liée à son antigène membranaire se lie à la protéine C1q du complément, déclenchant ainsi la cascade du complément (Figure 11B). Cela entraîne la formation d'un complexe composé des molécules du complément C5b, C6, C7, C8 et C9. Ce complexe crée des perforations dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique, provoquant des échanges non régulés d'ions et de molécules d'eau qui conduisent à la lyse de la cellule cible (Gelderman *et al.*, 2004). Le complément peut également faciliter le recrutement de cellules effectrices grâce à la molécule iC3b. Cette substance, dérivée du C3b, une molécule essentielle de la cascade du complément, se fixe à la membrane plasmique et est identifiée par le récepteur CR3 (CD11b/CD18) présent sur la plupart des cellules immunitaires notamment les macrophages et les neutrophiles. Ce processus est désigné sous le terme de CDC pour Complement Dependent Cell cytotoxicity (Imai and Takaoka, 2006)

4.2. Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC)

L'ADCC fait intervenir les récepteurs du fragment Fc des immunoglobulines. L'ADCC engageant le récepteur FcγRIIIa, est principalement induite par les cellules NK décrites précédemment. La liaison de l'anticorps ciblant les cellules tumorales ou infectées au récepteur FcγRIIIa présent sur ces cellules NK va libérer des médiateurs cytotoxiques tels que les granzymes, perforines et granulysines. La cellule cible meurt donc par apoptose (Figure 11C). Les cellules cibles recouvertes par les anticorps peuvent être phagocytées par différentes cellules immunitaires notamment les macrophages. Ce phénomène est appelé ADCP (Figure 11D). Les macrophages activés acquièrent des capacités cytotoxiques à l'encontre des cellules tumorales et libèrent des cytokines telles que le TNF ou l'IL-1, favorisant la lyse des cellules cancéreuses. Ils peuvent également sécréter des cytokines qui stimulent l'activation des cellules immunitaires, comme l'IL-12 ou l'IFN-γ. La destruction des cellules tumorales par les anticorps peut déclencher une réponse immunitaire cellulaire dirigée contre les antigènes tumoraux. En effet, les débris cellulaires peuvent être captés par les cellules dendritiques, qui

présentent ensuite ces antigènes tumoraux aux lymphocytes T (Hoffmann *et al.*, 2000). Ces processus contribuent à l'efficacité anti-tumorale des anticorps thérapeutiques.

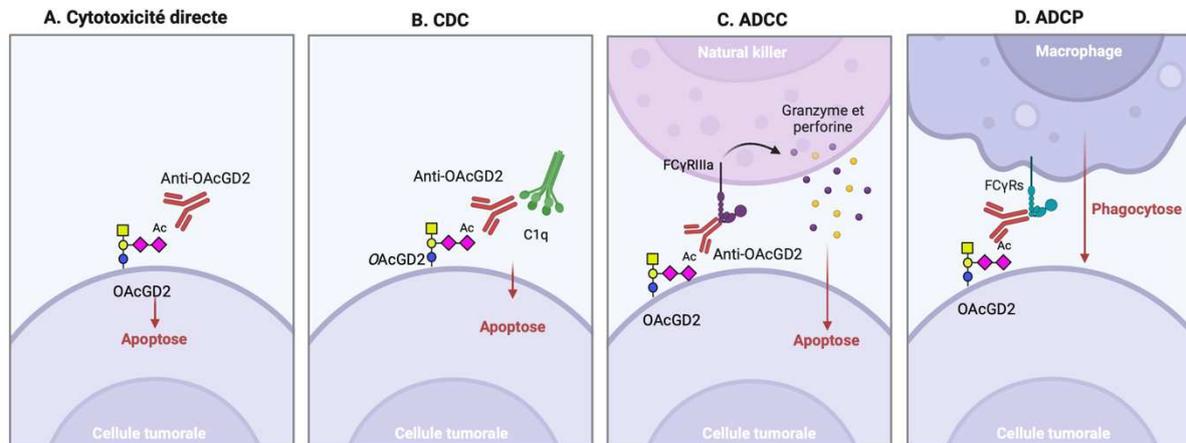


Figure 11 : Les mécanismes de cytotoxicité liés à l'anticorps, exemple de l'anticorps anti-OAcGD2.
 A. Cytotoxicité directe de l'anticorps. B. Cytotoxicité dépendante du complément (CDC). C. Cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). D. Phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP).

5. Ingénierie des anticorps

Les fonctions effectrices des anticorps monoclonaux peuvent être améliorées en utilisant des molécules telles que l'IL-2, le GM-CSF ou l'IFN- α , qui renforce les activités anti-tumorales ADCC et ADCP. Par exemple, l'IL-2 stimule la croissance et l'activation des cellules NK, augmentant ainsi l'ADCC (Carmichael *et al.*, 1987). Ces observations ont conduit au développement d'anticorps monoclonaux ou de fragments d'anticorps monoclonaux fusionnés directement à l'IL-2, appelés immunocytokines (ICK).

Le niveau de glycosylation du domaine CH2 du fragment Fc influence l'activité ADCC des anticorps. Les IgG présentent un site de N-glycosylation dans le domaine CH2. Le motif oligosaccharidique de base greffé sur ce site de N-glycosylation comprend un glycane bi-antenné, composé de N-acétylglucosamine et de mannose. Ce motif peut être modifié par l'ajout d'un nombre variable de résidus de fucose, galactose ou d'acides sialiques. La composition de cet oligosaccharide détermine l'affinité du fragment Fc au récepteur. Par exemple, les IgG hypofucosylées présentent une plus forte affinité pour le récepteur FCyRIIIa

des cellules NK et cette propriété est associée à une activité ADCC améliorée et à une réponse anti-tumorale supérieure (Shields *et al.*, 2002).

6. L'immunothérapie anti-GD2

De par leur faible immunogénicité, le développement d'anticorps ciblant les gangliosides est un vrai défi. Certaines stratégies ont donc été mises en place afin d'exacerber la réaction immunitaire chez la souris et produire des anticorps spécifiques ciblant les gangliosides, notamment le GD2, comme par exemple des injections de cellules de neuroblastomes et de cellules mononucléées du sang périphérique (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), des injections de gangliosides en présence d'adjuvants ou des injections de cellules de neuroblastomes traitées par l'interféron gamma (Cheung *et al.*, 1985). Parmi les 4 sous-types d'anticorps murins (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), les IgG3 sont celles qui reconnaissent préférentiellement les antigènes glucidiques associés aux tumeurs (Charles, 2019). Des anticorps anti-GD2 murins de sous-type IgG3 ont ainsi été développés. Ces anticorps murins ainsi que leur version humanisée seront décrits dans la partie suivante.

6.1. Anticorps murins

6.1.1. L'anticorps 3F8

L'anticorps monoclonal 3F8 est une IgG3 murine obtenue en 1985 par hyper-immunisation de souris BALB/C avec des cellules de neuroblastome (Saito *et al.*, 1985). L'anticorps 3F8 a permis de mettre en évidence l'expression du GD2 dans les neuroblastomes et ostéosarcomes (Cheung *et al.*, 1987b; Heiner *et al.*, 1987). Les mécanismes d'action de cet anticorps sont à la fois une cytotoxicité dépendante du complément (CDC) (Cheung *et al.*, 1985) et une cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), cette dernière pouvant être renforcée par la co-administration de GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating*) (Kushner and Cheung, 1989; Munn and Cheung, 1989). En 1987, l'anticorps 3F8 est le premier anticorps anti-GD2 administré en phase I d'essai clinique à 17 patients atteints de neuroblastome métastatique ou de mélanome métastatique, et a

montré une activité antitumorale (Cheung *et al.*, 1987a). Administré en phase II d'essai clinique à 16 patients atteints de neuroblastome de stade 4, l'anticorps 3F8 permet de prolonger la survie entre 6 et 10 mois pour 19 % des patients (Cheung *et al.*, 1998). Le GM-CSF a été combiné à l'anticorps 3F8 afin d'augmenter son efficacité thérapeutique. Cette stratégie a été utilisée en essai clinique de phase II : parmi les 19 patients ayant un neuroblastome résistant traités, 12 sur 15 ont présenté une rémission complète et 3 ont eu une survie allongée de 1 à 2 ans (Kushner *et al.*, 2001). De plus, une étude a montré que l'association du 3F8 avec le GM-CSF et l'acide rétinoïque 13-cis-RA augmentait la survie des patients en comparaison au traitement avec le 3F8 seul (Cheung *et al.*, 2012a). Des effets secondaires sévères liés à l'administration du 3F8 ont été observés tels que des douleurs neuropathiques, de la fièvre ou encore des réactions anaphylactiques liées à une réponse humorale HAMA (Cheung *et al.*, 2012b). Afin de diminuer ses effets cytotoxiques sans affecter son activité antitumorale, un anticorps 3F8 modifié par la chaleur appelé HM3F8 (Heat modified 3F8) a été évalué en clinique. L'étude clinique NCT00450307 de 2011 montre une diminution de la douleur pour les patients atteints de neuroblastome recevant le HM3F8 juste avant de recevoir le 3F8 en comparaison aux patients recevant le 3F8 seul (Kushner *et al.*, 2011).

6.1.2. L'anticorps 14G2a

L'anticorps monoclonal de souris 14G2a est un anticorps de sous-classe IgG2a dérivé du 14.18 un anticorps de souris anti-GD2 obtenu en 1983 à partir de l'hybridome (Mujoo *et al.*, 1989). Les 2 anticorps d'isotype IgG2a et IgG3 sont capables de supprimer la croissance des cellules humaines de neuroblastome chez les souris athymiques. L'essai clinique de phase I réalisé sur des patients atteints de neuroblastome montre une toxicité importante au niveau neurologique ; le 14G2a est très immunogène et induit une réponse HAMA chez la majorité des patients (Murray *et al.*, 1994). Un essai de phase I incluant 12 patients atteints de mélanome métastatique a montré une activité antitumorale modeste accompagnée d'une toxicité neurologique, démontrant une faible efficacité de l'anticorps 14G2a (Saleh *et al.*, 1992). La combinaison du GM-CSF ou de l'IL-2 à l'anticorps 14G2a n'a pas mis en évidence

d'augmentation de toxicité en comparaison à l'anticorps 14G2a utilisé seul chez des patients atteints de neuroblastome (Frost *et al.*, 1997).

Bien que le 14G2a ait montré des effets antitumoraux encourageants, son utilisation en clinique est limitée du fait du développement d'une importante réponse humorale HAMA qui contribuent à des réactions d'hypersensibilité. Cette problématique a incité à la génération d'un anticorps anti-GD2 chimérique humain-souris, le ch14.18.

6.2. Anticorps chimériques

6.2.1. Dinutuximab (=Unitixin)

Le ch14.18 ou Unitixin est une IgG1 chimérique humain/souris dérivée de l'anticorps monoclonal de souris 14G2a. Cet anticorps chimérique combine les régions variables de l'anticorps murin IgG3 anti-GD2 14.18 et les régions constantes de l'IgG1 humaine. Cet anticorps reconnaît le GD2 et induit une réponse ADCC sur les cellules de mélanome, avec une efficacité cytotoxique de 50 à 100 fois plus importante que celle de l'anticorps 14.G2a en recrutant des granulocytes et des NK (Mueller *et al.*, 1990; Barker *et al.*, 1991). Le dinutuximab a été produit dans des lignées cellulaires murines SP2/O. Il a une demi-vie sanguine plus longue que celle du 14G2a mais est moins immunogène. Ses mécanismes d'action sont la CDC et l'ADCC (Figure 12). Dans l'essai de phase III conduit par le COG (children's oncology group) (NCT00026312 ; ANBL0032), le dinutuximab en association avec l'IL-2 et le GM-CSF au 13-cis acid rétinoïque a prolongé la survie globale des enfants atteints de neuroblastome à haut risque traités par l'isotrétinoïne à 86 ± 4 % contre 75 ± 5 % à 2 ans. Sur la base de ces résultats, le dinutuximab a été approuvé par la FDA et l'EMA en 2015 comme traitement de première intention pour le traitement du NB à haut risque malgré ses effets secondaires graves (et notamment des douleurs neuropathiques intenses) (Dhillon, 2015; Ozkaynak *et al.*, 2018). La combinaison de l'immunothérapie à l'IL-2 et l'isotrétinoïne en comparaison à la chimiothérapie standard provoque des effets secondaires sévères chez les patients tels que (i) douleurs neuropathiques dans 52 % des cas contre 6 % ; (ii) hypokaliémie 35 % contre 2 % ; (iii) réactions d'hypersensibilité dans 25 % des cas contre 1 % ; (iv) hyponatrémie dans 23 % des cas contre 4 % ; (v) élévation du taux d'alanine transférase dans 23 % des cas contre 3 %

et (vi) hypotension dans 18 % des cas contre 0 % (Yu *et al.*, 2010). De plus, environ 18 % des patients traités ont développé une réponse humorale anti-dinutuximab.

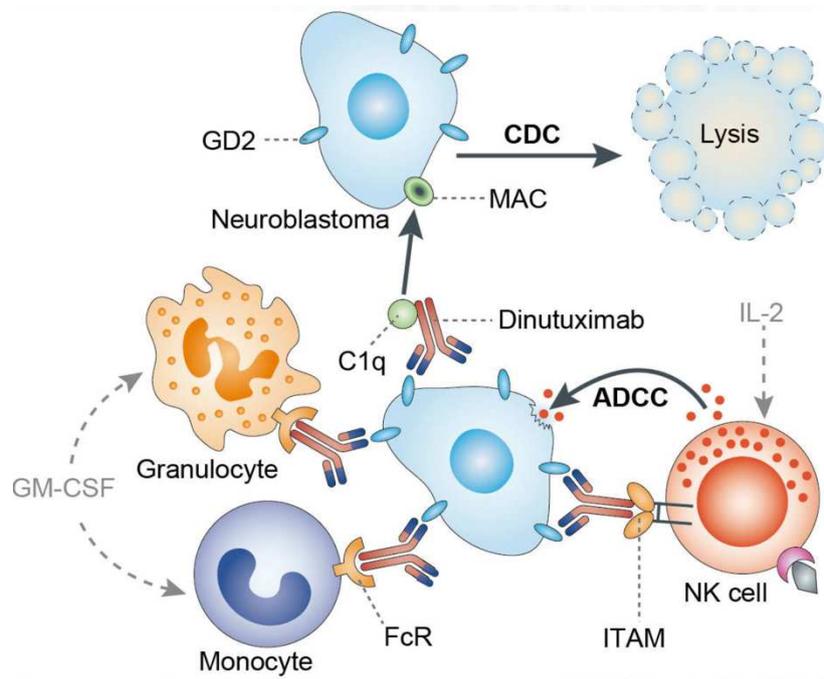


Figure 12 : Mécanismes d'action du dinutuximab dans les cellules de neuroblastome.
(Dinutuximab Overview - Creative Biolabs, n.d.)

6.2.2. Quarziba

Le dinutuximab beta (Quarziba) est un anticorps monoclonal chimérique murin-humain anti-GD2 produit dans des cellules ovariennes de hamster chinois (Chinese Hamster Ovary (CHO)). Actuellement, seul le dinutuximab beta est autorisé en Europe. Le dinutuximab beta a été approuvé par la commission européenne en Mai 2017 pour le traitement de neuroblastomes à haut risque pour les patients de plus de 12 mois préalablement traités par chimiothérapie et qui ont au moins une réponse partielle suivie par une thérapie myéloablatrice et une transplantation de cellules souches (https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/qarziba-epar-product-information_en.pdf). Il a été montré dans un essai clinique de phase III qu'il n'y avait pas d'amélioration significative en combinaison avec l'IL-2, augmentant de 56 % avec le dinutuximab beta seul à 60 % pour la combinaison IL-2 + dinutuximab beta, avec une toxicité plus forte pour la combinaison de drogues que pour le dinutuximab seul (Ladenstein *et al.*,

2018). En revanche, la combinaison du dinutuximab beta avec des chimiothérapies telles que le télomozomide ou l'iritecan, permet une réponse complète chez 32% des patients (Gray *et al.*, 2022; Wieczorek *et al.*, 2023) mais l'administration du dinutuximab beta, seul ou en combinaison, engendre des neurotoxicités importantes (Balaguer *et al.*, 2023).

6.3. Anticorps humanisés

L'humanisation des anticorps anti-GD2 a ensuite été développée afin de réduire l'immunogénicité résiduelle des anticorps chimériques décrits ci-dessus.

6.3.1. Naxitamab

Le naxitamab est un anticorps monoclonal IgG1 anti-GD2 3F8 humanisé (hu3F8). Le naxitamab a été approuvé en 2020 aux Etats-Unis pour le traitement de neuroblastome chez les enfants de plus d'un an et chez les adultes (Markham, 2021; naxitamab Research, 2021). Grâce à une étude *in silico* réalisée sur les acides aminés en interaction du modèle 3F8:GD2, il a été montré qu'une mutation ponctuelle sur la chaîne lourde du naxitamab (G54I) pourrait encore améliorer son activité ADCC d'un facteur 6 à 9 (Ahmed *et al.*, 2013). Les essais cliniques utilisant le naxitamab seul ou en combinaison avec le GM-CSF pour le traitement de neuroblastomes ont montré des effets secondaires similaires à ceux observés chez les patients traités par l'anticorps 3F8, notamment des douleurs neuropathiques et de l'hypertension. L'immunogénicité liée à la production d'anticorps humains anti-anticorps humains (HAHA) est moins fréquente et se retrouve principalement chez les patients ayant déjà reçu un traitement par le 3F8 ou le dinutuximab (Kushner *et al.*, 2018). Actuellement, des essais cliniques de phase II sont en cours pour le traitement d'ostéosarcome par le hu3F8 en combinaison avec le GM-CSF (NCT02502786), et pour le traitement du neuroblastome, avec une immunothérapie combinant le hu3F8, le GM-CSF, l'IL-2 et des cellules NK (NCT05754684).

6.3.2. Anticorps monoclonal hu14.18K322A

L'anticorps humanisé anti-GD2 hu14.18K322A (hu14.18) a été produit dans une lignée cellulaire de myélome du rat YB2/0 afin de diminuer la fucosylation et ainsi améliorer l'ADCC. La mutation K322A apportée à l'anticorps humanisé hu14.18 permettrait de réduire l'activation du complément et donc de réduire la douleur (Sorkin *et al.*, 2010). Une étude clinique pilote l'anticorps hu14.18 utilisé pour le traitement de neuroblastomes en combinaison avec la chimiothérapie est bien toléré par les patients et a des propriétés cliniques intéressantes (Federico *et al.*, 2017). L'essai clinique de phase II NCT01857934 montre que l'ajout de hu14.18K322A à la chimiothérapie d'induction améliore les réponses objectives précoces (Furman *et al.*, 2022). Les volumes tumoraux de la plupart des patients sont réduits de manière significative, le taux de réponse en fin d'induction est amélioré et montre à la fois une survie sans événement à 3 ans de 73.7 % et survie globale de 86 %.

7. Anticorps anti-OAcGD2

Une autre stratégie pour lutter contre les toxicités sévères dues au ciblage du GD2 serait de cibler la version *O*-acétylée du GD2 (OAcGD2). En effet, contrairement au GD2, l'OAcGD2 n'est pas exprimé sur les nerfs périphériques (Alvarez-Rueda *et al.*, 2011). L'anticorps monoclonal murin 8B6 IgG3 anti-OAcGD2 a été obtenu par immunisation de souris A/J avec des cellules de neuroblastome humain par l'équipe de Stéphane Birklé (CRCNA/INSERM U892). La spécificité de cet anticorps 8B6 pour le ganglioside OAcGD2 a été démontrée en utilisant la technique de la chromatographie sur couche mince (Cerato *et al.*, 1997). Cet anticorps spécifique ne présente aucune réaction croisée avec le GD2 ou d'autres gangliosides. La société OGD2 Pharma qui développe ces anticorps anti-OAcGD2 a montré que les anticorps anti-OAcGD2 conservent l'activité anti-tumorale des mAb anti-GD2 dans les modèles animaux tout en évitant leur toxicité (Cochonneau *et al.*, 2013; Terme *et al.*, 2014). En effet, les anticorps anti-OAcGD2 sont aussi efficaces que les anticorps anti-GD2 et montre une efficacité anti-tumorale dans des modèles syngéniques de neuroblastome dans des souris immunocompétentes ou des modèles xénogéniques de neuroblastome dans des souris NOD-SCID immunodéprimées. De plus, il a été montré que la version chimérique de l'anticorps 8B6 mulgG3, le c.8B6, contrairement à l'anti-GD2, ch14.18, n'induit pas de douleur dans un modèle d'allodynie chez le rat (Terme *et al.*, 2014). Le traitement par anticorps 8B6 mulgG3 a

également montré son efficacité dans des modèles de glioblastomes (Fleurence *et al.*, 2016) ou encore des modèles de PDX de cancer du sein avec une régression complète de tumeurs issues de cellules souches cancéreuses dans 50% des cas (Cheng *et al.*, 2021). Cette étude renforce l'idée que l'OAcGD2 est un marqueur de cellules souches cancéreuses.

L'ensemble de ces études permet de montrer que l'OAcGD2 apparaît comme une cible thérapeutique prometteuse pour les cancers d'origine neuroectodermique. Pour l'utilisation en clinique, une modification de l'anticorps est incontournable. Les études de ce manuscrit utilisent la version chimérisée de l'anticorps anti-OAcGD2 8B6, le c.8B6.

8. Autres stratégies de ciblage des gangliosides

8.1. Les immunocytokines

En utilisant l'ingénierie des protéines recombinantes, il a été possible de développer des immunocytokines (ICK). Une variété de cytokines (telles que IL-2, IL-12, IL-15, TNF) a été génétiquement fusionnée à des anticorps entiers, des fragments d'anticorps, ou des domaines constants d'anticorps.

Les immunocytokines renforcent l'activité et la prolifération des cellules immunitaires (cellules T et/ou cellules NK) dans le microenvironnement tumoral (Neri and Sondel, 2016). Les données précliniques ont montré que les effets anti-tumoraux de l'ICK anti-GD2 hu14.18-IL-2 étaient plus importants sur les tumeurs microscopiques plutôt que sur les tumeurs volumineuses (Neal *et al.*, 2004). Lorsque l'ICK hu14.18-IL-2 a été évaluée sur un essai de clinique de phase II chez des enfants atteints neuroblastome en rechute ou réfractaire, aucune réponse n'a été observée sur les patients présentant une maladie volumineuse et 21.7% des patients avec une maladie résiduelle ont présenté une réponse complète (Shusterman *et al.*, 2010). Une étude préclinique a montré que l'ICK hu14.18-IL-15 et IL-21 dépasse les résultats obtenus avec hu14.18-IL2 dans l'induction du mécanisme d'ADCC (Nguyen *et al.*, 2022).

8.2. Les anticorps bi ou tri-spécifiques

Les anticorps monoclonaux dirigés contre GD2 ont ouvert la voie au développement d'anticorps bi- et tri-spécifiques. Ces nouvelles constructions bispécifiques d'anticorps redirigent la cytotoxicité des lymphocytes T vers les cellules positives au GD2 en liant les antigènes tumoraux et les récepteurs des lymphocytes T via l'anti-CD3. Des anticorps bispécifiques, comme huOKT3-hu3F8, ont démontré une capacité efficace à contrôler les tumeurs dans deux modèles de xénogreffes de neuroblastome et mélanome (Cheng *et al.*, 2016; Nakajima *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2021; Zirngibl *et al.*, 2021). Les premiers résultats de l'étude clinique de phase I évaluant le bispécifique OKT3 x hu3F8 sur des patients atteints de maladies récurrentes ou réfractaires de neuroblastome et d'ostéosarcome indiquent un taux de réponse clinique de 33 % (Yankelevich *et al.*, 2019). Des anticorps trispécifiques ont également été développés en reliant un scFv anti-CD3 aux chaînes légères d'une IgG anti-GD2. Ce type d'anticorps ciblant les cellules positives au GD2, engage non seulement les lymphocytes T via leur bras anti-CD3 mais également les cellules immunitaires portant des récepteurs Fc (Xu *et al.*, 2015; Nakajima *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2021; Zirngibl *et al.*, 2021).

8.3. Les cellules CAR-T

Le traitement par cellules T à récepteurs antigéniques chimériques (CAR-T) vise à combattre les cellules cancéreuses en s'appuyant sur le système immunitaire du patient. Les cellules immunitaires du patient sont prélevées, modifiées puis réinjectées. Ces récepteurs chimériques sont constitués de domaines de liaison à l'antigène dérivés des chaînes lourdes et légères des anticorps monoclonaux, reliées par un linker flexible pour former un fragment variable à chaîne unique (scFv). Ces scFv présents dans les CAR ciblent les antigènes cancéreux de la surface extracellulaire, ce qui entraîne une activation des cellules T indépendante du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Zirngibl *et al.*, 2021). Dans les cellules CAR-T, les domaines co-stimulants tels que CD28, CD137, 4-1BB et/ou OX40 sont liés au domaine de signalisation CD3. Un essai clinique NCT03373097 utilisant des cellules CAR-T ciblant le GD2 a été réalisé, principalement pour le traitement de patients atteints de neuroblastome permettant à 33 % de patients d'avoir une réponse complète (Zirngibl *et al.*, 2021). Les cellules CAR-T de troisième génération, utilisant un scFv 14G2a, ont présenté des résultats prometteurs, avec une rémission complète chez certains patients (Figure 13). Un essai de

phase I/II utilisant un scFv basé sur hu3F8 sur un CAR de quatrième génération a montré un taux de survie global à un an de 74 %, avec des réponses partielles chez certains patients (Yang *et al.*, 2017; Yu *et al.*, 2022). Cependant, la comparaison de ces essais a révélé que l'utilisation de constructions de quatrième génération ne se traduit pas nécessairement par des effets supérieurs. Les cellules CAR-T ciblant GD2 ont également été évaluées dans les glioblastomes et les gliomes pédiatriques mutés H3K27M, démontrant des améliorations cliniques chez certains patients (Majzner *et al.*, 2022).

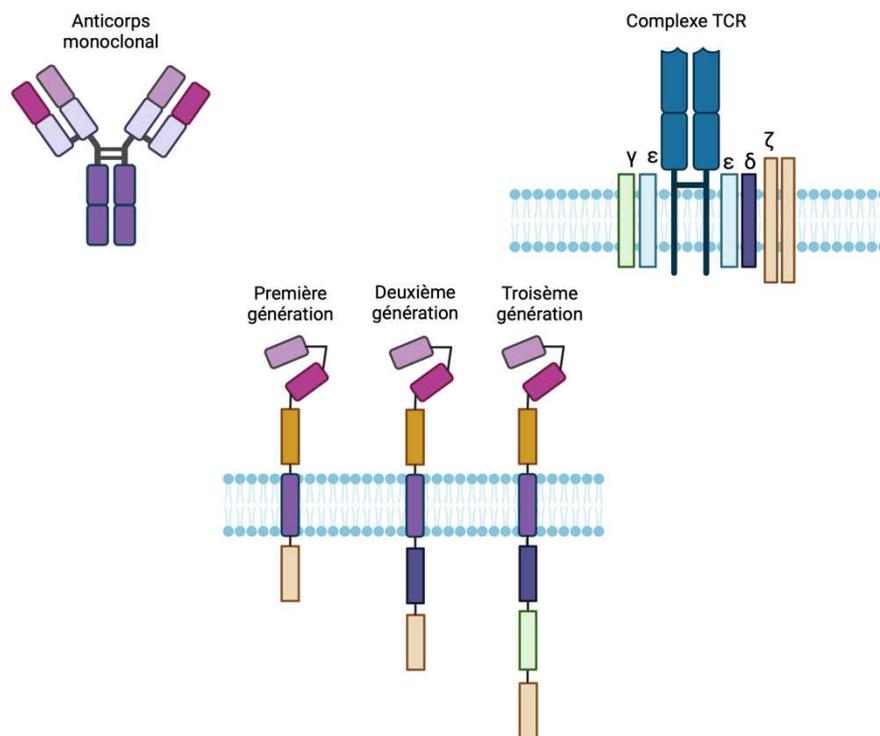


Figure 13 : Structures des récepteurs antigéniques chimériques (CAR).

Le domaine de liaison scFv de l'anticorps est lié au domaine de signalisation pour former un CAR de première génération. L'introduction de molécules co-stimulatrices du complexe TCR génère un récepteur CAR de deuxième génération. Dans la troisième génération, une molécule co-stimulatrice supplémentaire est incluse. Les CAR de quatrième génération (non représentés) présentent un élément inducible par activation pour permettre la sécrétion d'un produit transgénique tel que des cytokines. Adapté de (Dotti *et al.*, 2014).

L'expression de CAR spécifiques du GD2 sur les macrophages et les cellules mésenchymateuses a conduit à la cytotoxicité envers des cellules tumorales GD2+, démontrant ainsi leur potentiel d'utilisation, bien que leur rôle naturellement pro-tumorigène

dans le microenvironnement tumoral reste à étudier (Golinelli *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2023) (Figure 14). Les cellules NK et les cellules T $\gamma\delta$, qui ont un rôle crucial dans l'immunité antitumorale et sont souvent infiltrées dans les tumeurs, ont également été génétiquement modifiées avec des CAR, entraînant la destruction des cellules cancéreuses positives au GD2 (Zuo *et al.*, 2023). Cependant, ces types de cellules ont une durée de vie plus courte et la formation de cellules mémoires reste incertaine par rapport aux cellules T $\alpha\beta$ (Sun *et al.*, 2011). Les cellules NKT, qui sont des cellules lymphoïdes partageant les propriétés des cellules NK et des cellules T, ont montré leur efficacité dans les études précliniques. Un essai de phase I utilisant des cellules CAR GD2 iNKT dérivées de l'anticorps 14G2a a été lancé pour des patients atteints de neuroblastome, montrant un potentiel avec des rémissions complètes et partielles observées (Xu *et al.*, 2019).

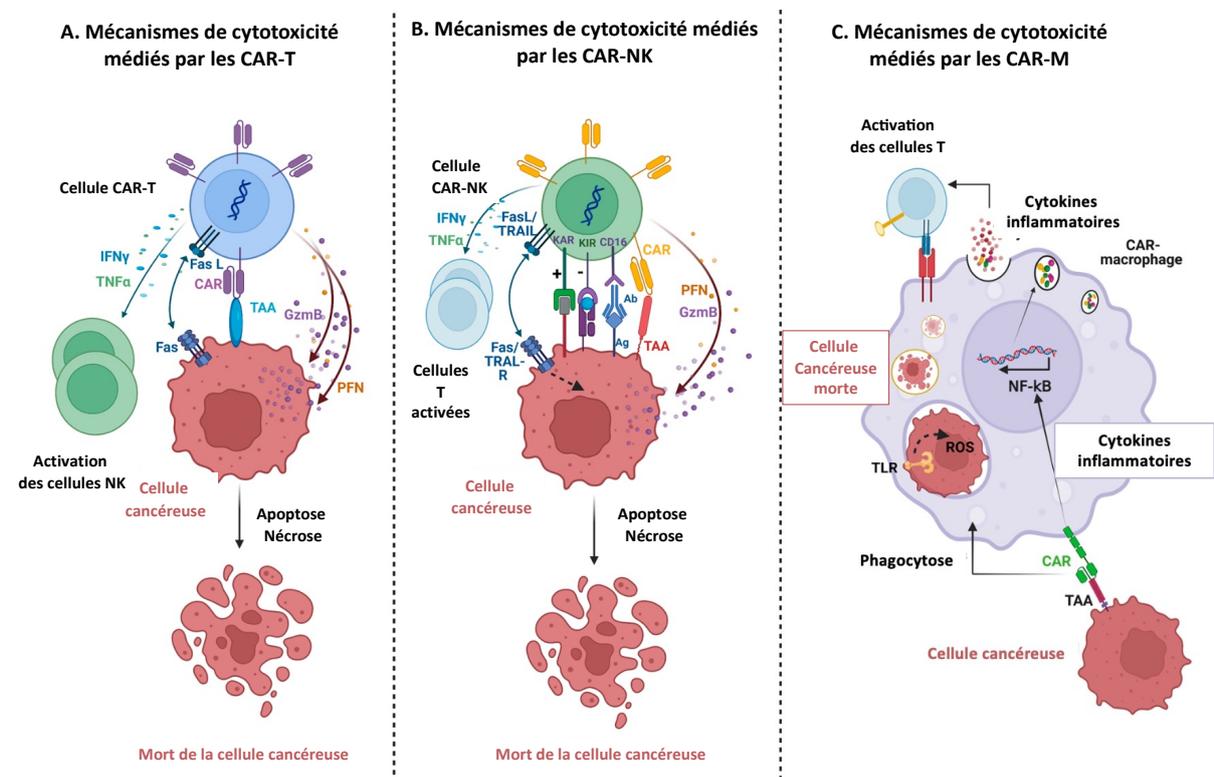


Figure 14 : Mécanismes de cytotoxicité des cellules CAR-T, CAR-NK et CAR-M.

Les cellules CAR activées peuvent reconnaître les antigènes associés aux tumeurs. L'activité cytotoxique est réalisée par les granules de sécrétion contenant de la perforine (PFN) et des granzymes (GzmB) et par l'activation des voies de signalisation menant à la mort de la cellule par apoptose ou nécrose. A. Mécanismes de cytotoxicité médiés par les CAR-T. B. L'activité des cellules CAR-NK est également régulée par les signaux des récepteurs activateurs et inhibiteurs. C. Les CAR-M permettent la phagocytose et l'activation des lymphocytes T par les cytokines pro-inflammatoires (Maalej *et al.*, 2023).

8.4. Les vaccins

La faible capacité des gangliosides à induire une réponse immunitaire rend difficile la production d'anticorps dirigés contre eux. Pour accroître leur immunogénicité, les gangliosides sont conjugués à des protéines, ce qui facilite une réponse immunitaire humorale. Différents vaccins conjugués à des adjuvants ont été utilisés pour stimuler cette réponse immunitaire. Par exemple, l'administration de conjugués BCG/GM2 a permis de générer des anticorps spécifiques du GM2 chez des patients atteints de mélanome au stade 3, ce qui a significativement prolongé l'absence de maladie et la survie (Helling and Livingston, 1994). En ce qui concerne le GD2, il a été conjugué à des protéines KLH (Keyhole limpet hemocyanin) et combiné avec des adjuvants. Malgré les premiers essais infructueux utilisant GD2-KLH et l'adjuvant monophosphoryl-lipide A (MPLA) chez des patients atteints de gliome, les lactones de GD2 (GD2L) conjuguées à KLH avec l'adjuvant QS-21 ont réussi à induire la production d'anticorps anti-GD2 chez plus de 80 % des patients atteints de mélanome, avec des réponses durant plus de 6 mois (Machy *et al.*, 2023). Les essais de vaccins impliquant des mélanges de conjugués de gangliosides tels que GD2L et GD3L-KLH avec OPT-821 et β -glucane ont donné des résultats prometteurs dans le neuroblastome, entraînant des titres anti-GD2 élevés et plus de 90 % de taux de survie à long terme (Kushner *et al.*, 2011; Cheung *et al.*, 2021). De même, un vaccin bivalent ciblant GM2 et GD2-KLH a induit à la fois des réponses anti-GM2 et anti-GD2 chez près de la moitié des patients atteints de mélanome (Chapman *et al.*, 2000). Cependant, un vaccin trivalent combinant GM2, GD3L et GD2L-KLH avec OPT-821 n'a montré aucun avantage en termes de survie globale ou de survie sans progression par rapport à l'adjuvant seul dans une étude de phase II sur des patients atteints de sarcome récidivant (Rosenbaum *et al.*, 2022).

L'expression du GD2 et d'OAcGD2 a été confirmée dans les cas de cancer du sein triple négatif. L'équipe "régulation de la glycosylation terminale" de l'UGSF utilise des lignées de cancer du sein triple négatif comme modèles pour étudier la biosynthèse des gangliosides complexes et leurs rôles dans le développement tumoral. Bien que le cancer du sein triple négatif ne représente que 15 % des cas de cancer du sein, il demeure le plus agressif. La section suivante approfondira l'épidémiologie de cette forme de cancer du sein.

Partie III : Cancer du sein

Le cancer du sein est la première cause de mortalité chez les femmes dans le monde. Selon les chiffres de l'institut national du cancer, 61214 cas de cancer du sein ont été déclarés en 2023 en France, avec près de 80 % des cancers qui surviennent après 50 ans (www.e-cancer.fr). Le principal challenge sont les métastases qui sont résistantes aux traitements conventionnels. Les métastases liées au cancer du sein abaissent les chances de survie des femmes à 27 % sur 5 ans. Les sous-types de cancer du sein présentent des caractéristiques biologiques distinctes, ce qui entraîne des variations dans les réponses aux traitements et dans le risque de récurrence.

1. Origine neuroectodermique

Au cours du développement embryonnaire, lors de la gastrulation, trois feuillets se mettent en place donnant naissance à l'endoderme (feuille interne), l'ectoderme (feuille externe) et entre les deux se met en place le mésoderme. Chaque feuillet va être à l'origine de différents tissus. L'ectoderme se divise en ectoderme externe et neuroectoderme (Figure 15). Le neuroectoderme formera le tube neural et les crêtes neurales. Le tube neural génère le système nerveux central et la moelle épinière. A partir de la crête neurale, le système nerveux périphérique, les os et le cartilage se mettent en place. Les cellules de la crête peuvent se différencier en cellules nerveuses et gliales des ganglions sensoriels et autonomes, en cellules des glandes surrénales, en cellules de l'épiderme, en cellules neuroendocrines du tractus gastro-intestinal, en cellules pulmonaires, en odontoblastes et tissus conjonctif (Etchevers *et al.*, 2019). Le tube neural génère les neurones, les cellules gliales et les oligodendrocytes. L'ectoderme externe produit l'épiderme, le système tégumentaire et les glandes mammaires. Les tumeurs d'origine neuroectodermique englobent les cancers de tous les organes dérivant de l'ectoderme. Les principales sont le neuroblastome, le glioblastome, le mélanome, l'ostéosarcome, le cancer du poumon à petites cellules et le cancer du sein.

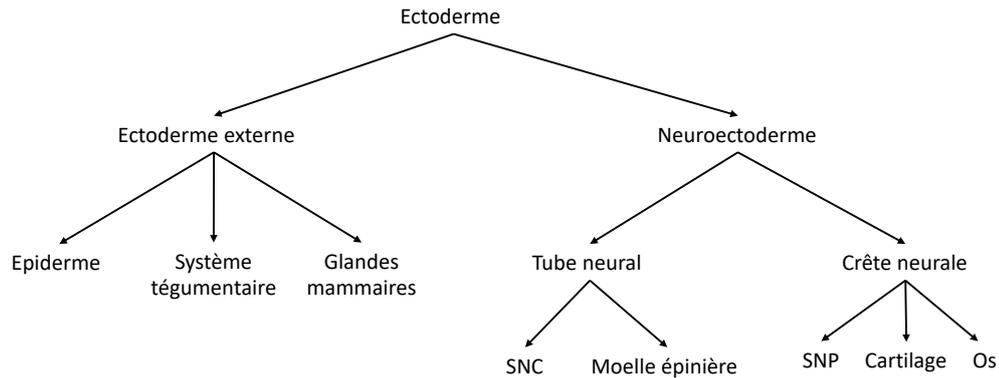


Figure 15 : Diagramme représentant l'évolution des feuillets embryonnaires.

SNC : système nerveux central, SNP : système nerveux périphérique.

2. La glande mammaire

Le sein est une glande exocrine qui se développe sous l'influence des hormones sexuelles fabriquées par les ovaires : les œstrogènes et la progestérone. Les œstrogènes permettent le développement du sein au moment de la puberté et lors de la grossesse. La progestérone joue un rôle dans la différenciation des cellules du sein et sur le cycle menstruel. Dans la glande mammaire on retrouve deux compartiments séparés par une membrane basale composée de collagène et de laminine :

- Le compartiment mésenchymateux, composé de cellules du stroma comme les vaisseaux sanguins et les nerfs.
- Le compartiment épithélial contenant les canaux galactophores et des lobules renfermant les alvéoles. L'épithélium mammaire est constitué de cellules différenciées : les cellules luminales et les cellules myoépithéliales (ou basales). Les cellules luminales bordent la lumière des canaux et des lobules. Les cellules myoépithéliales entourent les cellules luminales et sont au contact de la lame basale et du stroma (Gusterson and Stein, 2012).

3. Les différents sous-types de cancers du sein

Différents critères sont utilisés permettant la classification histologique ou moléculaire des différents sous-types de cancer du sein. La classification histologique, utilisée par

l'organisation mondiale de la santé, se base sur des informations anatomiques. Cette classification nommée TNM a été développée en 1959. Elle prend en compte le volume tumoral (T), l'envahissement ganglionnaire (N) et la présence de métastases (M), ces indices permettent de déterminer le grade de la tumeur entre 0 et IV (Amin *et al.*, 2017). Le stade 0 correspond à une tumeur *in situ* de petite taille alors que le stade IV correspond à une tumeur invasive avec un volume important associé à un envahissement ganglionnaire et la présence de métastases (Figure 16).

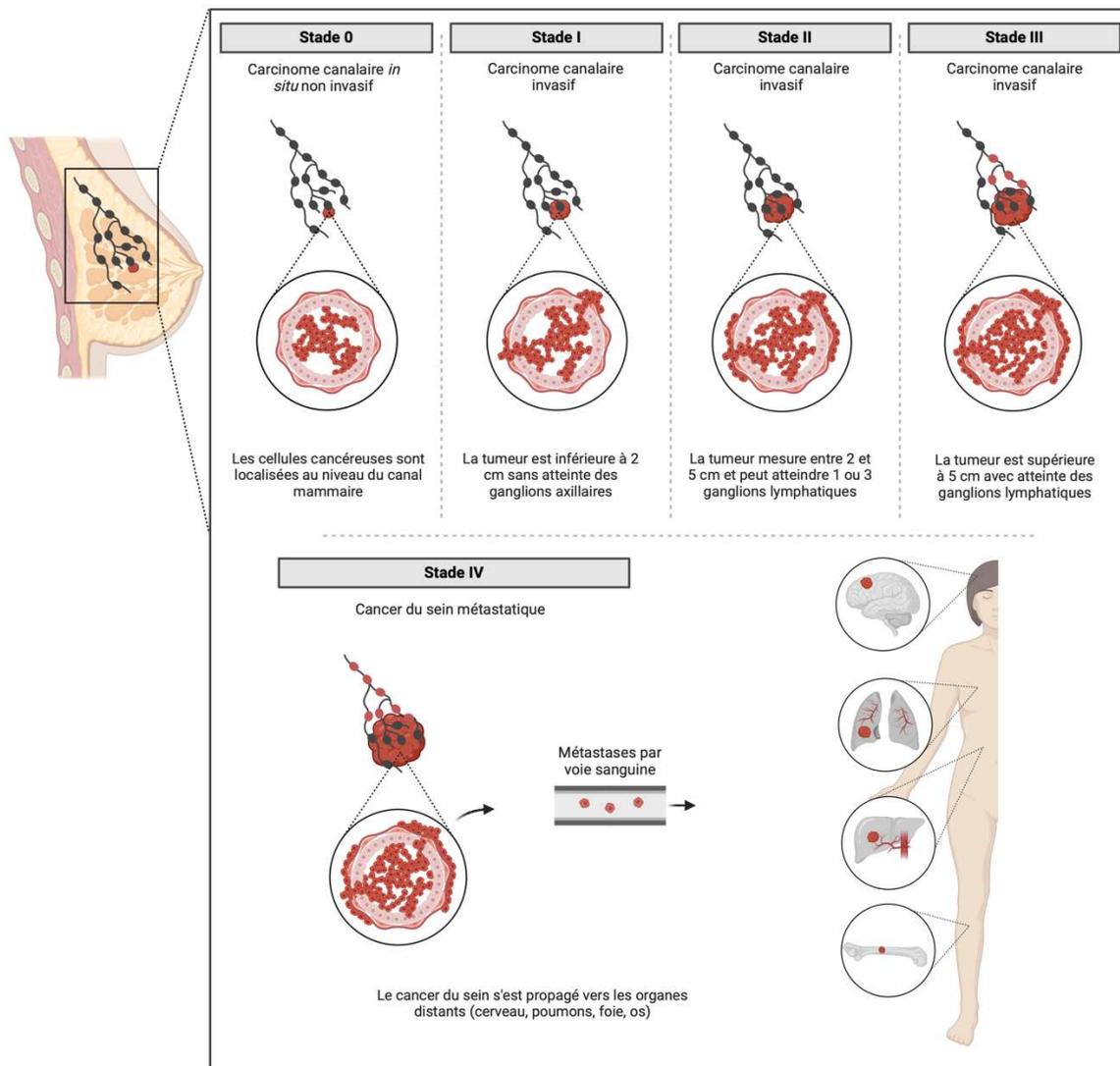


Figure 16 : Stades du cancer du sein en utilisant le système TNM.

Adapté de (Elamrani *et al.*, 2013).

La classification TNM est insuffisante pour définir les stratégies thérapeutiques. La biopsie mammaire permet de compléter le diagnostic anatomique. Cette classification se base

sur l'expression de récepteurs hormonaux (récepteur aux œstrogènes (ER) et récepteurs à la progestérone (PR)) ainsi que l'expression de la protéine HER2 (human epidermal growth factor receptor 2, récepteur de l'EGF) par marquage histologique. Il existe 5 sous-types majeurs de cancer du sein sur la base sur l'expression du récepteur à œstrogène, du récepteur à la progestérone, du récepteur HER2 et du marqueur de prolifération Ki67. Ces sous-types incluent les cancers du sein de type luminal A (ER+/PR+/HER2-, Ki67+ < 20 %), luminal B (ER+/PR+/HER2-, Ki67+ ≥ 20 %), luminal B avec surexpression HER2 (triple-positifs/TPBC) (ER+/PR+/HER2+), triple-négatifs (TNBC/Basal-like : ER-/PR-/HER2-), et HER2+ (ER-/PR-/HER2+) (Yersal and Barutca, 2014) (Figure 17). Environ 70 % des cancers du sein sont de type luminal avec un moins bon pronostic pour les cancers de type luminal B (Voduc *et al.*, 2010). Les cancers du sein triple négatifs sont les cancers du sein les plus agressifs et correspondent à 15 % des cas. Les TNBC touchent principalement les femmes jeunes, avant 40 ans. Certaines mutations génétiques favorisent le développement de ce type de cancer comme celles du gène *BRCA1* (Breast cancer 1) tandis que les mutations de *BRCA2* sont associées à des tumeurs de type luminal B. D'autres mutations sur les gènes *TP53* (Tumor protein 53), *CDH1* (cadherin 1), *PTEN* (phosphatase and tensin homolog) et *STK11* (serine/threonine kinase 11) favorisent le développement des TNBC (Almansour, 2022).

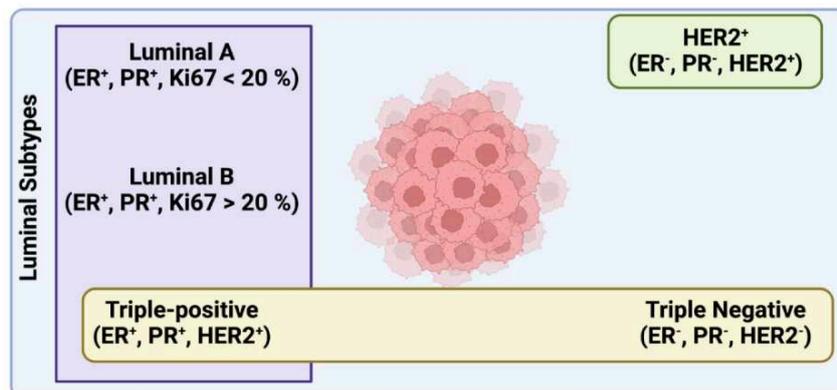


Figure 17 : Les différents sous-types de cancer de sein

Luminal A, luminal B, luminal B avec une surexpression de HER2 appelé cancer du sein triple positif, triple négatifs et les HER2+ (Rajput *et al.*, 2022)

4. Traitements

Depuis quelques années, des avancées ont été réalisées dans le développement de thérapies ciblées pour le TNBC. En effet, il existe six sous-types moléculaires du TNBC : deux sous-types basal-like (BL1 and BL2), un sous-type immunomodulateur (IM), un sous-type luminal androgène récepteur (LAR), un sous-type mésenchymateux (M), un de type souche mésenchymateux (MSL). Le sous-type de TNBC va déterminer le choix de l'option thérapeutique adaptée. Les différents sous-types ainsi que les options thérapeutiques sont illustrés en figure 18. Ces approches, telles que l'inhibition de la poly-(ADP-ribose) polymérase (PARP) et du ligand de mort cellulaire programmée 1 (PDL-1), ainsi que le ciblage des récepteurs comme l'EGFR et les récepteurs aux androgènes, démontrent une efficacité limitée et ne bénéficient qu'à un nombre restreint de patientes (Fitzpatrick and Tutt, 2019). Actuellement, en l'absence de thérapies ciblées plus efficaces, la chimiothérapie demeure le pilier du traitement du TNBC. Cette approche thérapeutique consiste en l'administration de différentes molécules agissant sur diverses fonctions cellulaires telles que la mitose, les dommages à l'ADN et la production de métabolites.

Les deux classes d'agents chimiothérapeutiques les plus couramment utilisées sont les taxanes et les anthracyclines. Les taxanes agissent en interrompant la mitose des cellules, les empêchant ainsi de se diviser. D'autre part, les anthracyclines exercent une action cytotoxique en ciblant l'ADN, par inhibition de la topoisomérase II, génération de radicaux libres et s'intercale dans l'ADN (Yin *et al.*, 2020). Leur association avec les taxanes permet généralement une amélioration significative de la survie globale chez les patientes atteintes de cancer du sein, toutes histologies confondues. Plus récemment, les sels de platine tels que le cisplatine et le carboplatine ont été intégrés à la thérapie. Ces agents induisent des dommages à l'ADN et présentent une efficacité importante, notamment chez les patientes porteuses de mutations *BRCA1*. Dans le cas du TNBC métastatique, les traitements combinant anthracyclines et taxanes prolongent le temps de survie des patientes (Diana *et al.*, 2020).

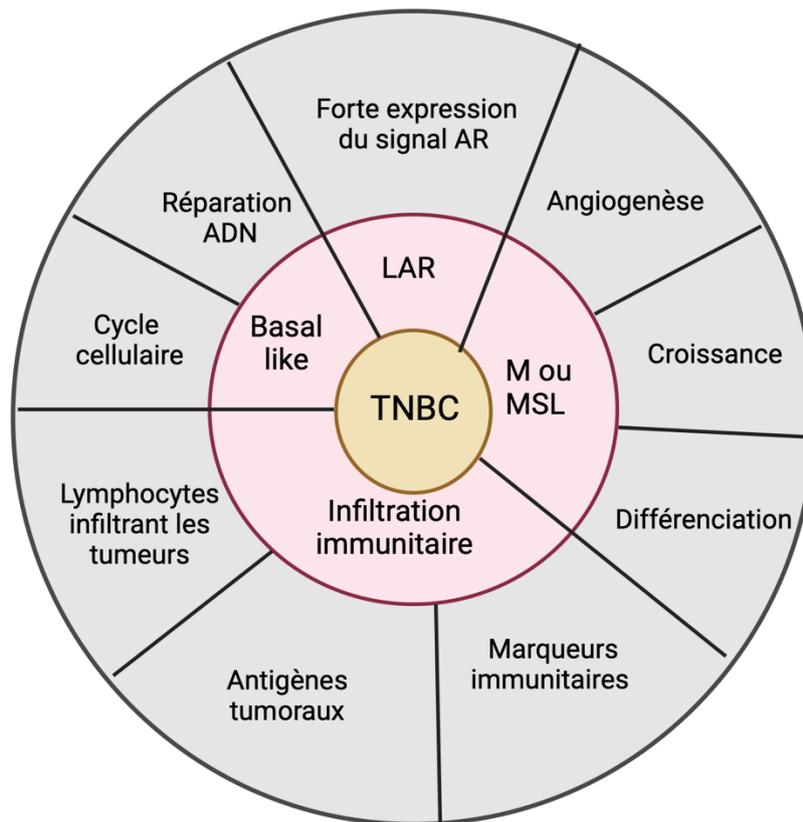


Figure 18 : Classification et options thérapeutiques pour les différents sous types de cancer du sein triple négatif.

AR : androgen receptor ; LAR : luminal androgen receptor ; M : mesenchymal ; MSL : mesenchymal-stem-like ; et TNBC : triple-negative breast cancer (Li *et al.*, 2022).

Cependant, malgré ces avancées, le TNBC reste associé à un risque accru de rechute locale ou à distance par rapport à d'autres sous-types de cancer du sein. Il est donc impératif de rechercher des solutions thérapeutiques plus efficaces.

Contexte

Les activités de la société OGD2 Pharma, sont centrées sur le développement de thérapies innovantes contre le cancer et notamment sur le développement d'anticorps thérapeutiques ciblant une forme *O*-acétylée du GD2. Compte-tenu de l'intérêt thérapeutique manifeste des anticorps ciblant l'antigène OAcGD2, la société OGD2 Pharma et l'équipe *Régulation de la Glycosylation Terminale* de l'UGSF ont décidé depuis 2017 d'associer leurs compétences spécifiques afin de déterminer les mécanismes de biosynthèse de l'antigène OAcGD2 et son rôle dans la progression des cancers. Dans le cadre d'une première collaboration entre la société OGD2 Pharma et l'équipe "Régulation de la Glycosylation Terminale", les travaux de la thèse conduite par Sumeyye Cavdarli (entre 2017 et 2020) ont montré pour la première fois que l'OAcGD2 est un marqueur de cellules cancéreuses mammaires, et l'implication de CASD1 dans la biosynthèse d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein triple négatif SUM159PT (Cavdarli *et al.*, 2021). Une autre étude a montré que l'OAcGD2 est un nouveau marqueur pour les cellules souches cancéreuses (CSC) dans divers sous-types de cancer du sein, et qu'un anticorps monoclonal anti-OAcGD2 mAb8B6 présente une excellente cytotoxicité envers les cellules OAcGD2+ et réduit la croissance tumorale en modèle murin (Cheng *et al.*, 2021). Les CSC sont à l'origine de la progression de la tumeur et de la récurrence de la maladie, plus résistantes à la chimiothérapie et à la radiothérapie conventionnelles, et leur éradication est donc essentielle. Ces résultats ont confirmé que l'OAcGD2 est une cible thérapeutique d'intérêt dans différents sous-types de cancer du sein.

Cependant, les rôles biologiques d'OAcGD2 restent mal connus, ainsi que les mécanismes responsables de sa surexpression dans les tumeurs d'origine neuro-ectodermique. Au regard de la difficulté et de l'incapacité technique à obtenir des clones de cellules cancéreuses mammaires stablement invalidées ou surexprimant CASD1 et l'OAcGD2 et afin d'étudier les mécanismes de régulation de la biosynthèse d'OAcGD2, la méthode de criblage à haut débit par siARN du kinome et du phosphatome cellulaire a été utilisée par Sumeyye Cavdarli à la fin de sa thèse. Ces travaux ont été effectués en 2019 dans le laboratoire du Dr F. Bard (AStar, Singapour). Ce criblage à haut débit a été réalisé dans les cellules de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231 stablement transfectées avec la GD3 synthétase : MDA-MB-231 GD3S+. La GD3 synthétase ou ST8SIA1 est l'enzyme clé pour la synthèse des gangliosides complexes permettant le passage des gangliosides simples (série a) vers les gangliosides complexes (séries b et c). Les cellules MDA-MB-231 GD3S+ présentent donc une

expression élevée de GD2 et d'OAcGD2 (Cavdarli *et al.*, 2020). En utilisant le criblage par siARN à haut débit, 43 gènes régulant la biosynthèse d'OAcGD2 ont été identifiés : 25 activateurs et 18 répresseurs (le flux de criblage est présenté en figure 19, et les différents gènes activateurs ou inhibiteurs de la biosynthèse d'OAcGD2 sont présentés en figures 20 et 21).

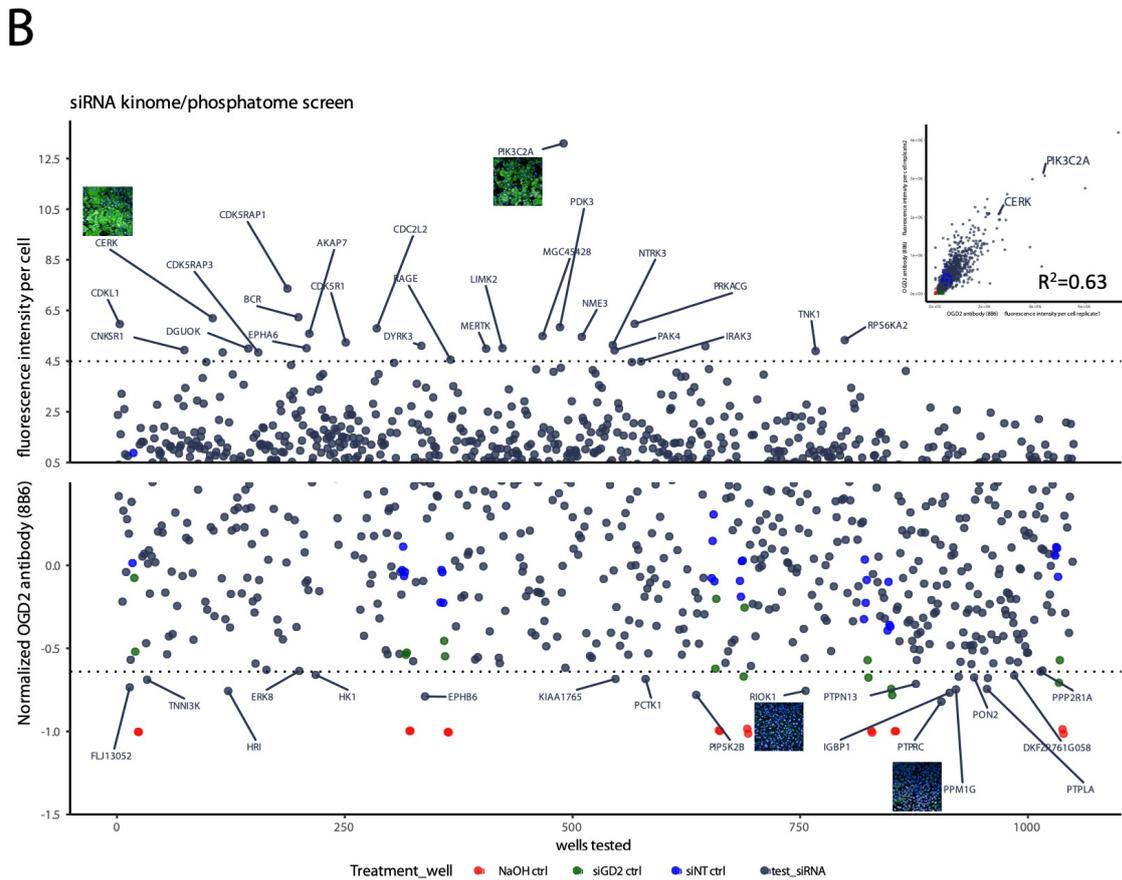
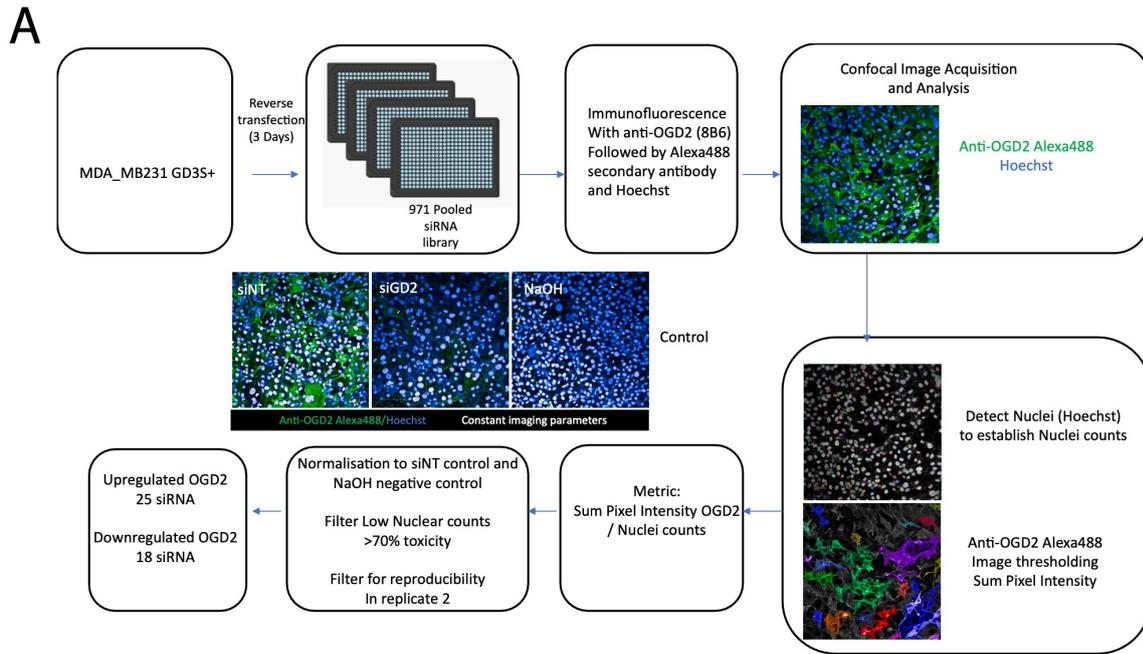


Figure 19 : Le criblage par siARN révèle des régulateurs positifs et négatifs de l'expression d'OAcGD2.
 (A) Schéma du flux de travail du criblage. Les cellules MDA-MB-231 GD3S+ ont été transfectées avec une librairie de siARN ciblant des kinases, des phosphatases et des récepteurs. L'expression d'OAcGD2 a été visualisée par microscopie confocale et quantifiée pour la coloration du signal OAcGD2 (Alexa488/vert), les noyaux sont visualisés par le DAPI. Les puits témoins utilisés sont un « non-targeting » siARN (siNT), un siARN ciblant la GS2S (siGD2S) et les puits traités au NaOH qui clive le

groupement OAc d'OAcGD2. Une normalisation pour chaque plaque entre les valeurs positives de siNT et les valeurs négatives du contrôle NaOH est effectuée pour transformer l'échelle des valeurs échantillonnées de -1 pour le niveau de NaOH à 0 pour le niveau de siNT. Nous avons éliminé les puits présentant une diminution de 70 % du nombre de noyaux par rapport à la population échantillonnée. Les puits d'échantillonnage dont la valeur normalisée était supérieure à la valeur seuil élevée ou inférieure à la valeur seuil basse et reproduite dans deux réplicats biologiques ont été considérés comme des résultats primaires. (B) Résultats primaires identifiés à partir du criblage OAcGD2 avec les plaques 1 à 4 orientées de gauche à droite. Le seuil bas (-0,64) et le seuil haut (4,49) sont indiqués par une ligne pointillée. Les puits de contrôle siNT (bleu), siGD2 (vert) et NaOH (rouge) pour les plaques 1 à 4 sont présentés. Des images représentatives sont montrées pour les siRNA ciblant *RIOK1* (RIO Kinase 1, impliquée dans diverses pathologies, y compris le cancer), et *PPM1G* (Protein Phosphatase, Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1G), qui inhibent l'expression d'OAcGD2, et ciblant *CERK* (codant la céramide kinase) et *PIK3C2A* (Phosphatidyl Inositol Kinase 3C2A), deux activateurs de l'expression d'OAcGD2. L'encart montre les valeurs brutes pour les deux réplicats biologiques de l'écran avec le coefficient de corrélation de Pearson.

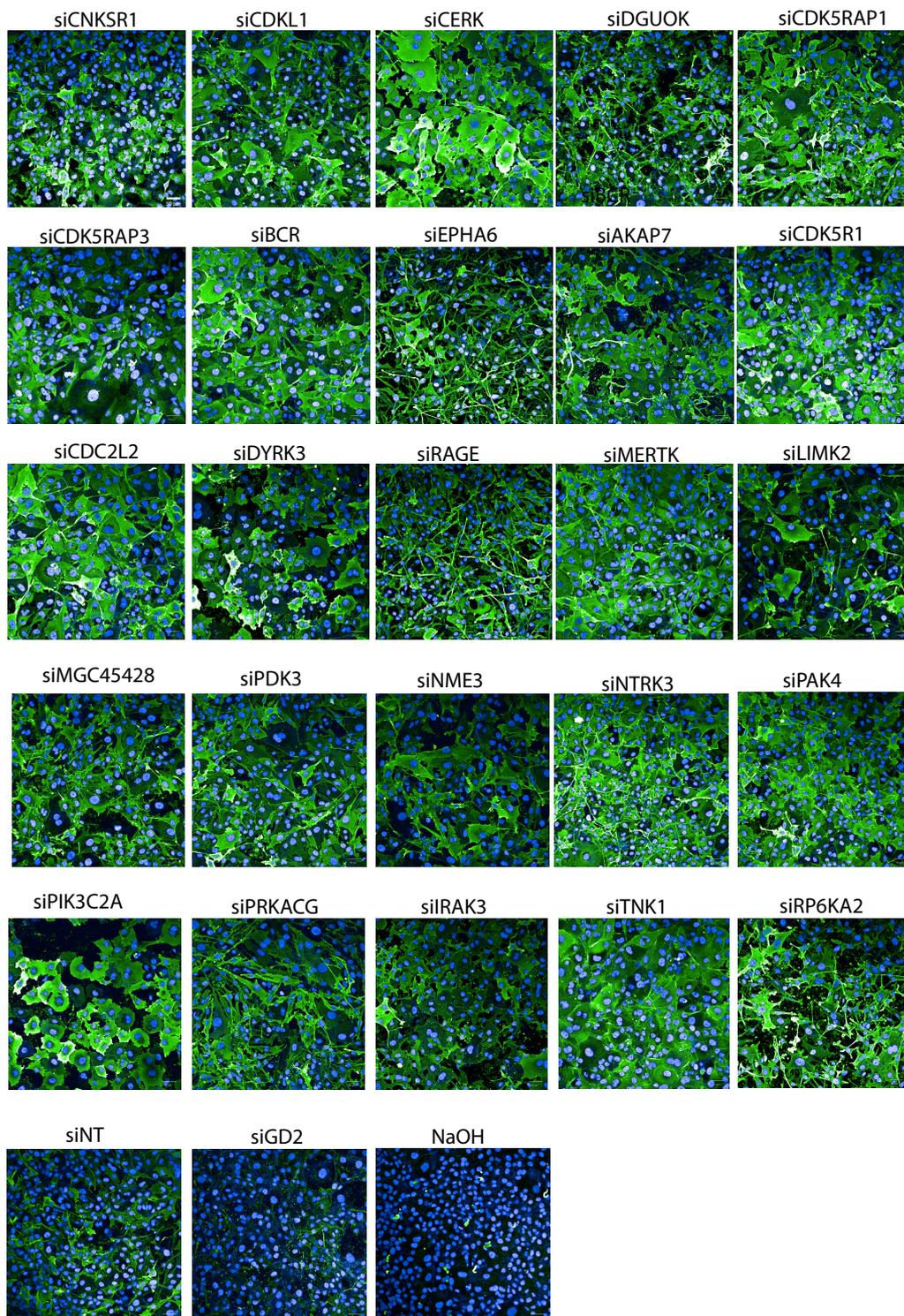


Figure 20 : Gènes identifiés dans le criblage haut débit comme augmentant l'expression d'OAcGD2. Les cellules MDA-MB-231 GD3S+ sont transfectées par différents siARN ciblant des kinases et phosphatases, et l'expression du OAcGD2 est étudiée par microscopie confocale. Les contrôles utilisés sont un siNT (non targeting), un siGD2S qui diminue l'expression du GD2 donc du OAcGD2, et le traitement par NaOH qui clive les groupements O-acétyl. Les noyaux sont représentés en bleu, l'OAcGD2 en vert. L'échelle indique 50 µm.

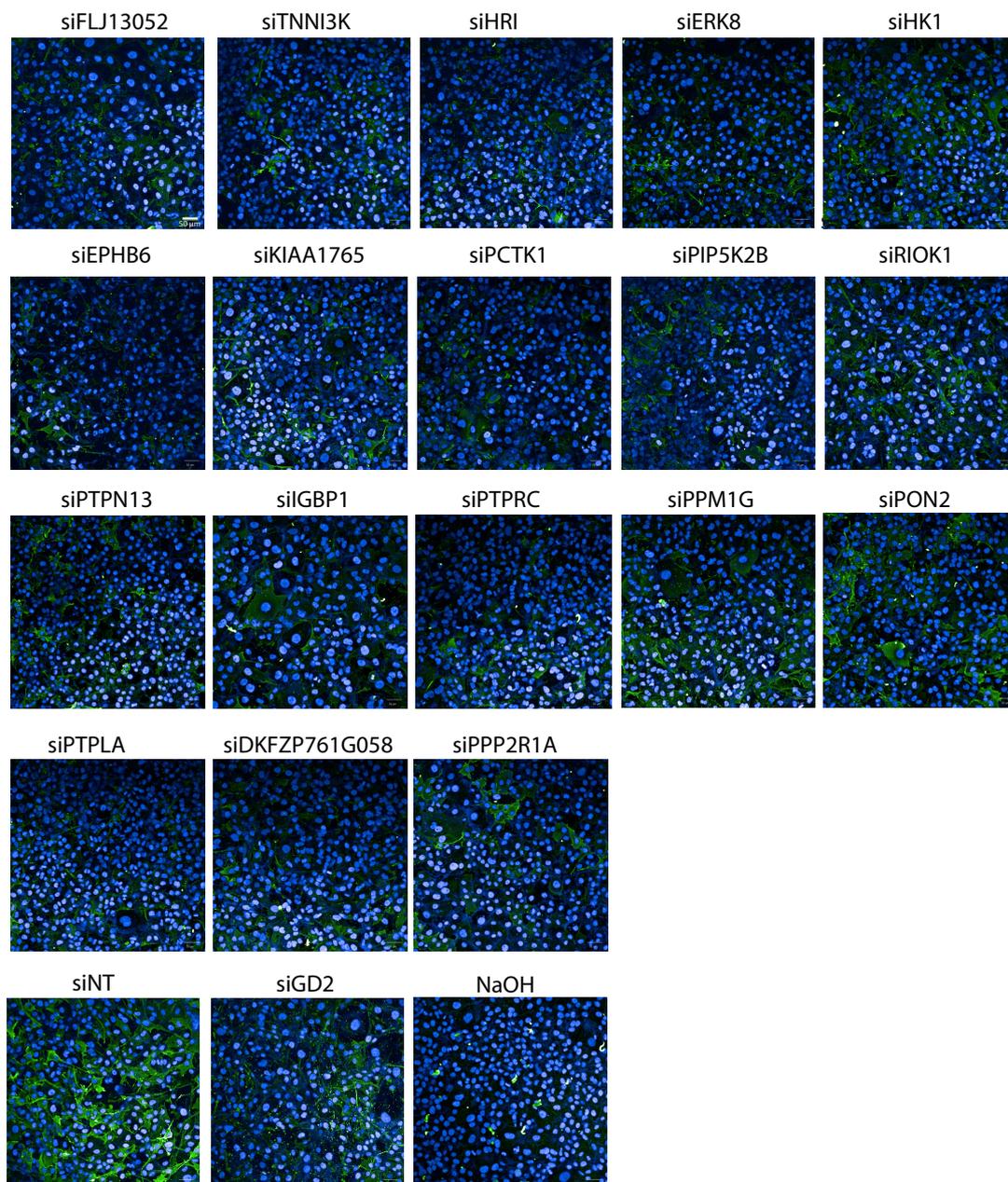


Figure 21 : Gènes identifiés dans le criblage haut débit comme diminuant l'expression d'OAcGD2.

Les cellules MDA-MB-231 GD3S+ sont transfectées par différents siARN ciblant des kinases et phosphatases, et l'expression du OAcGD2 est étudiée par microscopie confocale. Les contrôles utilisés sont un siNT (non targeting), un siGD2S qui diminue l'expression du GD2 donc du OAcGD2, et le traitement par NaOH qui clive les groupements O-acétyl. Les noyaux sont représentés en bleu, l'OAcGD2 en vert. L'échelle indique 50 µm.

La plupart de ces gènes sont impliqués dans le métabolisme cellulaire et dans les voies de signalisation (Figure 22).

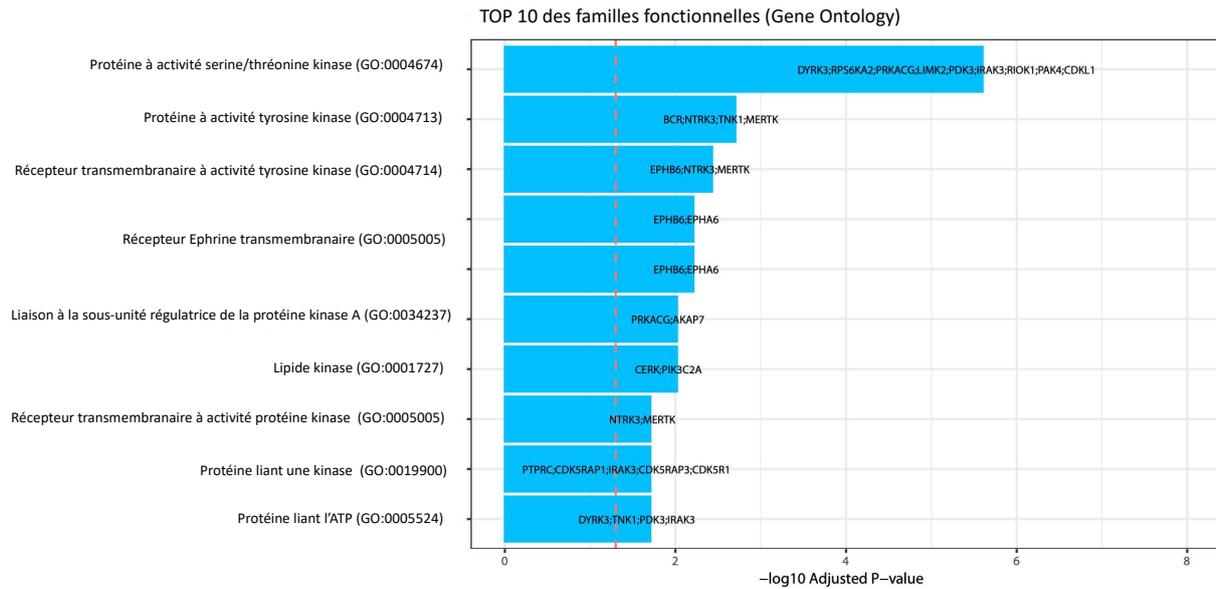


Figure 22 : Regroupement de gènes impliqués dans la biosynthèse du OAcGD2 (identifiés par criblage par siARN haut débit) par famille fonctionnelle (Gene Ontology, GO).

Parmi les 43 gènes identifiés régulant la biosynthèse d'OAcGD2, nous en avons sélectionné deux pour lesquels l'inhibition augmente fortement l'O-acétylation du GD2 : les gènes *CERK* (codant CERK, la céramide kinase) et *PIK3C2A* (codant la Phosphatidylinositol-4-phosphate3-kinase catalytic subunit type 2 alpha) (Figure 20). Ce choix découle de recherches approfondies sur leur implication dans le métabolisme lipidique et la biologie de la cellule cancéreuse, lesquelles seront exposées en détail dans les paragraphes qui suivent.

1. Phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha (*PIK3C2A*)

1.1. Les différentes classes de PI3K

La famille des phosphoinositide 3-kinase (PI3K) comprend 15 kinases avec des spécificités de substrat, de profil d'expression et de mode de régulation (Katso *et al.*, 2001). Elles catalysent la biosynthèse de seconds messagers, les phosphatidylinositol(phosphate) (PI(P)). Ces produits jouent un rôle dans la signalisation cellulaire et sont impliqués dans de

nombreux processus tels que la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, l'organisation du cytosquelette et le trafic membranaire. Les PI3K sont divisées en trois classes. Toutes les classes peuvent synthétiser le phosphatidylinositol 3 phosphate (PI(3)P). Les PI3K de classe I et II peuvent synthétiser les phosphatidylinositol (3,4) biphosphate (PI(3,4)P₂), seules les PI3K de classe I peuvent synthétiser le phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PI(3,4,5)P₃) (Fruman *et al.*, 1998; Maffucci and Falasca, 2014). Exceptées les PI3K de classe III qui sont conservées de la levure à l'homme, les autres familles de PI3K ne se trouvent que chez les eucaryotes (Brown and Auger, 2011).

Toutes les PI3K possèdent un motif particulier, composé d'un domaine C2, un domaine hélicoïdal et un domaine catalytique. La classification des PI3K est basée sur la présence des domaines protéiques et leurs interactions avec les sous-unités régulatrices. Les PI3K de classe I fonctionnent en hétérodimère comprenant une sous unité catalytique p110 et une sous unité régulatrice. Les PI3K de classe I sont activées par les récepteurs tyrosine kinase couplés aux protéines G pour générer le PI(3)P, déclenchant la voie Akt/PDK1, les kinases de la famille Tec et la famille de GTPases Rho. Les PI3K de classe II et III jouent un rôle dans le trafic intracellulaire par la synthèse de PI(3)P et PI(3,4)P₂ fortement enrichis à la membrane plasmique et aux endosomes. Il existe trois PI3K de classe II : PIK3C2A, PIK3C2B et PIK3C2G (Figure 23). Les PIK3C2A et PIK3C2B contiennent une région N-terminale de liaison à la clathrine (CBD). Les PI3K de classe II possèdent également un domaine de liaison à Ras (RBD). Les trois membres de la sous-famille PI3KC2 possèdent une extension C-terminale unique qui porte un domaine C2 et un domaine PX qui se lie préférentiellement au phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. PIK3C2A, contrairement aux autres PIK3C2, possède un domaine de liaison TACC3 (TBD) permettant la stabilisation des microtubules pendant la mitose (Jean and Kiger, 2014).

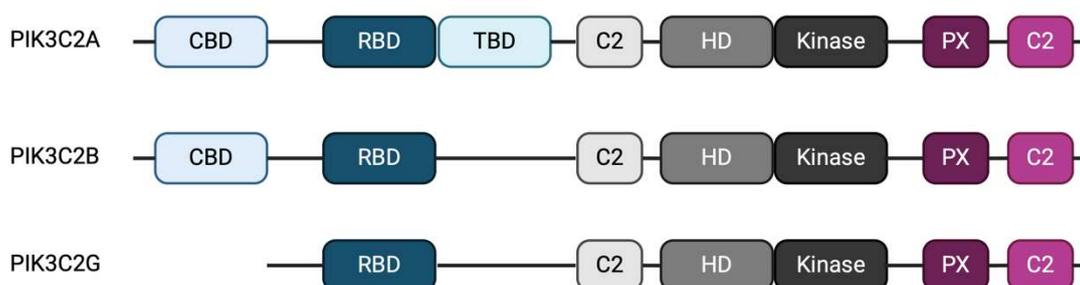


Figure 23 : Structure des trois isoformes de phosphoinositide 3-kinase de classe II (PI3KC2)

Domaine de liaison à la clathrine (CBD), Domaine de liaison Ras (RBD), domaine de liaison TACC3 (TBD), domaine C2 interagissant avec la membrane (C2), domaine hélicoïdal (HD), domaine catalytique (C2 rose) domaine d'homologie Phox (PX). Adapté de (Margaria *et al.*, 2019)

1.2. Fonctions de PIK3C2A

Les fonctions des PI3K de classe II (PIK3C2) sont les moins connues par rapport aux PI3K de classe I et III. PIK3C2A présente une localisation large dans la cellule, non seulement au niveau de la membrane plasmique mais aussi au niveau de l'appareil de Golgi et dans les différents endosomes. PIK3C2A est exprimée de manière abondante durant le développement (Mountford *et al.*, 2015). Elle est impliquée dans la réponse à la stimulation à l'insuline (Falasca *et al.*, 2007), dans la signalisation cellulaire (Biswas *et al.*, 2013) et dans l'angiogenèse (Yoshioka *et al.*, 2012).

PIK3C2A catalyse la phosphorylation du phosphatidylinositol (PI) en PI(3)P et du PI(4)P en PI(3,4)P₂. Au niveau de la membrane plasmique, le PI(3,4)P₂ produit permet l'endocytose médiée par la clathrine (Gaidarov *et al.*, 2001; Posor *et al.*, 2013). L'endocytose est un processus dans lequel des protéines et des lipides sont internalisés par des cargos liés à la membrane. La formation des vésicules recouvertes de clathrine est régulée à la fois par des phosphoinositides mais également par des petites protéines G, incluant les protéines Rab et d'autres protéines. PIK3C2A est colocalisée au niveau des endosomes avec Rab11 et catalyse la production de PI(3)P à partir de PI. PI(3,4)P₂ est rapidement converti en PI(3)P. Ce pool de PI(3)P active Rab11 permettant le relargage de protéine cargo de recyclage à partir de l'endosome précoce et son relargage vers le compartiment endosomal de recyclage (Gulluni *et al.*, 2019) (Figure 24). L'inhibition de PIK3C2A diminue le pool d'endosomes enrichis en PI3P ce qui modifie le trafic endosomal et entraîne un mauvais transport de clathrine aux jonctions des cellules.

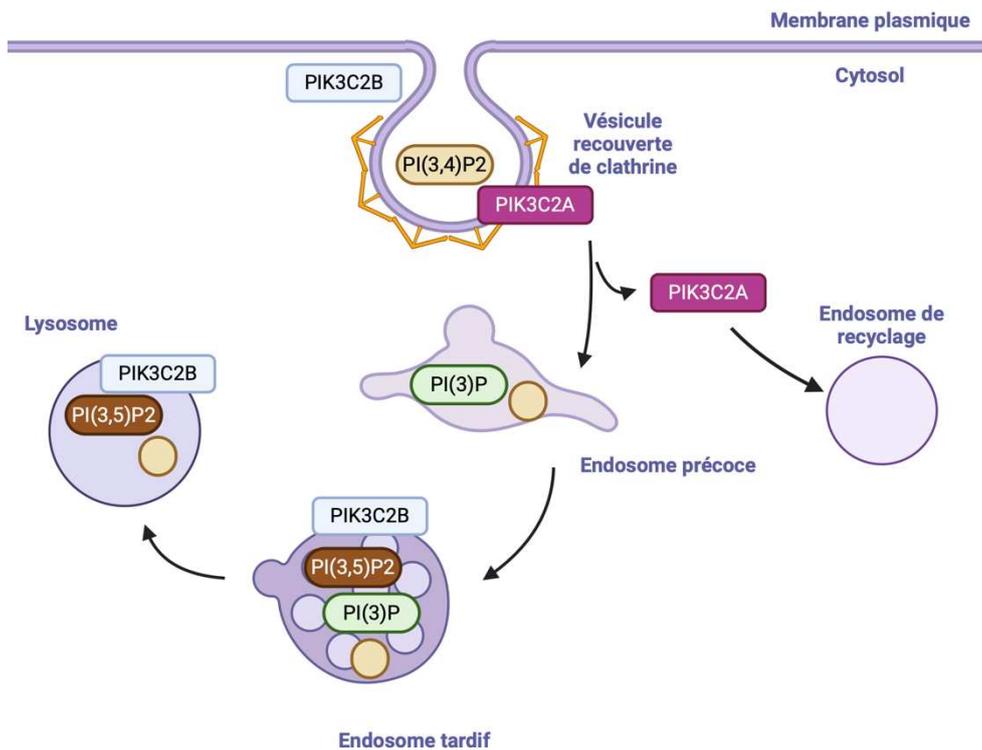


Figure 24 : Fonction des différentes isoformes de PIK3C2.

PIK3C2A participe à la biosynthèse de PI(3,4)P₂ dans les vésicules recouvertes de clathrine et au pool de PI(3)P dans les endosomes précoces. PIK3C2B est quant à lui est impliqué dans la biosynthèse du PI(3,5)P₂ dans les endosomes tardifs et lysosomes. Adapté de (Yoshioka *et al.*, 2012)

Des mutations et/ou des dérégulations des enzymes métabolisant les PIP, telles que les kinases, les phosphatases, les lipases et les acétyltransférases, mettent en évidence l'implication de la signalisation par les phosphoinositides dans de nombreuses maladies dont des cancers.

1.3. Rôles de PIK3C2A dans le cancer

De manière générale, les PIK3 de classe II et notamment PIK3C2A sont peu étudiées dans les cancers. Néanmoins, des analyses transcriptomiques montrent que *PIK3C2A* surexprimé dans différents cancers, comme dans le cancer du rein (Qin *et al.*, 2023) et dans le cancer pancréatique (Singh *et al.*, 2023). Des stratégies de ciblage ont montré que l'inhibition de PIK3C2A par siARN diminue la prolifération des cellules de cancer de col de l'utérus HeLa (Elis *et al.*, 2008) et de cellules de cancer du foie (Ng *et al.*, 2009). L'inactivation de PIK3C2A mène également à des défauts de mitose (Gulluni *et al.*, 2017) et induit l'apoptose

(Ng *et al.*, 2009). Le rôle joué par PIK3C2A dans l'endocytose est aussi altéré puisque l'inhibition de PIK3C2A diminue le PI3P dans les endosomes et supprime l'activation de la protéine G Rac1. Cette inhibition supprime également l'internalisation du récepteur de la sphingosine 1-Phosphate (S1P) dans les endosomes enrichis en PI3P. Conformément au rôle de la S1P dans régulation de la prolifération par la voie Akt, l'inhibition de PI3KC2A dans des cellules endothéliales modifie la prolifération cellulaire (Biswas *et al.*, 2013).

1.4. Stratégies de ciblage de PIK3C2A

Un panel de divers inhibiteurs de PI3K a été synthétisé mais aucun n'est spécifique de PIK3C2A (Knight *et al.*, 2006). L'utilisation de l'inhibiteur PIK90 à 3 μ M dans les cellules de cancer du sein triple négatif SUM149PT montre une diminution de la viabilité cellulaire au bout de 72 h de traitement (Yi *et al.*, 2013). Cependant, PIK90 cible d'autres PIK comme PI3K α , PI3K γ , PI3K δ , PI3KC2b, PIK3 β (Yi *et al.*, 2013).

Afin d'être recyclés, les gangliosides sont endocytés dans la cellule. Une étude utilisant des cellules épithéliales de rein de chien (Madin-Darby canine kidney, MDCK) montre que les gangliosides GD3 et GM1 sont internalisés dans les vésicules recouvertes de clathrine. (Crespo *et al.*, 2008). Le criblage par siARN haut débit suggère que l'inhibition de PIK3C2A augmente l'expression d'OAcGD2 en surface des cellules cancéreuses mammaires. Cette augmentation pourrait avoir un lien avec le rôle de PIK3C2A dans l'internalisation des vésicules recouvertes de clathrine, ou un lien plus indirect dû à l'association de PIK3C2A dans le trafic vésiculaire.

2. CERK

2.1. Rôles de la céramide kinase (CERK) et du céramide-1-phosphate (C1P)

La protéine CERK a été décrite pour la première fois en 1989 dans les vésicules synaptiques comme étant une kinase dépendante du calcium (Bajjalieh *et al.*, 1989). CERK contient un motif de liaison au calcium/calmoduline. La calmoduline interagit avec CERK comme un senseur de calcium pour l'enzyme. Cette calmoduline est essentielle à l'activation

de CERK puisque l'action de son antagoniste W-7 diminue l'activité de CERK et donc la formation de C1P (Mitsutake and Igarashi, 2005). La protéine CERK contient 537 acides aminés. CERK contient une homologie de séquence avec les sphingosine kinase 1 (SphK1) et 2 (SphK2), 5 domaines conservés (C1-C5) précédemment identifiés pour SphK1 et SphK2 sont retrouvés dans CERK (Hoeflerlin *et al.*, 2013). CERK a un domaine N-terminal qui lie les protéines G, le PI(4,5)P₂ et les résidus tyrosine phosphorylés (Sugiura *et al.*, 2002).

La céramide kinase est la seule enzyme capable de générer le C1P (Figure 25). CERK est associée aux membranes du trans-Golgi mais elle peut aussi être retrouvée à la membrane plasmique et sur les membranes des vésicules cytoplasmiques (Bornancin, 2011). CERK utilise généralement le céramide provenant du transport vésiculaire par CERT pour donner le C1P (Lamour *et al.*, 2007). Le C1P formé peut être transporté par un transporteur spécifique CPTP (Ceramide-1-phosphate transfer protein) entre les différentes membranes cellulaires (Simanshu *et al.*, 2013). CERK et le C1P régulent les processus de croissance, survie et motilité dans les cellules saines et cancéreuses. Le céramide et le C1P déterminent la balance entre vie et mort cellulaire (Taha *et al.*, 2006) : en effet, le C1P est impliqué dans la survie cellulaire (Gómez-Muñoz *et al.*, 2004) alors que le céramide a un rôle pro-apoptotique (Payne *et al.*, 2014).

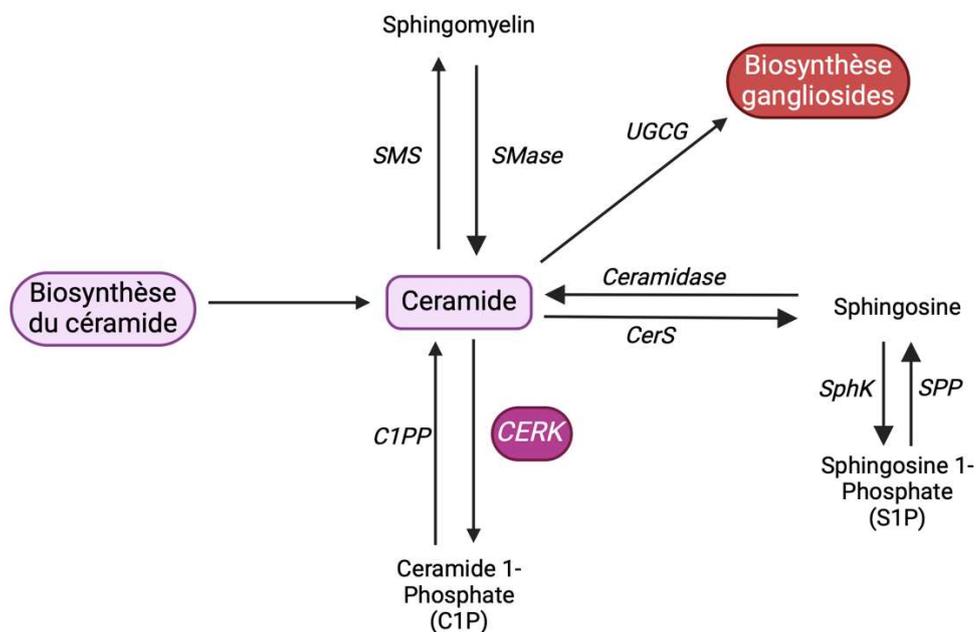


Figure 25 : Métabolisme des sphingolipides.

Le céramide occupe une place centrale dans le métabolisme sphingolipidique, c'est le substrat de la sphingomyéline synthétase (SMS) mais aussi de la céramide kinase (CERK) et le précurseur pour la

biosynthèse des gangliosides. SMase : sphingomyélynase, CerS : ceramide synthétase ; C1PP : céramide 1-phosphate phosphatase. Adapté de (Camacho *et al.*, 2022).

2.2. CERK et cancer

La surexpression de CERK a été démontrée dans les tissus tumoraux de sein en comparaison aux tissus adjacents dans des analyses transcriptomiques mais aussi sur coupes de tissus (Bhadwal *et al.*, 2020). L'analyse menée sur 2200 patientes atteintes de cancer du sein, tous types confondus, montre une augmentation de l'expression de *CERK* liée à une augmentation de risque de récurrence (Payne *et al.*, 2014). Cette conclusion a également été faite dans les cancers du sein ER négatif exclusivement (Ruckhäberle *et al.*, 2009). Cette augmentation semble être dépendante du stade du cancer (Bhadwal *et al.*, 2020). En effet, des souris xénogreffées avec des cellules de cancer de sein triple négatif MDA-MB-231 ayant métastasé aux poumons et sur les os, présentent une augmentation d'expression de *CERK* dans les métastases en comparaison à la tumeur primaire.

Des études montrent que la surexpression de *CERK* dans ces cellules augmente les capacités migratoires de cellules de cancer pancréatique (Rivera *et al.*, 2016) et de cancer du sein métastatique (Schwalm *et al.*, 2020). A contrario, l'inhibition de *CERK* dans les cancers de sein triple négatifs et les cancers de sein triple positifs diminue la prolifération des cellules (Rajput *et al.*, 2022).

CERK active de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la migration des cellules cancéreuses, comme la voie PI3K/Akt (Schwalm *et al.*, 2020). La migration cellulaire est un processus complexe qui requiert la coordination de multiples voies. Les régulateurs clés sont les membres de la famille Rho des GTPases. La surexpression de *CERK* et de son produit le C1P induisent la phosphorylation et donc l'activation des membres de la famille Rho (Rivera *et al.*, 2016). En plus des voies PI3K/Akt/mTor et Rho, *CERK* active les voies Ras/ERK (Zhu *et al.*, 2021) (Figure 26).

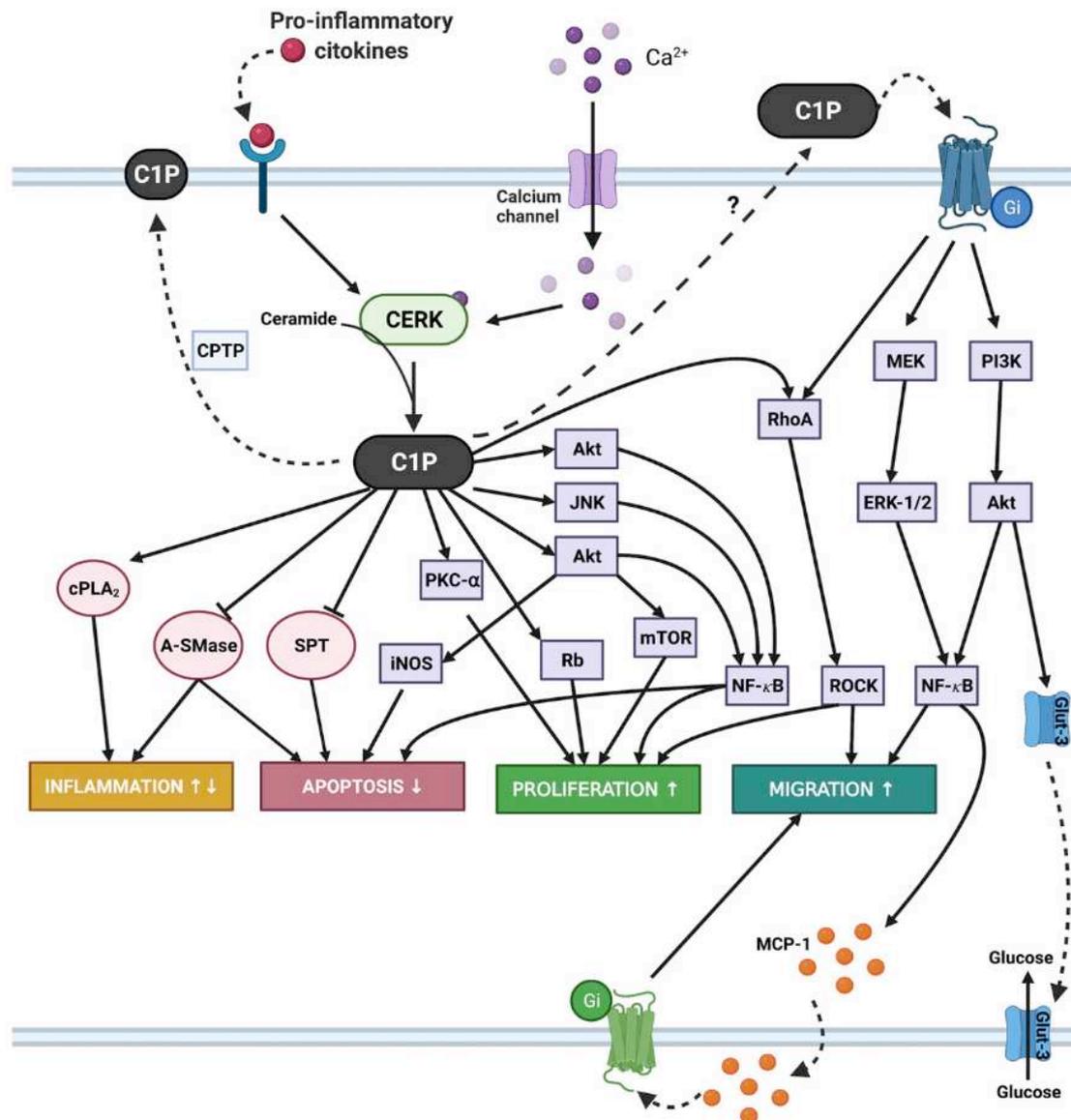


Figure 26 : Rôle du C1P dans la tumorigenèse

Le C1P généré par CERK peut être transporté à la membrane plasmique par la protéine CPTP, ou sécrété dans l'environnement extracellulaire. Le C1P intracellulaire exerce de nombreuses fonctions biologiques, en particulier la croissance cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, la stimulation de la migration cellulaire ou la modulation de l'inflammation par l'activation ou l'inhibition de plusieurs voies de signalisation (Camacho *et al.*, 2022).

2.3. Stratégie de ciblage de CERK

L'inhibition de CERK par l'inhibiteur spécifique NVP231 ou par shARN diminue la migration des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 dérivant de métastases chez la souris (Schwalm *et al.*, 2020). Le NVP231 est un inhibiteur réversible qui rentre en compétition avec le céramide pour inhiber l'activité de CERK (Graf *et al.*, 2008). L'inhibition de CERK par le

NVP231 diminue le taux de prolifération dans des cellules cancéreuses pancréatiques (Rivera *et al.*, 2016), mammaires et pulmonaires en provoquant un arrêt en phase M (Pastukhov *et al.*, 2014).

CERK favorise la survie cellulaire en produisant du C1P. Afin de d'induire une mort cellulaire plus importante, il semble donc intéressant de cibler CERK en combinaison avec les thérapies déjà utilisées. C'est le cas avec la stratégie d'inhibition de CERK par siARN qui a démontré une sensibilisation de cellules de cancer du sein triple négatif issues de patientes, à la chimiothérapie (paclitaxel et cisplatine) (Zhu *et al.*, 2021). L'inhibition de CERK en concert avec d'autres traitements pourrait améliorer la mort cellulaire, réduire le réservoir de cellules tumorales résiduelles et donc prévenir la récurrence tumorale. Une expression élevée de gènes impliqués dans la biosynthèse des glycosphingolipides tels que *UGT8* (codant la galactosylcéramide synthétase), *CERK* et *ST8SIA1* sont retrouvées dans les cancers du sein ER-négatif. Ces résultats suggèrent que des thérapies visant CERK et ST8SIA1, ou CERK et UGT8 seraient des stratégies intéressantes (Ruckhäberle *et al.*, 2009).

Objectifs de la thèse

Afin de poursuivre les travaux de thèse de S. Cavdarli, un deuxième dispositif CIFRE a été établi entre OGD2 Pharma et l'UGSF mettant en place mes travaux de thèse. L'objectif principal de ma thèse est d'étudier l'implication de CERK et PIK3C2A dans la biosynthèse d'OAcGD2, de déterminer les mécanismes par lesquels ils modulent l'expression de ce ganglioside et dans quelle mesure ces gènes peuvent représenter un intérêt pour des approches thérapeutiques et diagnostiques ciblant l'antigène OAcGD2 dans le cancer du sein. Une deuxième partie, en collaboration avec le Pr Duan (Université de Miami), est consacrée à l'étude du profil gangliosidique des cellules d'ostéosarcomes sensibles et résistantes aux chimiothérapies, dans le but d'établir des liens éventuels entre l'expression de certains gangliosides et la résistance à la doxorubicine.

Travaux de recherche

Régulation de l'expression du ganglioside OAcGD2 dans le cancer du sein : vers de nouvelles cibles thérapeutiques

1. Matériels et méthodes

1.1. Analyses transcriptomiques

Les analyses de survie ont été étudiées grâce à l'algorithme optimisé de l'outil en ligne Survexpress <http://victortrevino.bioinformatics.mx:8080/Biomatec/SurvivaX.jsp> (Aguirre-Gamboa *et al.*, 2013). La carte de chaleur montre le hazard ratio (HR) et l'intervalle de confiance à 95% des patients ayant des hauts niveaux d'expression et bas niveaux d'expression des gènes *CASD1*, *CERK*, *PIK3C2A*, *B4GALNT1*, *ST8SIA1* seuls ou en combinaisons dans des cohortes TCGA. Les données ont été analysées dans les cancers d'origine neuroectodermiques suivants : les corticosurrénales (Adrenocortical carcinoma (ACC)) ; les glioblastomes (Glioblastomas (GBM)) ; les gliomes de bas grade (Low-grade gliomas (LGG)) ; les cancers du sein (Breast invasive carcinoma (BRCA)) ; les cancers de la tête et du cou (Head and Neck squamous cell carcinoma (HNSC)) ; les leucémies myéloïdes aiguës (Acute Myeloid Leukemia (LAML)) ; les mélanomes (Skin Cutaneous Melanoma (SKCM)).

1.2. Culture cellulaire

Les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ surexprimant la GD3 synthétase ont précédemment été obtenues par l'équipe (Cazet *et al.*, 2009). Les cellules MDA-MB-231 Mock et MDA-MB-231 GD3S+ ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté (Biowest France), 1 mM de L-glutamine et supplémenté avec 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco, Fischer Scientific, France). Les cellules de neuroblastome Kelly ont été fournies par le Pr Tony Lefebvre (UGSF, Lille, France). Les cellules de neuroblastome LAN-1, LAN-5 et de glioblastome U87MG, U251MG ont été données par OGD2Pharma (Nantes, France). Les cellules de neuroblastome et glioblastome ont été cultivées dans du RPMI 1640 (Lonza, Belgique) contenant 10 % de SVF décomplémenté, 2 mM de L-glutamine et supplémenté avec 1 mM de pyruvate de sodium.

Les cellules de gliome pédiatrique HSJD-DIPG-007, HSJD-DIPG-012, HSJD-DIPG-013, HSJD-DIPG-014 (nommées respectivement DIPG7, DIPG12, DIPG13 et DIPG14) ont été fournies par le Dr Samuel Meignan (Canter, Lille, France). Les cellules DIPG sont maintenues sous forme de tumosphère dans un milieu TSM (tumor stem medium) composé à moitié de milieu neurobasal-A (Life technologies, USA) et de moitié de milieu DMEM/F12, supplémenté avec 1 % de Glutamax, 1 % d'antibiotiques antimycotiques, 1 % d'acides aminés non essentiels, 1 mM de pyruvate de sodium et 1 % de milieu HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid). Le milieu est supplémenté avec 2% de B27 conçu pour les cellules neuronales, 20 ng/ml de FGF humain (Fibroblast Growth Factor), 10 ng/mL de PDGF-AA humain (Platelet-derived growth factor-AA), 10 ng/mL de PDGF BB (Platelet-derived growth factor-BB) et de l'héparine. Toutes les lignées cellulaires sont maintenues à 37°C sous 5 % de CO₂.

1.3. Anticorps et inhibiteurs

L'anticorps monoclonal anti-OAcGD2 murin IgG3 (8B6), l'anticorps monoclonal anti-OAcGD2 chimérique souris/humain IgG1 c8B6 et l'anticorps monoclonal murin anti-GD2 IgG3 14.18 sont produits et proviennent d'OGD2Pharma (Nantes, France). L'anticorps monoclonal chimérique anti-GD2 humain/souris IgG1 ch14.18 (Dinutuximab, unituxin, ref MA5-42000) provient de chez ThermoFischer Scientific (France). Les concentrations d'anticorps varient selon les expériences : 10 µg/mL pour l'immunofluorescence couplée à la microscopie confocale et les tests ADCC (Antibody Dependant Cell Toxicity), 100 µg/mL pour la cytométrie en flux. L'anticorps secondaire utilisé pour la microscopie confocale (à 3 µg/mL) et la cytométrie de flux (10 µg/mL) est un anticorps IgG anti-souris produit chez la chèvre couplé à l'Alexa 488 (Invitrogen, France).

L'inhibiteur spécifique de CERK, NVP231, provient de chez Merck et est utilisé à 1 µM pour chaque expérience. L'inhibiteur de PIK3C2A, PIK90 (Euromedex, France) a été utilisé à 3 µM. Le SAHA, inhibiteur de HDAC, a été utilisé à 250 nM (Sigma, France).

1.4. Transfections par siARN

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 6 puits avec ou sans lamelle selon le type d'expérience, à raison de 150 000 cellules par puits. Les transfections se font avec 1 µM de siGENOME humain CERK (D-004061-01, D-004061-02, D-004061-03, D-004061-04, Horizon Dharmacon) ou siGENOME humain PIK3C2A (D-006771-01, D-006771-02, D-006771-03, D-006771-04, Horizon Dharmacon) (tableau 4), 4 µL de lipofectamine RNAimax (Invitrogen, USA) dans 500 µL de milieu UltraMEM (Lonza, Belgium) auxquels est ajouté 1,5 mL de milieu contenant du SVF approprié aux cellules. Après 72 h, les cellules sont collectées pour l'immunohistochimie et analysées par microscopie confocale, ou par RT-qPCR.

Tableau 4 : Séquences cibles des siARN.

Liste des siARN individuels et leur nom attribué dans le manuscrit. Les siARN smart pool (siARN SP) contiennent les 4 séquences cibles des siARN individuels

Gène cible	Référence et nom du siARN	Séquence cible
<i>CERK</i>	D-004061-01 (siCERK1)	GAUCAUCGCGUUGAGGAA
	D-004061-02 (siCERK2)	CAACGGACUGCGUGUGUUA
	D-004061-03 (siCERK3)	CCACUGACAUCAUCGUUAC
	D-004061-04 (siCERK4)	CAAGGCAAGCGGAUUAUUG
<i>PIK3C2A</i>	D-006771-01 (siPIK3C2A1)	AGGAAGUGCUGCAGAAUAA
	D-006771-02 (siPIK3C2A2)	GAAGAGAGAUCGACAGCAA
	D-006771-03 (siPIK3C2A3)	GGAUUUCAGCUACCAGUUA
	D-006771-04 (siPIK3C2A4)	CAAGGAAGCUUACCUAUCU

1.5. RT-qPCR (Reverse transcription – PCR quantitative)

L'extraction des ARN totaux des culots cellulaires a été réalisée grâce au kit Nucleospin ARN plus (Macherey Nagel, Allemagne) en suivant le protocole du fournisseur. La synthèse des ADNc se fait par transcription inverse des ARN en utilisant le kit de synthèse d'ADNc pour qPCR (ThermoFischer Scientific, France) suivant le protocole du fournisseur, à partir d'un µg d'ARN totaux. Les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant le kit Luna-qPCR (New England Biolabs NED, USA) avec 25 µL de mix de réaction et 12,5 µL de mix Luna 2X (NEB), 1 µL de chaque primer à 300 nM (Eurogentec, Belgium), dont les séquences sont données dans le tableau 5, 4 µL d'ADNc (dilués au 1:40) et 6,5 µL d'eau ultrapure.

Tableau 5 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR.

La température d'hybridation et la pente de la droite d'étalonnage reflétant l'efficacité de la PCR sont indiquées.

Gènes	Amorce Sens 5'-3'	Amorce Antisens 5'-3'	Tm	Pente
<i>HPRT</i>	GCC AGA CTT TGT TGG ATT TG	CTC TCA TCT TAG GCT TTG TAT TTT	58°C	-3.343
<i>β4GALNT1</i>	CAG-CGC-TCT-AGT-CAC-GAT-TGC	CCA-CGG-TAA-CCG-TTG-GGT- AG	51°C	-3.352
<i>ST8SIA1</i>	GCG-ATG-CAA-TCT-CCC-TCC-T	TTC-CCG-AAT-TAT-GCT-GGG- AT	60°C	-3.431
<i>CASD1</i>	GTG-GAT-TTT-CTG-TGG-CAT-CC	AAG-CGC-TTC-ACT-GCT-ACC-AT	60°C	-3.269

Les RT-qPCR ont été faites sur l'instrument AriaMX (Agilent, AriaMX Real-Time PCR System) avec le programme suivant pour les gènes *ST8SIA1* et *CASD1* : dénaturation initiale pendant 3 min à 95°C, suivi de 40 cycles de PCR avec dénaturation pendant 15 s à 95°C, hybridation/élongation pendant 30 s à 60°C. Pour *β4GALNT1* et le gène *HPRT* (codant la protéine Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase), la dénaturation a été faite 15 s à 95°C, l'hybridation 15 s à 51 ou 58°C, et l'élongation 15 s à 60°C. Les résultats ont été analysés en utilisant le programme AriaMX v1.6 et calculés en utilisant la méthode de M.Pfaffl (Pfaffl, 2001).

1.6. Immunohistochimie et microscopie confocale

Les cellules cancéreuses MDA-MB-231 Mock, MDA-MB-231 GD3S+, Kelly, U87MG et DIPG13 sont ensemencées dans des plaques 6 puits avec lamelles à raison de 250000 cellules par puits. Selon les expériences, les cellules ont pu être transfectées avec des siARN pendant 72 h, ou traitées avec du NVP231 à 1 µM ou du PIK90 à 3 µM pendant 2, 4, 6, 8, 24 h ou 48 h. Les cellules sont fixées avec 4% de paraformaldéhyde dans du tampon phosphate à 0,1 M. Après 3 rinçages avec du PBS 1X, les cellules sont perméabilisées avec 5 µg/mL de digitonine diluée dans du PBS 1X pendant 20 min. Les cellules sont rincées 3 fois dans du PBS 1X puis incubées dans du tampon de blocage (PBS 1X-BSA 0,5%). Les lamelles sont ensuite placées en chambre humide et incubées avec les anticorps monoclonaux anti-GD2 ou anti-OAcGD2 à 10

$\mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 2 h. Après 3 rinçages au PBS 1X-BSA 0,5% les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 488 pendant 1 h à une concentration de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Après 3 lavages au PBS 1X, les noyaux sont marqués avec le DAPI à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Merck, Germany). Les lamelles sont ensuite montées sur lame avec du liquide de montage (Dako, USA). Les lames sont placées 24 h à 4°C avant d'être observées sous microscope confocal Nikon A1 (Nikon Instrument Europe B.V) avec un objectif à huile Plan Apo 60X (NA=1.4). La fluorescence verte est acquise avec $\lambda_{\text{ex}}=488$ nm et $\lambda_{\text{em}}=500-550$ nm et la fluorescence bleue est acquise avec $\lambda_{\text{ex}}=404.1$ nm et $\lambda_{\text{em}}=425-475$ nm. Les images sont analysées avec Image J (Schindelin *et al.*, 2012) et une macro « faite maison » pour discriminer les noyaux. Le programme calcule, pour chaque image, l'intensité de fluorescence autour du noyau.

1.7. Tests de migration en chambres de Boyden

Dans des plaques 12 puits, 1 mL de milieu contenant du SVF est placé au fond du puits. Les chambres de migration (Corning Inc, USA) sont placées et 50000 cellules MDA-MB-231 GD3S+ dans du milieu sans sérum sont ajoutées sur le dessus de la chambre. Après 6 h ou 24 h à 37°C et 5 % de CO₂, les cellules qui n'ont pas migré sont grattées à l'aide d'un coton tige. Les cellules ayant migré de l'autre côté de la membrane par les pores de 8 μm sont fixées avec du paraformaldéhyde 4% pendant 20 min. Les noyaux sont marqués avec du DAPI à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les membranes sont finalement découpées puis placées entre lame et lamelle avec du liquide de montage Dako. Les lames sont placées 24 h à 4°C avant d'être observées.

1.8. Western Blot

Après traitement au NVP231 à 1 μM pendant 6h, transfection par siARN pendant 72 h avec 1 μM ou 6 h de staurosporine à 1 μM , les cellules MDA-MB-231 GD3S+ sont lavées avec du PBS 1X et incubées 20 min avec le tampon de lyse RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS, pH 7,5) supplémenté avec 1 mM d'orthovanadate de sodium, 10 mM de NaF, un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X. Le lysat cellulaire est centrifugé 15 min à 20000 g à 4°C. Les surnageants sont collectés et la quantification de protéines est

déterminée grâce au kit micro-BCA (ThermoFischer Scientific, France) selon les instructions du fournisseur. Des quantités égales de protéines (20 µg par puits) sont séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 10% dans du tampon de migration (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0,1% (m/v) SDS, pH 8,8) et transférées sur membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, USA) dans du tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% (v/v) méthanol, pH 8,8) à 200 mA pendant 2 h. Les membranes sont bloquées dans du lait dilué dans du TBS-Tween à 5% pendant 1 h. Elles sont ensuite incubées 2 h avec les anticorps primaires dirigés contre PARP (9542S, Ozyme, France; 1:1,000), la caspase 3 (CST9661, Ozyme, France; 1:1000) ou la GAPDH (71548; Covalab; 1:1000). Après 3 rinçages, l'anticorps secondaire couplé à la HRP (Horseradish peroxidase) approprié est ajouté pendant 1 h à température ambiante (dilution au 1 :10000). Après 3 rinçages avec le TBS-Tween, les bandes sont détectées à l'aide de la caméra CCD (Fusion Solo, France) et le logiciel d'acquisition Fusion.

1.9. Cytométrie en flux

Les cellules cancéreuses MDA-MB-231 GD3S+ et DIPG13 ont été traitées pendant 6 h avec le NVP231 à 1 µM. Elles sont ensuiteensemencées dans des microtubes de 1,5 ml à raison de 100000 cellules par tube. Les cellules sont rincées avec du PBS 1X et centrifugées à 300 g. Les tubes sont placés sur glace et les cellules sont incubées avec l'anticorps monoclonal anti-OAcGD2 à 100 µg/mL pendant 30 min. Après 3 rinçages au PBS 1X et centrifugations à 300 g, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 488 pendant 30 min à une concentration de 10 µg/mL. Les cellules sont à nouveau rincées 3 fois alternant PBX 1X et centrifugation à 300 g. Les cellules sont resuspendues dans 200 µL de PBX 1X avant d'être analysées en cytométrie en flux. Celle-ci est effectuée avec le cytoflex (Beckman Coulter) selon les longueurs d'ondes suivantes $\lambda_{ex} = 496$ nm et $\lambda_{em} = 516$ nm et les données sont analysées avec le logiciel CytExpert 2.4.

1.10. Antibody-dependant Cell cytotoxicity ADCC

Les prélèvements de sang enrichis sont collectés de donneurs sains par l'Etablissement Français du Sang (Lille, France). Les cellules mononuclées périphériques du sang (Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) sont obtenues après une centrifugation sur du lymphoprep (Stemcell, France) grâce à un gradient de densité. Les cellules NK sont isolées grâce à la RosetteSep (StemCell, France). Les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ ou les cellules de gliome pédiatrique DIPG13 sont traitées avec 1 μ M de NVP231 ou 250 nM de SAHA pendant 6 h. Les cellules cancéreuses sont ensuite marquées avec du « cell trace Violet » (CTV) (FischerScientific, USA). Dans le même temps 25000 cellules cancéreuses et des cellules NK sont ensemencées en plaques 96 puits avec différents ratio « cellules effectrices : cellules cibles » dans du RPMI1640 contenant 10 % de SVF décomplémenté, de la pénicilline/streptomycine 1X, des acides aminés non essentiels 1X (Gibco, Fischer Scientific, France) et 1 mM de pyruvate de sodium. Les anticorps sont utilisés à 10 μ g/mL. Après 4 h, le marqueur de viabilité 7-aminoactinomycine D (7AA) (Fischer Scientific, USA) est ajouté dans chaque puits. La cytométrie de flux est effectuée avec le cytoflex (Beckman Coulter) selon les longueurs d'ondes pour le CTV λ_{ex} = 546 nm et λ_{em} = 647 nm et pour le 7AAD λ_{ex} = 630 nm et λ_{em} = 661 nm et les résultats sont analysés avec le logiciel CytExpert 2.4

2. Résultats

2.1. Etude de la survie globale chez les patients atteints de cancers d'origine neuroectodermique exprimant des enzymes impliquées dans la biosynthèse d'OAcGD2

La relation entre l'expression des gènes *CASD1*, *β 4GALNT1*, *ST8SIA1*, *CERK*, *PIK3C2A*, décrits dans la figure 2, et la survie globale des patients a été étudiée avec l'outil en ligne Survexpress. Les hazard ratio « HR » représentent la probabilité de décès du patient, un HR élevé signifie qu'un patient du groupe à forte expression a plus de risque de mourir qu'un patient du groupe à faible expression. Nous avons analysé l'impact de l'expression des gènes *CASD1*, *β 4GALNT1*, *ST8SIA1*, *CERK*, *PIK3C2A* seuls ou en combinaisons, sur la survie des patients.

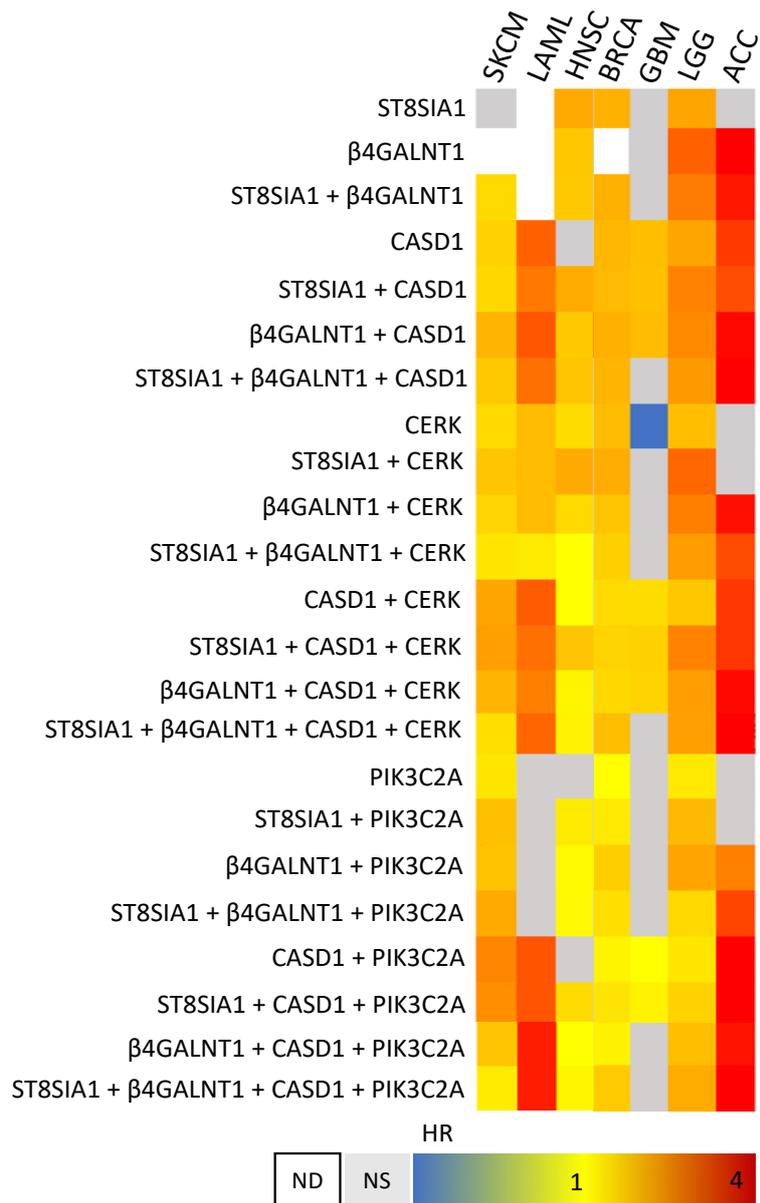


Figure 27 : Carte de chaleur montrant le hazard ratio et l'intervalle de confiance à 95% pour de hauts et faibles niveaux d'expression des gènes *ST8SIA1*, *β4GALNT1*, *CASD1*, *CERK* et *PIK3C2A* seuls ou en combinaisons dans les cohortes TCGA des cancers d'origine neuroectoderme.

Le hazard ratio (HR) a été calculé dans les populations désignées comme haut risque et faible risque basé sur l'expression individuelle des données TCGA par l'algorithme optimisé de Survexpress sur bioinformatica.mty.itesm.mx/SurvExpress. Les plus grandes valeurs de HR des gènes d'intérêt représentés en couleurs chaudes désignent les populations à haut risque. Les données ont été analysées dans les corticosurénalomes (Adrenocortical carcinoma (ACC)) ; les glioblastomes (Glioblastomas (GBM)) ; les gliomes de bas grade (Low-grade gliomas (LGG)) ; les cancers du sein (Breast invasive carcinoma (BRCA)) ; les cancers de la tête et du cou (Head and Neck squamous cell carcinoma (HNSC)) ; les leucémies myéloïdes aiguës (Acute Myeloid Leukemia (LAML)) ; les mélanomes (Skin Cutaneous Melanoma (SKCM)). Les carrés sont colorés en fonction des seuils de valeurs de HR suivants : $HR \leq 1$ représenté en couleurs froides, $HR = 1$ représenté en jaune, $HR \geq 1$ représenté en orange et $HR \geq 4$ représenté en rouge. Les HR non significatifs sont représentés en gris et lorsqu'il n'y a pas de donnée, un carré blanc est affiché.

Une forte expression du gène *ST8SIA1* est corrélée à un mauvais pronostic pour 3 types de cancers d'origine neuroectodermique sur 7 incluant les gliomes de bas grade (LGG), les cancers du sein (BRCA) et les cancers de la tête et du cou (HSNC). Une haute expression du gène *β4GALNT1* est corrélée à un mauvais pronostic dans 3 types de cancers d'origine neuroectodermique sur 7 incluant les gliomes de bas grade (LGG), les corticosurrénales (ACC) et les cancers de la tête et du cou (HNSC). Une haute expression du gène *CASD1* est associée à un mauvais pronostic pour la majorité des cancers d'origine neuroectodermique, c'est-à-dire 6 types de cancers sur 7 excluant les cancers de la tête et du cou pour lesquels les valeurs ne sont pas significatives. Nous avons étudié l'expression du gène *CASD1* en combinaison avec les gènes de GT *β4GALNT1* ou *ST8SIA1*. La totalité des cancers ayant un mauvais pronostic quand *CASD1* est surexprimé ont un taux de survie encore diminué lorsque des hauts niveaux d'expression de *CASD1* sont corrélés avec des hauts niveaux d'expression de *β4GALNT1* et/ou *ST8SIA1*. De plus, cette combinaison augmente le hazard ratio pour les HSNC, rendant la totalité des cancers d'origine neuroectodermiques avec un mauvais pronostic (Figure 27).

La haute expression du gène *CERK* est associée à un mauvais pronostic pour 5 types de cancers d'origine neuroectodermique sur 7 dont les LGG, les BRCA, les HSNC, les leucémies myéloïdes aiguës (LAML) et les mélanomes (SKCM). L'expression élevée de *CERK* et *ST8SIA1* est également associée à un mauvais pronostic pour les 5 cancers d'origine neuroectodermique pour lesquels l'expression de *CERK* seule induit un mauvais pronostic, avec un HR qui augmente lorsque les deux gènes sont associés. La combinaison d'expressions élevées de *CERK* et *β4GALNT1* diminue les chances de survie des LGG mais aussi de carcinomes corticosurrénales (ACC). L'expression élevée des gènes *CASD1* et *CERK* augmente le mauvais pronostic pour tous les types de cancers dont les GBM et les ACC qui ne présentaient pas de mauvaises chances de survie avec une expression élevée de *CERK* seule. La combinaison d'une expression élevée des gènes *CERK*, *ST8SIA1*, *β4GALNT1* et *CASD1* augmentent encore le mauvais pronostic des patients (Figure 27).

L'expression du gène *PIK3C2A* à de hauts niveaux est associée à une survie diminuée pour 3 cancers d'origine neuroectodermiques dont les BRCA, les SKCM et les LGG. La combinaison d'une expression élevée des gènes *PIK3C2A* et *ST8SIA1* ou *PIK3C2A* et *β4GALNT1* ou *PIK3C2A + ST8SIA1 + β4GALNT1* diminue les chances de survie des mêmes types de cancers

mais également pour les HNSC. En comparaison avec les hauts niveaux d'expression de *PIK3C2A* seul, la combinaison d'une expression élevée de *CASD1* et *PIK3C2A* diminue la survie globale des patients pour la totalité des types de cancers sauf pour les cancers de la tête et du cou pour lesquels les valeurs sont non significatives. Comme pour les autres combinaisons, l'association de *PIK3C2A* avec *ST8SIA1* et/ou *β4GALNT1*, et/ou *CASD1* augmente le mauvais pronostic des patients (Figure 27).

De manière générale, nous observons que la forte expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des gangliosides diminue les chances de survie des patients atteints de cancer d'origine neuroectodermique. L'association d'expressions élevées de plusieurs gènes augmente le mauvais pronostic pour ces patients.

D'autres analyses ont été réalisées dans d'autres types de cancers qui ne sont pas d'origine neuroectodermiques comme les sarcomes, les paragangliomes, les cancers endométriaux, les cancers de la thyroïde, les thymomes, les cancers des testicules, les adénocarcinomes de l'estomac, les adénocarcinomes de la prostate, les adénocarcinomes pancréatiques, les adénocarcinomes de l'ovaire, les cancers du poumon, les carcinomes hépatiques, les cancers du rein, les cancers de l'œsophage, l'adénocarcinome endocervical, les cancers de la vessie, les cholangiosarcomes. Nous observons que l'expression élevée de *CASD1* est corrélée avec une survie diminuée pour 17 types de cancers sur 26, que l'expression élevée de *CERK* est associée à un mauvais pronostic pour 15 cancers sur 26 et que l'expression élevée de *PIK3C2A* est associée à un mauvais pronostic pour 12 cancers sur 26. Ces résultats ont été utilisés pour le Brevet PCT/EP2022/065896 déposé en juin 2022 intitulé "Use of *CASD1* as a biomarker of a cancer expressing the *O*-Acetylated GD2 ganglioside" dont je suis co-inventrice avec Sophie Groux-Degroote, Philippe Delannoy, Sumeyye Cavdarli et Jean-Marc Le Doussal.

2.2. Etude de l'expression de GD2 et d'OAcGD2, ainsi que celle des gènes impliqués dans leur biosynthèse, dans les cancers d'origine neuroectodermique

L'expression des enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides complexes (*β4GALNT1* et *ST8SIA1*) et l'*O*-acétylation (*CASD1*) a été étudiée par RT-qPCR dans plusieurs types de cancers d'origine neuroectodermique : les cellules de cancer du sein (MDA-MB-231

Mock et MDA-MB-231 GD3S+), les neuroblastomes (Kelly, LAN-1 et LAN-5), les glioblastomes (U87MG et U251MG) et les gliomes pédiatriques (DIPG7, DIPG12, DIPG13, DIPG14). L'expression du GD2 et d'OAcGD2 a été étudiée en parallèle par immunofluorescence et microscopie confocale.

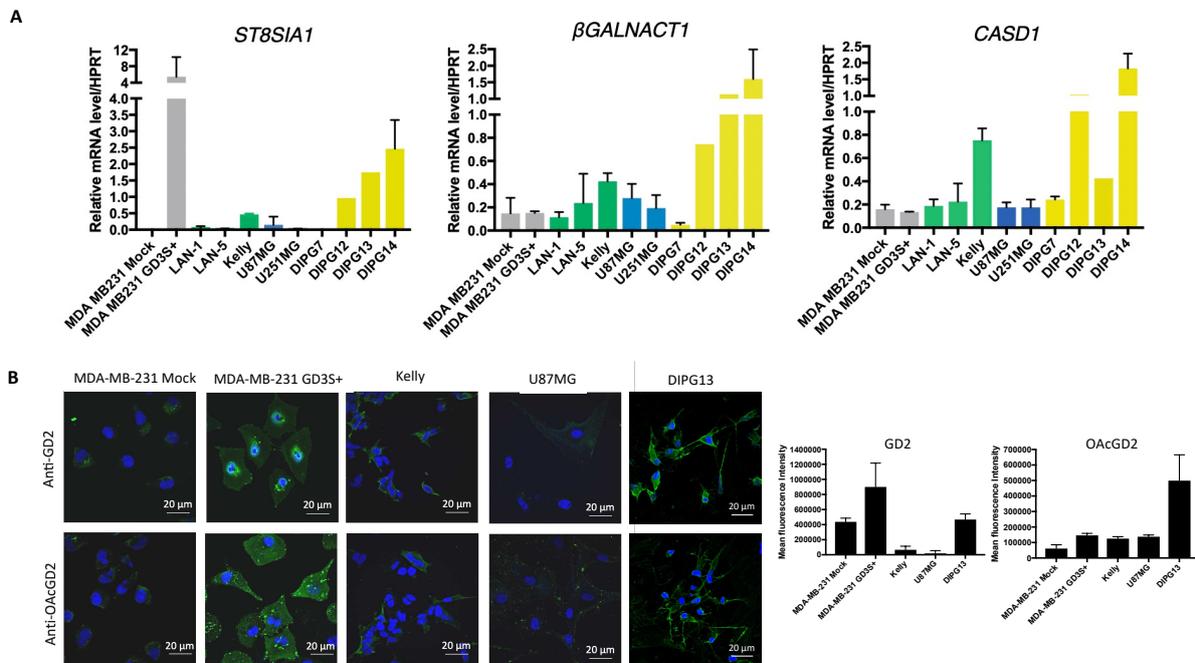


Figure 28 : Expression de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides complexes et expression d'OAcGD2 dans des cancers d'origine neuroectodermique

(A) Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes *ST8SIA1*, *β4GALNT1*, et *CASD1* dans des cellules de cancer du sein (barres grises), neuroblastome (barres vertes), glioblastome (barres bleues), gliome pédiatrique (barres jaunes). L'expression des différents gènes a été normalisée par rapport à l'expression des ARNm de *HPRT* (n=3). (B) Images représentatives et histogrammes de l'expression du GD2 et OAcGD2 dans les différentes lignées cellulaires en utilisant l'immunohistochimie et la microscopie confocale (n=3). Les cellules ont été incubées avec l'anticorps monoclonal anti-GD2 14.18 et l'anticorps monoclonal anti-OAcGD2 IgG3 8B6. Les gangliosides sont visualisées en vert grâce à l'anticorps IgG conjugué à l'Alexa Fluor 488. Les noyaux sont marqués en bleu avec le DAPI. Toutes les images ont été prises avec les mêmes paramètres.

Les résultats montrent que toutes les cellules de cancers d'origine neuroectodermique expriment à des niveaux variables les gènes codant les enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides complexes. Les cellules de cancers du sein MDA-MB-231 GD3S+ sont stablement transfectées avec *ST8SIA* (GD3 synthétase, GD3S), des hauts niveaux de *ST8SIA1* ont donc été reportées dans ces cellules en comparaison aux cellules MDA-MB-231 Mock (Cavdarli *et al.*, 2020). Nos résultats de RT-qPCR le confirment (Figure 28 A, barres grises, panel de gauche). Parmi les lignées de neuroblastome, les cellules Kelly sont celles qui ont une

expression plus élevée de *ST8SIA1* (Figure 28 A, barres vertes, panel de gauche). Nous observons que les gliomes pédiatriques ont les plus hauts niveaux d'expression de *ST8SIA1* parmi tous les types cellulaires étudiés (Figure 28 A, barres jaunes, panel de gauche). Les niveaux d'expression de β 4*GALNT1* sont plus élevés dans les cellules de neuroblastome, de glioblastome et de gliome pédiatrique que dans les cellules de cancers du sein avec des taux d'expression jusqu'à 10 fois supérieurs (Figure 28 A, panel du milieu). La sialate-O-acétyltransférase *CASD1* est exprimée dans toutes les cellules cancéreuses étudiées avec une plus forte expression dans les cellules de neuroblastome Kelly et dans les cellules de gliome pédiatrique DIPG12 et DIPG14 (Figure 28 A, panel de droite).

Par immunohistochimie et microscopie confocale, nous avons étudié en parallèle l'expression du GD2 et d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 Mock, MDA-MB-231 GD3S+, dans les cellules de neuroblastome Kelly, dans les cellules de glioblastome U87MG et dans les cellules de gliome pédiatrique DIPG13, qui présentent une expression élevée des gènes clés de biosynthèse de gangliosides complexes. Nous observons des hauts niveaux de GD2 et d'OAcGD2 dans les lignées de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+, de neuroblastome Kelly et de gliomes pédiatriques DIPG13 (Figure 28 B), en corrélation avec nos résultats de RT-qPCR.

De toutes les lignées testées, les plus hauts niveaux d'expression de *ST8SIA1*, *B4GALNT1* et *CASD1* ont été retrouvés dans les gliomes pédiatriques DIPG12, DIPG13, DIPG14. A cause de la difficulté voire l'impossibilité à transfecter les cellules DIPG par lipofection, nous avons choisi d'étudier l'impact de l'inhibition de *CERK* ou *PIK3C2A* sur l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ dans lesquelles le criblage à haut débit a été effectué (figure 19) et les cellules de neuroblastome Kelly qui présentaient, après les DIPG, la plus forte expression des enzymes de biosynthèse d'OAcGD2 (Figure 28 A).

2.3. Effet de l'inhibition de *PIK3C2A* sur l'expression d'OAcGD2

2.3.1. Inhibition de *PIK3C2A* par siARN

Afin de confirmer les résultats obtenus avec le RNAi screen à haut débit dans les MDA-MB-231 GD3S+ (Figure 19), nous avons inhibé *PIK3C2A* par différents siARN. Nous avons utilisé

le siARN *PIK3C2A* smart pool (siPIK3C2A SP) qui a été utilisé dans l'étude de criblage à haut débit réalisée à Singapour, et les siARN *PIK3C2A* individuels (siPIK3C2A 1, siPIK3C2A 2, siPIK3C2A 3 et siPIK3C2A 4).

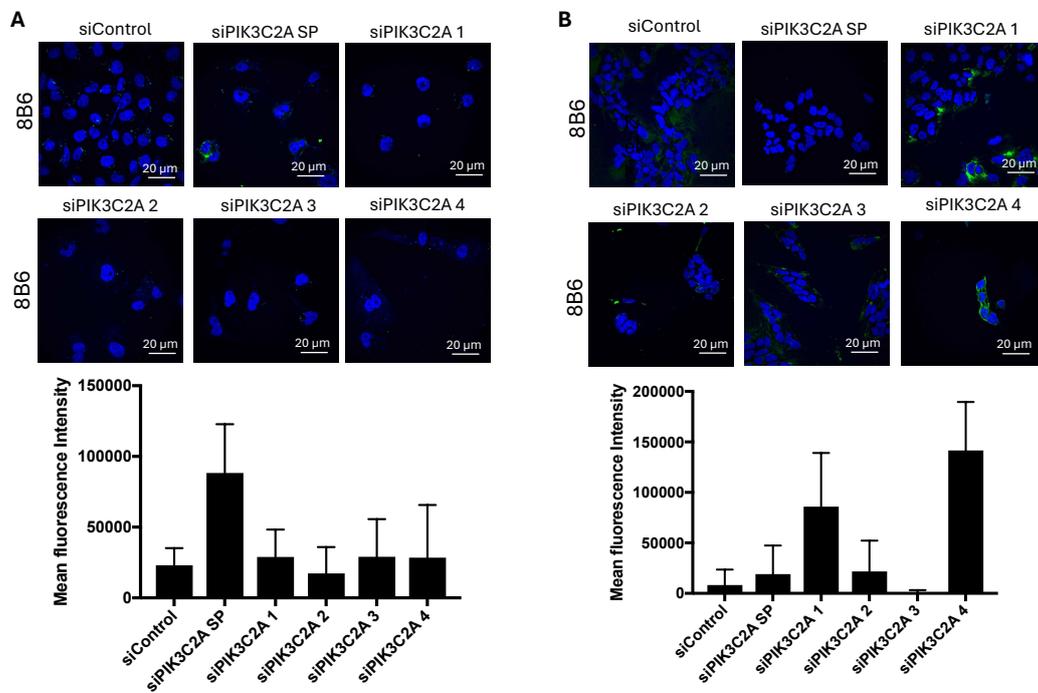


Figure 29 : Effet de l'inhibition de *PIK3C2A* par siARN sur l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ et les cellules de neuroblastome Kelly

Inhibition de *PIK3C2A* par siRNA smart pool (siPIK3C2A SP) et siARN individuels (siPIK3C2A 1, siPIK3C2A 2, siPIK3C2A 3, siPIK3C2A 4) (A) Images de microscopie confocale des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ transfectées avec les différents siARN ciblant *PIK3C2A* et l'histogramme correspondant aux moyennes de fluorescence observées. (B) Images de microscopie confocale des cellules de neuroblastome Kelly transfectées avec les différents siARN *PIK3C2A* et l'histogramme correspondant aux moyennes de fluorescence observées. L'OAcGD2 est marqué en vert, les noyaux sont marqués en bleu et visualisés par microscopie confocale. La quantification de la fluorescence est faite par une macro ImageJ « faite maison » (n=3).

L'utilisation du siPIK3C2A SP induit une augmentation de l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+, comme observé par Sumeyye Cavdarli en 2019. En revanche, l'inhibition transcriptionnelle par les siPIK3C2A individuels n'a pas confirmé d'augmentation d'expression d'OAcGD2 dans ces mêmes cellules par rapport au siControl (Figure 29 A). L'inhibition de *PIK3C2A* dans les cellules de neuroblastome Kelly a montré une faible augmentation de l'expression d'OAcGD2 avec le siPIK3C2A SP. Une forte augmentation de l'expression d'OAcGD2 lorsque *PIK3C2A* est inhibé avec siPIK3C2A 1 et siPIK3C2A 4 a été visualisée dans les cellules Kelly (Figure 29 B).

Pour valider l'effet de l'inhibition d'un gène sur l'expression d'OAcGD2, au moins 2 siARN individuels doivent avoir un effet. Ici, nous n'observons pas de résultats concluants dans les cellules de cancer du sein contrairement aux cellules de neuroblastome. Nous avons poursuivi cette étude en inhibant PIK3C2A au niveau protéique par un inhibiteur pharmacologique, le PIK90.

2.3.2. Inhibition de PIK3C2A par PIK90

Un inhibiteur pharmacologique, PIK90, ciblant *PIK3C2A* a été utilisé. Cet inhibiteur a montré un effet sur la cytotoxicité dans les cellules de cancer triple négatif SUM149PT à 72 h de traitement à une concentration de 3 μ M (Yi *et al.*, 2013). Nous avons utilisé PIK90 à différents temps dans les deux lignées cellulaires précédemment utilisées à la concentration de 3 μ M afin de déterminer les meilleurs paramètres pour observer une augmentation d'OAcGD2 maximale. Cependant, PIK90 n'est pas spécifique de PIK3C2A, il inhibe d'autres PIK comme PI3K α , PI3K γ , PI3K δ , PI3KC2b, PI3K β , ce qui peut modifier l'effet attendu de l'inhibition de PIK3C2A sur l'expression d'OAcGD2.

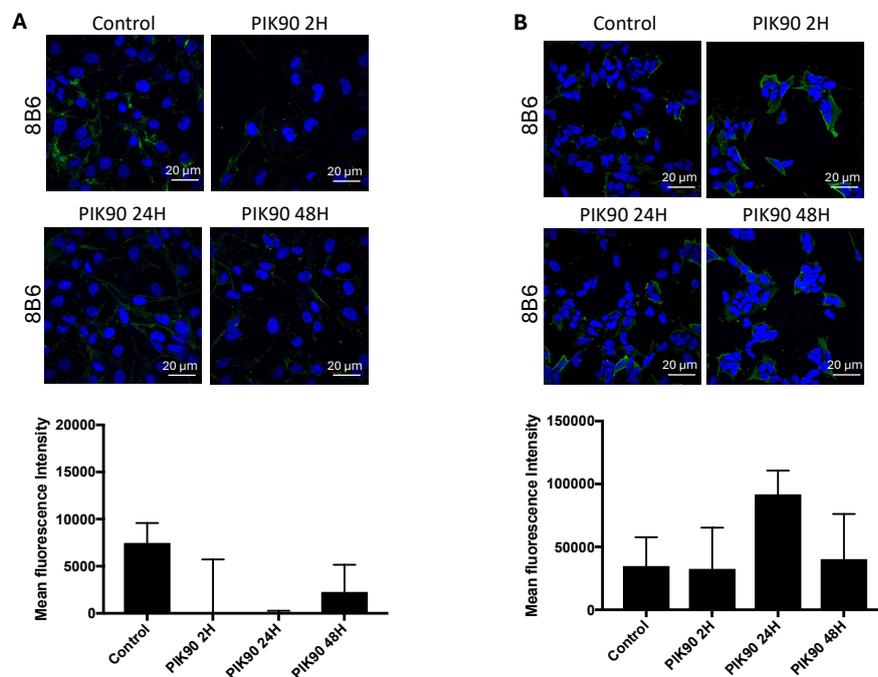


Figure 30 : Effet de l'inhibition de *PIK3C2A* par l'inhibiteur PIK90 sur l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ (A) et les cellules de neuroblastome Kelly (B).

(A) Images par microscopie confocale des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ lorsque PIK3C2A est inhibée par PIK90 et l'histogramme correspondant aux moyennes de fluorescence observées. (B) Images de microscopie confocale des cellules de neuroblastome Kelly lorsque PIK3C2A est inhibée par PIK90, et l'histogramme correspondant aux moyennes de fluorescence observées. L'inhibition de PIK3C2A a été réalisée à l'aide de l'inhibiteur PIK90 à 3 μ M à différents temps : 2 h, 24 h, 48 h. L'OAcGD2 est marqué en vert, les noyaux sont marqués en bleu et visualisé par microscopie confocale. La quantification de la fluorescence est réalisée en utilisant une macro ImageJ « faite maison » (n=3).

Nous avons d'abord utilisé l'inhibiteur de PIK3C2A, PIK90, sur une cinétique courte, c'est-à-dire 2 h, 4 h, 6 h et 8 h. L'inhibition de PIK3C2A entraîne une inhibition de l'expression d'OAcGD2, et pas une augmentation. Nous avons alors entrepris d'étudier l'inhibition de PIK3C2A sur des temps plus longs, c'est-à-dire 24 h et 48 h. L'inhibition d'OAcGD2 se poursuit à 24 h dans les MDA-MB-231 GD3S+ avec une augmentation au bout de 48 h (Figure 30 A). Cette augmentation ne revient pas à des niveaux basaux comme observé dans la condition contrôle. Par contre, dans la lignée de neuroblastome Kelly, les résultats montrent une augmentation d'OAcGD2 à 24 h de traitement avec PIK90, puis une diminution à 48 h avec un retour aux niveaux de base (Figure 30 B).

Les résultats d'inhibition de PIK3C2A par les siARN dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ ne confirment pas les observations faites par Sumeyye Cavdarli. Il en est de même pour les résultats obtenus avec l'inhibiteur pharmacologique PIK90. Les résultats n'étant pas reproductibles et différents selon la lignée cellulaire utilisée, nous avons décidé pour la suite du projet de ne pas poursuivre les études sur PIK3C2A.

2.4. Effet de l'inhibition de *CERK* sur l'expression d'OAcGD2

2.4.1. Inhibition de *CERK* par siARN

Pour valider les conclusions issues du criblage à haut débit par RNAi dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ (voir Figure 19), nous avons employé différents siARN pour inhiber *CERK*. Nous avons utilisé à la fois le siCERK SP, qui avait été précédemment utilisé lors du criblage à haut débit, ainsi que des siARN *CERK* individuels (siCERK 1, siCERK 2, siCERK 3 et siCERK 4).

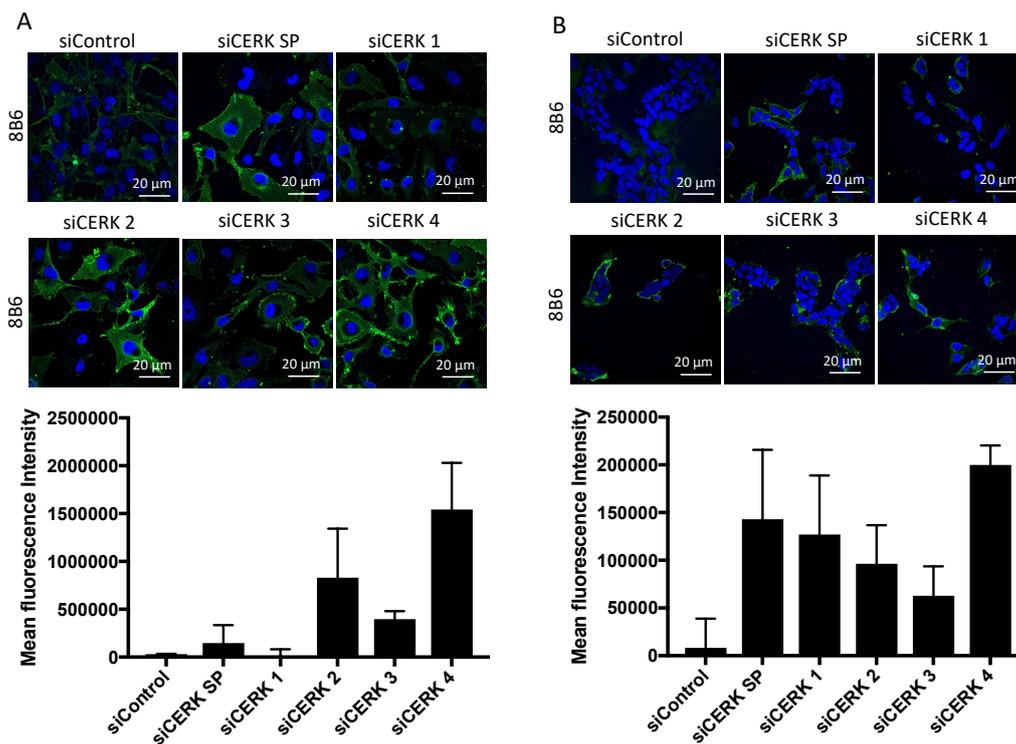


Figure 31 : Effet de l'inhibition de *CERK* par siARN sur l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ (A) et les cellules de neuroblastome Kelly (B).

(A) Images par microscopie confocale des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ transfectées avec les différents siARN *CERK* (siARN smart pool (siCERK SP) et siARN individuels (siCERK 1, siCERK 2, siCERK 3, siCERK 4) ; l'histogramme correspondant aux moyennes de fluorescence observées. (B) Images de microscopie confocale des cellules de neuroblastome Kelly transfectées avec les différents siARN *CERK* et l'histogramme correspondant aux moyennes de fluorescence observées. L'OAcGD2 est marqué en vert, les noyaux sont marqués en bleu. La quantification de la fluorescence est réalisée en utilisant une macro ImageJ « faite maison » (n=3).

Nos résultats ont montré que l'inhibition de *CERK* avec les siARN *CERK* SP et individuels dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ augmentent l'expression d'OAcGD2 (Figure 31 A). Cette augmentation est nettement plus forte lorsque *CERK* est inhibé avec siCERK2 ou siCERK4. De la même manière, nous observons une augmentation de l'expression d'OAcGD2 lorsque *CERK* est inhibé dans les cellules de neuroblastome Kelly avec les siARN *CERK* SP ou individuels (Figure 31 B). Ces données sont cohérentes avec les résultats du criblage par SiARN à haut débit effectué par Sumeyye Cavdarli en 2019 (Figure 19).

2.4.2. Inhibition de *CERK* par le NVP231

L'effet de l'inhibition de *CERK* sur la *O*-acétylation du GD2 a aussi été évaluée à l'aide d'un inhibiteur chimique spécifique, le NVP231 à différents temps afin d'évaluer au mieux la variation d'expression d'OAcGD2.

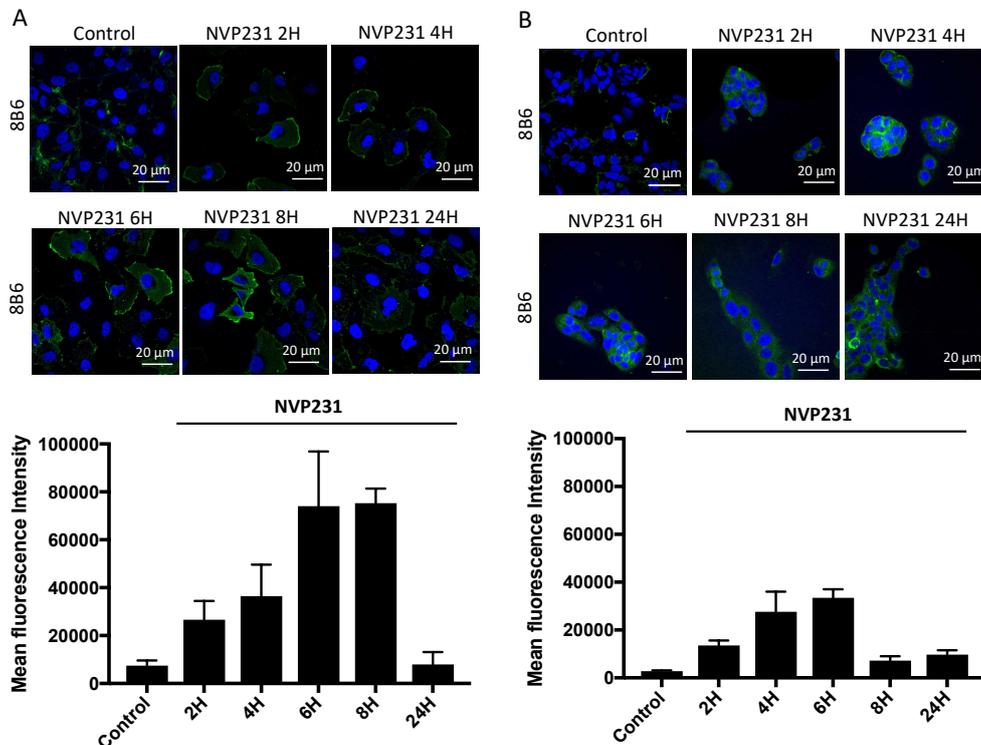


Figure 32 : Effet de l'inhibition de *CERK* par le NVP231 sur l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ (A) et les cellules de neuroblastome Kelly (B).

(A) Images de microscopie confocale des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ lorsque *CERK* est inhibé avec le NVP231 et l'histogramme correspondant aux moyennes de fluorescence observées. (B) Images de microscopie confocale des cellules de neuroblastome Kelly et l'histogramme correspondant aux moyennes de fluorescence observées. L'inhibition de *CERK* a été réalisée à l'aide de l'inhibiteur chimique NVP231 à 1 µM à différents temps : 2 h, 4 h, 6 h, 8 h et 24 h. L'OAcGD2 est marqué en vert, les noyaux sont marqués en bleu et visualisés par microscopie confocale. La quantification de la fluorescence est réalisée en utilisant une macro ImageJ « faite maison » (n=3).

La cinétique de traitement au NVP231 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ (figure 32 A) et de neuroblastome Kelly (figure 32 B) nous permet d'observer une augmentation de l'expression d'OAcGD2 au cours du temps. Cette augmentation est maximale entre 6 et 8 h de traitement dans les 2 lignées cellulaires (figure 32 A et B).

L'objectif de ma thèse était de mettre en évidence de nouveaux gènes impliqués dans la biosynthèse d'OAcGD2 afin de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. Celles-ci reposent sur une augmentation de l'expression d'OAcGD2 par inhibition de gènes

impliqués dans sa biosynthèse afin d'augmenter l'efficacité de stratégies d'immunothérapie ciblant l'OAcGD2. Les résultats obtenus concernant l'inhibition de *PIK3C2A* avec les siARN étant contradictoires avec l'analyse faite par Sumeyye Cavdarli en 2019, et l'inhibiteur PIK90 n'étant pas spécifique au *PIK3C2A*, nous avons choisi de poursuivre la stratégie d'inhibition de *CERK*. Nos résultats montrent que l'augmentation d'expression d'OAcGD2 par induite par inhibition de *CERK* ne dépend pas du type cellulaire, puisque nous obtenons des résultats concordants dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 et dans les cellules de neuroblastome Kelly, par siARN et inhibiteur spécifique.

Dans le cancer du sein et d'autres cancers d'origine neuro-ectodermiques, les gangliosides complexes comme le GD2 jouent un rôle clé dans l'agressivité tumorale, en modulant des voies de signalisation liées à la prolifération, la migration, l'angiogenèse. Néanmoins, les outils et techniques utilisées lors de ces nombreuses études ne permettent pas de discriminer le GD2 d'OAcGD2, et les rôles biologiques d'OAcGD2 ne sont pas connus, tout comme l'impact de sa surexpression sur les cellules cancéreuses. Un point crucial de cette étude est donc de déterminer l'effet de l'augmentation d'expression d'OAcGD2 par inhibition de *CERK* sur les propriétés malignes des cellules tumorales. Pour répondre à cette question, nous avons choisi d'utiliser l'inhibiteur spécifique NVP231 ainsi que les siCERK SP, siCERK 2 et siCERK 4 qui ont démontré les meilleurs résultats sur l'expression d'OAcGD2 à la fois dans les cellules de cancer du sein et de neuroblastome (Figure 31). L'étude a été réalisée dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ formant plus facilement un tapis cellulaire contrairement aux cellules de neuroblastome Kelly qui poussent en îlots.

2.5. Etude de l'inhibition de *CERK* sur les capacités de migration des cellules de cancer du sein

L'effet de l'augmentation d'expression d'OAcGD2 induite par une inhibition de *CERK* sur les propriétés biologiques des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ a été évaluée grâce au test de migration en chambres de Boyden et par des tests de blessure.

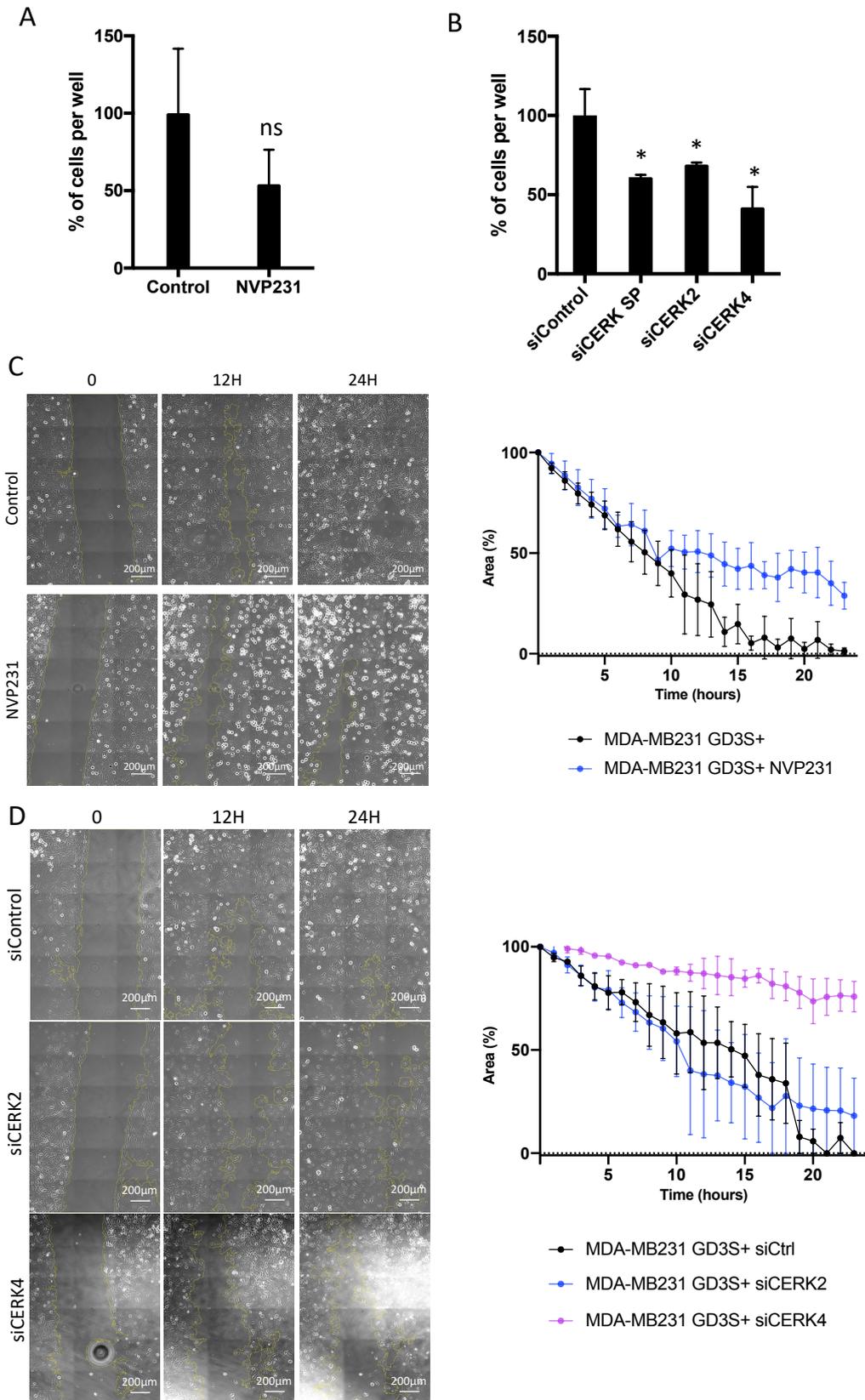


Figure 33 : Effet de l'inhibition de CERK analysé sur la migration cellulaire, étudiée par utilisation de chambres de Boyden (A et B) et tests de blessures (C et D).

(A et B) Pourcentage de cellules MDA-MB-231 GD3S+ traitées au NVP231 (A) ou transfectées avec le siControl ou des siRNA *CERK* SP ou individuels (B) migrant à travers les pores des chambres de Boyden. (C et D) Panels de gauche : Images représentatives de 3 points (0, 12 h and 24 h) et détection de la blessure associée (Région d'intérêt en jaune). Panel de droite : moyennes des zones de blessure calculées pour chaque point. (C) MDA-MB-231 GD3S+ traitées avec le NVP231 (D) MDA-MB-231 GD3S+ transfectées avec le siRNA Control, siRNA *CERK* 2 et siRNA *CERK* 4 (n=3).

Les résultats de la figure 32 A ont montré une augmentation maximale d'expression d'OAcGD2 dans les MDA-MB-231 GD3S+ lorsque *CERK* est inhibée après 6 h de traitement au NVP231. Nous avons donc étudié la migration des cellules en chambre de Boyden lorsque les cellules MDA-MB-231 GD3S+ sont traitées pendant 6 h avec le NVP231 (Figure 33 A). Les capacités de migration des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ ont également été étudiées lorsque *CERK* est inhibée avec les siCERK SP, siCERK 2 et siCERK 4 (Figure 33 B). Nous observons dans les deux cas que l'inhibition de *CERK* par le NVP231 ou les différents siARN diminue les capacités de migration des cellules de cancer du sein (Figure 33 A et B). L'effet de l'inhibition de *CERK* sur les propriétés biologiques des cellules a également été évalué par des tests de blessure (Figure 33 C et D). Nous observons que la fermeture de la blessure est plus lente lorsque *CERK* est inhibée par le NVP231 (Figure 33 C) et les siCERK2 et siCERK4 (Figure 33 D). A 24 h post blessure, la fermeture n'est pas complète pour les cellules MDA-MB-231 GD3S+ dans lesquelles *CERK* est inhibée en comparaison aux contrôles associés (Figure 33 C et D).

Cette étude montre que l'inhibition de *CERK* et donc l'augmentation d'OAcGD2 ne rend pas les cellules tumorales plus agressives en termes de migration, ce qui en fait une cible thérapeutique d'intérêt. Nous avons ensuite étudié si cette diminution de migration pourrait être liée à l'induction de l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires, puisque l'inhibition de *CERK* pourrait entraîner des niveaux augmentés de céramide, molécule pro-apoptotique (Payne *et al.*, 2014).

2.6. Etude de l'inhibition de *CERK* sur l'induction de l'apoptose dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+

Afin de définir si la diminution des capacités de migration des MDA-MB-231 GD3S+ après inhibition de *CERK* sont associées à une induction de l'apoptose, nous avons étudié par

western blot l'expression de la caspase 3 clivée ainsi que PARP clivée comme marqueurs apoptotiques. Nous avons également traité les cellules MDA-MB-231 GD3S+ avec la staurosporine pendant 6 h à 1 μ M, un inducteur d'apoptose qui sert de témoin positif.

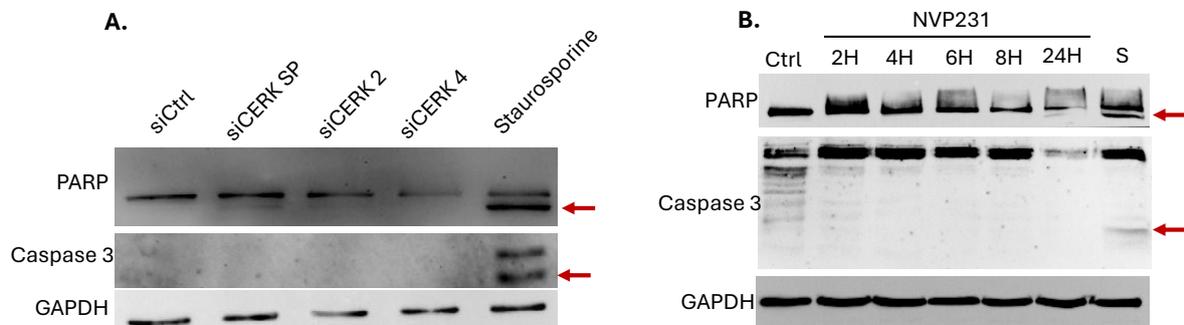


Figure 34 : Etude de l'inhibition de CERK sur l'induction de l'apoptose dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+.

A. Expression de PARP et de la caspase 3 dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ transfectées avec le siRNA Control (siCtrl), siRNA *CERK* smart pool (SP), siRNA *CERK* 2 (siCERK2) et siRNA *CERK* individuel 4 (siCERK4) B. Expression de PARP et de la caspase 3 dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ traitées avec le NVP231 pendant différents temps : 2, 4, 6, 8, 24 h, ou avec la staurosporine à 1 μ M pendant 6 h (S). Les flèches rouges indiquent les formes clivées et donc actives de PARP et de la caspase 3 (n=3).

Les formes actives de la caspase 3 et de PARP sont exprimées dans la condition contrôle dans laquelle les MDA-MB-231 GD3S+ sont traitées avec la staurosporine, un inducteur d'apoptose. En effet, on observe la forme clivée de PARP à 116 kDa et 86 kDa ainsi que la forme clivée de la caspase 3 à 34 et 19 kDa. En revanche, aucun marqueur d'apoptose n'a été observé par western blot lorsque les cellules ont été traitées avec les siARNSP, siCERK2 et siCERK4 (Figure 34 A) ou le NVP231 (Figure 34 B). Ces résultats indiquent que l'apoptose n'est pas induite lorsque CERK est inhibée dans les conditions de notre étude (Figure 34 A et B).

Nos résultats montrent donc que l'inhibition de CERK diminue la migration des cellules MDA-MB-231 GD3S+ tout en augmentant l'expression d'OAcGD2, sans induire l'apoptose. La société OGD2 Pharma développe des anticorps anti-OAcGD2 pour l'immunothérapie des cancers. La suite du projet est d'évaluer le potentiel cytotoxique de l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 sur différents modèles de cellules cancéreuses et d'évaluer si l'inhibition de CERK qui augmente l'OAcGD2 à la surface cellulaire pourrait augmenter l'efficacité cytotoxique des anticorps anti-OAcGD2.

2.7. Etude de la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps anti-OAcGD2 médiée par les cellules NK

L'activité effectrice des anticorps est un mécanisme important contre les cellules cancéreuses. La cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps ou ADCC est le mécanisme principal impliqué dans la cytotoxicité de l'anticorps anti-OAcGD2 8B6 dans des cellules de neuroblastomes et de glioblastomes (Terme *et al.*, 2014; Fleurence *et al.*, 2016).

Nous avons évalué l'activité antitumorale de l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 produit par la société OGD2 Pharma en comparaison à l'anticorps anti GD2 ch14.18 (bioanalogue du dinutuximab) mis sur le marché et utilisé pour le traitement des neuroblastomes. Nous avons réalisé cette étude dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ et dans une autre lignée cellulaire présentant une expression élevée du ganglioside OAcGD2 : la lignée de gliome pédiatrique DIPG13 (figure 28).

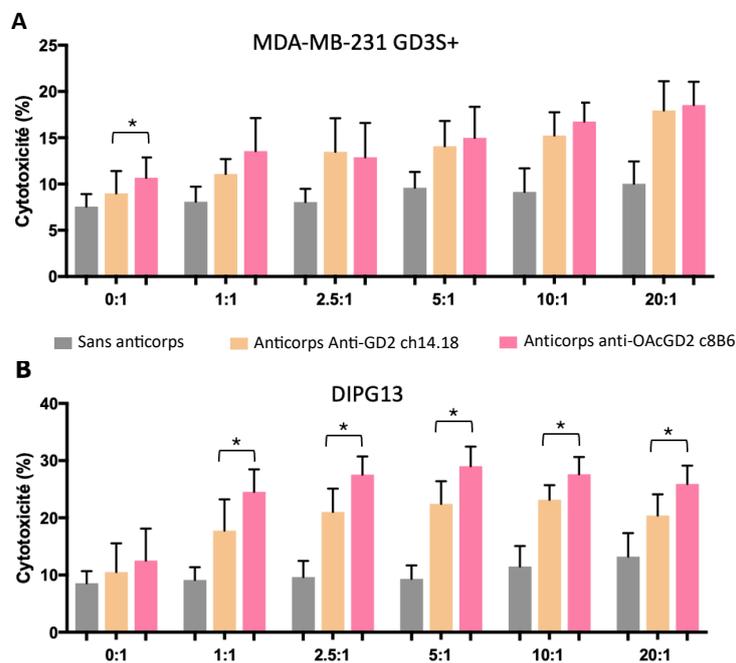


Figure 35 : Taux de cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps médiée par les cellules effectrices NK dans les cellules de cancer du sein et les cellules de gliome pédiatrique

(A) Les cellules MDA-MB-231 GD3S+ ont été traitées avec l'anticorps anti-GD2 ch14.18 (barres orange) ou l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 (barres roses) en co-culture avec les cellules NK à différents ratio cellules effectrices : cellules cibles (de 0:1 à 20:1). (B) Les cellules DIPG13 ont été traitées avec l'anticorps anti-GD2 ch14.18 (barres orange) ou l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 (barres roses) en

coculture avec les cellules NK à différents ratio cellules effectrices : cellules cibles (de 0 :1 à 20 :1). *
p≤0,05 (n=3)

La mortalité des cellules cancéreuses MDA-MB-231 GD3S+ (Figure 35 A) est augmentée lorsque les cellules sont traitées par anticorps anti-GD2 ch14.18 ou anti-OAcGD2 c8B6 en comparaison aux conditions sans anticorps. La cytotoxicité augmente lorsque le ratio cellules effectrices : cellules cibles augmente. Les résultats avec les DIPG13 (Figure 35 B) démontrent une meilleure cytotoxicité des anticorps anti-GD2 ch14.18 et anti-OAcGD2 c8B6 par rapport à celle observée avec les MDA-MB-231 GD3S+. Ces résultats mettent en évidence pour la première fois que l'anticorps anti-OAcGD2 est plus efficace que l'anticorps anti-GD2, induisant une mort cellulaire augmentée de 10% dans les cellules DIPG13 pour tous les ratios cellules effectrices : cellules cibles, et pour les cellules MDA-MB-231 GD3S+ aux ratio 1 :1 et 10 :1.

Notre stratégie thérapeutique est d'augmenter l'OAcGD2 à la surface des cellules en inhibant CERK via l'inhibiteur pharmacologique spécifique, le NVP231, afin d'améliorer l'efficacité de l'immunothérapie anti-OAcGD2. Nous avons donc entrepris des tests ADCC combinant le traitement au NVP231 et l'immunothérapie anti-OAcGD2.

2.8. Etude de combinaisons thérapeutiques pour le traitement de cancers d'origine neuroectodermique ciblant *CERK* et l'OAcGD2

2.8.1. Etude par cytométrie en flux de l'inhibition de *CERK* sur l'expression d'OAcGD2

L'étude par immunohistochimie et microscopie confocale de l'inhibition de CERK par le NVP231 sur l'expression d'OAcGD2 a été réalisée jusqu'à cette étape des travaux dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ et les cellules de neuroblastomes Kelly. Il était intéressant de connaître si l'inhibition de CERK par le NVP231 augmente l'OAcGD2 dans les cellules de gliome pédiatrique DIPG13. Nous avons étudié l'expression d'OAcGD2 à la surface des cellules lorsque CERK est inhibé par le NVP231 à 1 µM par cytométrie en flux.

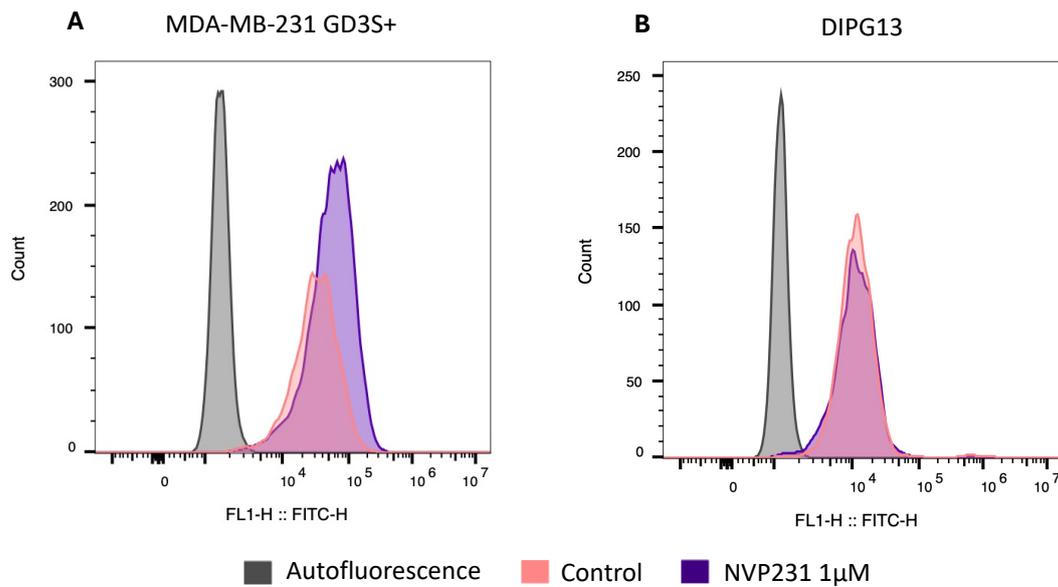


Figure 36 : Etude de l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ et de gliome pédiatrique DIPG13 lorsque CERK est inhibé par le NVP23.

(A) Analyse par cytométrie en flux des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ traitées ou non avec le NVP231 à 1 μ M puis marquées avec l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6. (B) Analyse par cytométrie en flux des cellules de gliome pédiatrique DIPG13 traitées ou non avec le NVP231 à 1 μ M pendant 6 h puis marquées avec l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6.

Les cellules de cancer du sein et de gliomes pédiatriques ont été traitées pendant 6 h avant l'analyse par cytométrie en flux (Figure 36 A et B). Comme observé précédemment (Figure 32A), dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+, le NVP231 augmente l'expression d'OAcGD2 à la surface cellulaire (Figure 36 A). Le traitement par le NVP231 des cellules de gliomes pédiatriques DIPG13 n'augmente pas l'OAcGD2 à la surface des cellules par rapport aux cellules contrôles non traitées. Il est possible qu'il ne soit pas possible d'augmenter l'expression d'OAcGD2 par l'inhibition de CERK dans ces cellules que parce que les cellules DIPG13 expriment des niveaux naturellement très élevés des enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides complexes, et d'OAcGD2 en particulier (Figure 36).

2.8.2. Etude de la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps anti-OAcGD2 médiée par les cellules NK ; effet de l'inhibition de CERK.

Au vu de nos résultats qui confirment que l'inhibition de CERK renforce l'expression d'OAcGD2, notre hypothèse est que bloquer l'activité de CERK pourrait être une approche efficace pour renforcer la réponse des cellules tumorales à l'anticorps anti-OAcGD2. Cela

pourrait améliorer l'efficacité du traitement ciblant l'OAcGD2 dans les cancers. Nous avons donc étudié l'activité ADCC de l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 couplé à l'inhibition de CERK par le NVP231 dans les cellules de cancer du sein et de gliome pédiatrique.

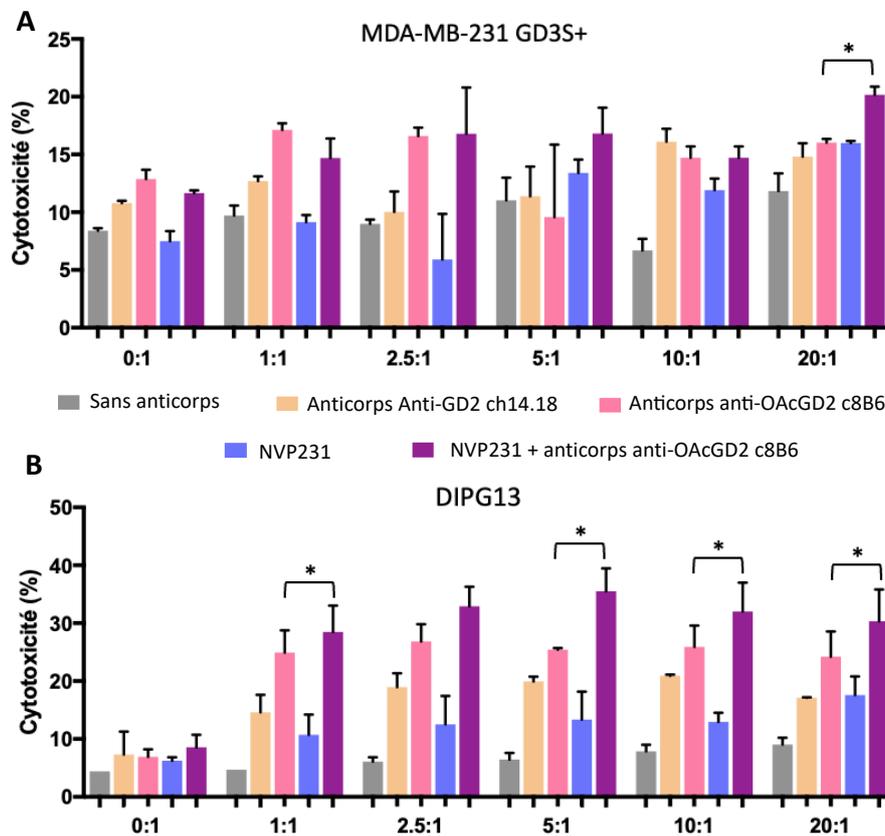


Figure 37 : Etude de l'effet de combinaison thérapeutique ciblant CERK et l'OAcGD2 sur la cytotoxicité des cellules de cancer du sein et de gliome pédiatrique

(A) Les cellules MDA-MB-231 GD3S+ ont été traitées avec l'anticorps anti-GD2 ch14.18 ou l'anticorps anti-OAcGD2 avec les cellules NK à différents ratio cellules effectrices : cellules cibles (de 0 :1 à 20 :1). Les cellules MDA-MB-231 GD3S+ ont été traitées avec le NVP231 à 1 μ M seul ou en combinaison avec l'anticorps anti-OAcGD2. (B) Les cellules DIPG13 ont été traitées avec l'anticorps anti-GD2 ch14.18 ou l'anticorps anti-OAcGD2 avec les cellules NK à différents ratio cellules effectrices : cellules cibles (de 0:1 à 20:1). Les cellules DIPG13 ont été traitées avec le NVP231 à 1 μ M seul ou en combinaison avec l'anticorps anti-OAcGD2. * $p \leq 0,05$ (n=3)

Nous avons testé l'inhibiteur NVP231 en présence des cellules effectrices NK. Nos résultats mettent en évidence une augmentation modérée de la mort cellulaire après inhibition de CERK dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ visible à partir du ratio de 10 :1 et dans les cellules de gliome pédiatrique à tous les ratios cellules effectrices : cellules cibles. Le traitement combiné du NVP231 avec l'anticorps anti-OAcGD2 augmente la mort cellulaire des cellules MDA-MB-231 GD3S+ au ratio 20 :1 (Figure 37 A). Cette

augmentation est beaucoup plus importante pour tous les ratios cellules effectrices : cellules cibles dans les DIPG13 (Figure 37 B).

Nos résultats montrent donc que l'inhibition de CERK potentialise l'immunothérapie ciblant l'OAcGD2. Nous avons ensuite testé une autre stratégie visant à augmenter l'expression d'OAcGD2 afin de rendre les cellules cancéreuses plus sensibles à l'immunothérapie ciblée : l'utilisation d'inhibiteurs d'histones désacétylases (HDAC).

2.9. Etude d'autres combinaisons thérapeutiques ciblant les HDAC et l'OAcGD2 pour le traitement de cancers d'origine neuroectodermique

L'inhibition de HDAC par le vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) augmente l'expression du GD2 dans des cellules de neuroblastome (van den Bijgaart *et al.*, 2020). Le SAHA est un inhibiteur de HDAC de classe I et II, approuvé par la FDA pour le traitement de lymphome cutané à cellules T (Bubna, 2015). Les HDAC clivent les groupements acétyle sur les lysines des histones ce qui modifie la régulation de l'expression génique. Il a été récemment démontré que la thérapie combinée de l'anticorps anti-GD2 avec le vorinostat est extrêmement efficace pour supprimer la croissance de cellules de neuroblastome en modèle murin, avec une augmentation notable de la survie (Kroesen *et al.*, 2016). Comme le GD2 et l'OAcGD2 semblent être exprimés de manière concomitante dans la plupart des cancers, nous avons testé l'action du SAHA seul ou en combinaison avec l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6.

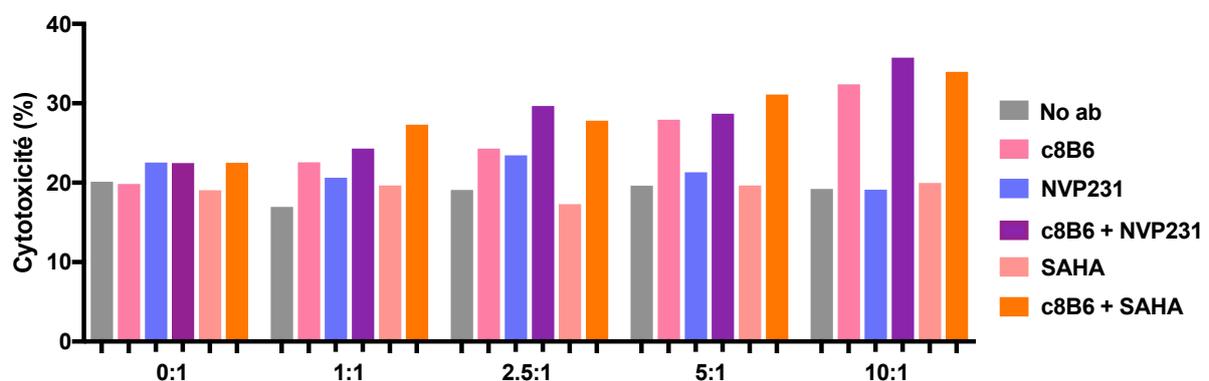


Figure 38 : Etude de l'effet de combinaison thérapeutique ciblant les HDAC et l'OAcGD2 sur la cytotoxicité des anticorps anti-OAcGD2 sur des cellules du cancers du sein MDA-MB-231 GD3S+. Les cellules MDA-MB-231 GD3S+ ont été traitées avec l'anticorps anti-OAcGD2, le NVP231 ou le SAHA seuls ou en combinaisons. L'étude a été réalisée à différents ratio cellules effectrices NK : cellules cibles (de 0 :1 à 10 :1). Cette expérience a été réalisée une seule fois.

Nos premières expériences réalisées dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ montrent que le SAHA seul n'a pas d'activité cytotoxique sur les cellules quel que soit le ratio "cellules effectrices : cellules cibles" utilisé. En revanche, en combinaison avec l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6, la mortalité des cellules augmente par rapport à l'utilisation de l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 seul. De manière générale, les résultats des différents ratio utilisés, nous observons que la cytotoxicité via l'utilisation de la combinaison SAHA + c8B6 est aussi efficace que la combinaison NVP231 + c8B6 (Figure 38). Ces résultats, bien qu'étant préliminaires, sont très prometteurs pour confirmer l'hypothèse d'une stratégie visant à augmenter l'expression d'OAcGD2 à la surface des cellules afin de potentialiser l'immunothérapie anti-OAcGD2.

3. Conclusion

Le criblage à haut débit permettant d'étudier le phosphatome/kinome des cellules de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231 GD3S+, a permis l'identification de 43 gènes impliqués dans l'expression d'OAcGD2. L'étude approfondie des différents gènes nous a permis d'en sélectionner deux, étroitement liés de la biosynthèse des gangliosides et à la biologie des cellules cancéreuses, augmentant fortement l'expression d'OAcGD2 lorsqu'ils sont inhibés : *PIK3C2A* et *CERK*. Par des stratégies d'inhibition utilisant des siARN SP et individuels ou un inhibiteur pharmacologique, le NVP231, nous avons confirmé l'implication de *CERK* dans l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ et dans les cellules de neuroblastome Kelly. En revanche, l'inhibition de *PIK3C2A* n'a pas confirmé les résultats obtenus par Sumeyye Cavdarli dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+. Du fait de l'hétérogénéité des résultats concernant l'inhibition de *PIK3C2A*, nous avons choisi de favoriser une stratégie d'inhibition ciblant *CERK*. Les rôles biologiques du OAcGD2 n'étant pas clairement définis, nous aurions pu supposer que l'augmentation d'OAcGD2 dans les cellules cancéreuses pourrait les rendre plus agressives. A l'aide des techniques en chambre de Boyden et tests de blessure, nous avons constaté que l'inhibition de *CERK* et l'expression élevée d'OAcGD2 n'augmentent pas l'agressivité des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+, mais au contraire diminue leur migration. Ces résultats

encourageants nous ont permis de développer une stratégie thérapeutique permettant de cibler CERK pour augmenter l'expression d'OAcGD2 afin de mieux le cibler par immunothérapie anti-OAcGD2. Par des tests ADCC, nous avons montré que l'anticorps anti-OAcGD2 était plus efficace que l'anticorps anti-GD2 approuvé par la FDA, mais aussi que l'inhibition de CERK par le NVP231 couplée à l'anticorps anti-OAcGD2 augmente la mortalité des cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ et de gliome pédiatrique DIPG13. Nous discuterons des résultats et des perspectives après avoir présenté le projet annexe qui suit.

Projet annexe : Etude du profil gangliosidique de lignées d'ostéosarcomes : lien avec la résistance à la doxorubicine.

1. Introduction

Selon le rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) établi en 2011, l'ostéosarcome représente 2,4 % des cancers pédiatriques. Parmi toutes les tumeurs osseuses malignes primitives, les ostéosarcomes se distinguent en tant que les plus fréquents, représentant jusqu'à 35 % des cas. Les ostéosarcomes touchent principalement les enfants, les adolescents et les jeunes adultes avec un pic d'incidence à 18 ans (Mirabello *et al.*, 2009). Il existe un second pic après 60 ans correspondant à des ostéosarcomes découlant d'une pathologie. En France, 150 nouveaux cas sont déclarés chaque année.

L'ostéosarcome est caractérisé par la production d'os dit ectopique. Les ostéosarcomes sont divisés en trois sous-types : les ostéosarcomes de surfaces avec un bon pronostic, les ostéosarcomes intra-corticaux, très rares et les ostéosarcomes intra-médullaires qui sont les plus agressifs. Les sites préférentiels se situent aux extrémités des os longs notamment au niveau du tibia, du fémur, de l'humérus, c'est-à-dire au niveau des zones de croissance rapide. Le taux de survie à 5 ans est compris entre 60 et 70% lorsque la tumeur se trouve localisée. Malheureusement ces tumeurs sont le plus souvent détectées tardivement et les patients atteints de métastases, pulmonaires majoritairement, ont un taux de survie qui chute à 20% sur 5 ans.

Le traitement de l'ostéosarcome consiste en une polychimiothérapie néo-adjuvante, une chirurgie d'exérèse puis une chimiothérapie adjuvante. La polychimiothérapie comprend le méthotrexate à haute dose (Jaffe *et al.*, 1973), la doxorubicine (aussi appelé adriamycine) (Cores *et al.*, 1972), le ciplastine (Gasparini *et al.*, 1985) et l'ifosfamide (Marti *et al.*, 1985). Le méthotrexate inhibe la synthèse de l'acide folique permettant la synthèse des bases puriques et thymidine, inhibant la synthèse de l'ADN. La doxorubicine est un agent intercalant de l'ADN, il inhibe l'activité de la topoisomérase II qui modifie l'enroulement de l'ADN. La doxorubicine est cardiotoxique. En conséquence, des agents antioxydants sont utilisés conjointement à la doxorubicine pour leur effet cardioprotecteur (Valcovici *et al.*, 2016). Le cisplatine inhibe la réplication de l'ADN conduisant à la mort cellulaire. L'ifosfamide est également un agent

alkylant bloquant la synthèse de l'ADN. La polychimiothérapie néo-adjuvante permet de réduire la taille de la tumeur avant l'acte chirurgical, limitant le besoin d'amputation à moins de 10 % des cas. La chimiothérapie adjuvante est associée ou non à un traitement par rayonnements ionisants.

Les taux de mortalité demeurent élevés pour les patients atteints d'ostéosarcomes métastatiques ou récidivants, et aucune amélioration des taux de survie n'a pu être obtenue depuis la mise en place de polychimiothérapie dans les années 1970. De plus, la combinaison de molécules de chimiothérapie augmente les effets secondaires des patients et les traitements actuels présentent une efficacité insuffisante pour les patients ayant des cancers agressifs, il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La première étude montrant l'expression du GD2 dans les xénogreffes d'ostéosarcomes humains et l'intérêt de cibler ce ganglioside pour le traitement des ostéosarcomes a été réalisée en 1987 (Heiner *et al.*, 1987). D'autres études ont ensuite montré l'expression du GD2 *in vitro* dans des lignées d'ostéosarcomes par cytométrie en flux (Shibuya *et al.*, 2012). L'expression du GD2 a été confirmée dans des échantillons issus de biopsie de patients atteints d'ostéosarcomes, dans la tumeur après chirurgie et dans les ostéosarcomes récidivants. L'expression du GD2 augmenterait lors de rechute des patients atteints d'ostéosarcome (Roth *et al.*, 2014; Poon *et al.*, 2015). Après avoir montré son expression, l'étude de l'inhibition du GD2 par l'anticorps anti-GD2 14G2a a permis de diminuer les propriétés invasives des cellules d'ostéosarcome Saos-2, MG-63 et SJS-1. Par la suite, des stratégies de combinaisons de thérapies comme le couplage de l'anticorps anti-GD2 14G2a avec un inhibiteur du récepteur à l'endothéline A ont montré que la diminution des capacités de prolifération des cellules d'ostéosarcome passe par la voie PI3K/Akt (Liu *et al.*, 2014) L'effet du cisplatine en combinaison avec l'anticorps anti-GD2 14G2a augmente la mort des cellules d'ostéosarcome en passant par un mécanisme d'apoptose (Zhu *et al.*, 2018). Actuellement, deux essais cliniques de phase II sont en cours pour traiter les patients atteints d'ostéosarcome. L'un combine l'anticorps monoclonal humanisé anti-GD2 hu3F8 (Naxitamab) et le GM-CSF (NCT02502786) (Hingorani *et al.*, 2022) et l'autre combine l'anticorps monoclonal chimérique anti-GD2 (Dinutuximab) et le GM-CSF permettant de stimuler l'activité ADCC (NCT02484443). Une autre stratégie est basée sur la thérapie par les cellules

T : l'essai clinique de phase I/II (NCT02117093) modifie des cellules T avec un anticorps anti-GD2 bispécifique OKT3/3F8 et administré en combinaison avec l'IL-2 et le GM-CSF.

Les cellules cancéreuses développent des mécanismes pour échapper aux traitements. Une des principales altérations dans la résistance aux médicaments est la surexpression de Glycoprotéine P (P-gp). Cette protéine est codée par le gène *ABCB1* (ATP-binding cassette sub-family B member 1) également appelé *MDR1* (multidrug resistance protein 1). La protéine MDR1 permet le transport des substrats endogènes et exogènes de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule. La surexpression de MDR1 est un des principaux mécanismes de résistance des cellules d'ostéosarcome, elle permet l'élimination des agents de chimiothérapies hors des cellules tumorales (Brambilla *et al.*, 2012). Dans une cohorte de 94 patients atteints d'ostéosarcome, il a été montré que la résistance aux chimiothérapies, comme le traitement par la doxorubicine, est corrélée à une expression élevée de MDR1 et une survie diminuée (Serra *et al.*, 2006). Des stratégies d'inhibition de MDR1 ont été utilisées dans les ostéosarcomes sans succès. L'inhibition de MDR1 a également été réalisée avec le système CRISPR-Cas9, les cellules d'ostéosarcome alors résistantes à la doxorubicine sont devenue sensibles à la doxorubicine ; en revanche, elles ne sont pas devenues sensibles au cisplatine contrairement aux cellules contrôles (Liu *et al.*, 2016).

Quelques études ont montré la modification de profil gangliosidique de cellules cancéreuses résistantes aux agents de chimiothérapie, dans différents cancers (Shammout *et al.*, 2021). Une expression élevée de l'*UGCG* est décrite dans les cellules de cancer du sein (Liu *et al.*, 1999), de cancer de l'ovaire et du cancer du colon (Liu *et al.*, 2008) et dans les leucémies (Itoh *et al.*, 2003). Une augmentation de l'expression du ganglioside GM3 a été observée dans les cellules de glioblastome résistantes à la doxorubicine en comparaison aux cellules sensibles. En revanche, une diminution de GM3 a été observée dans les cellules de cancer hépatique résistantes à la doxorubicine chez le rat (Benchekroun *et al.*, 1988). Des cellules de cancer du poumon à petites cellules résistantes au cisplatine présentent également un profil gangliosidique modifié en comparaison aux cellules parentales, avec une expression majeure des gangliosides GM3 et GM2 (Kiura *et al.*, 1998).

D'autres études montrent un lien entre l'expression de MDR1 dans les cellules résistantes aux traitements et l'expression de l'*UGCG*. Cette enzyme convertit le céramide en glucosylcéramide qui servira de précurseur pour la synthèse des gangliosides. L'inhibition de

l'UGCG dans des cellules de cancer du sein MCF-7 résistantes à la doxorubicine, restaure la sensibilité des cellules au traitement, avec une diminution de 80 % de l'expression de la protéine MDR1 (Gouazé *et al.*, 2005). Les gangliosides produits à partir de l'UGCG induisent l'expression de MDR1 à partir des voies de signalisation cSrc et β -catenin (Liu *et al.*, 2010). Le céramide, composé d'acide gras et de sphingosine, est au carrefour de nombreuses voies de biosynthèse. La sphingosine peut être phosphorylée par la sphingosine-1-kinase (SphK1). La Sphk1 est surexprimée dans de nombreux cancers. Une expression élevée de SphK1 est associée à l'expression de MDR1 dans les cellules d'ostéosarcome résistantes à la doxorubicine (Ren and Su, 2020). L'administration de phenoxodiol, inhibant la SphK1, et de doxorubicine diminue la croissance des cellules d'ostéosarcomes U2OS *in vitro* et *in vivo* (Yao *et al.*, 2012). L'expression des enzymes utilisant le céramide étant modifiée dans les cellules d'ostéosarcomes résistantes à la doxorubicine en comparaison aux cellules sensibles, le profil gangliosidique de ces cellules sera également modifié (Yao *et al.*, 2012; Ren and Su, 2020)

Nous avons donc entrepris, en collaboration avec le Pr Duan de l'Université de Miami, d'étudier le profil gangliosidique de cellules d'ostéosarcomes KHOS et U2OS sensibles à la doxorubicine, et de leurs clones KHOSR2 et U2OSR2 résistants à la doxorubicine. L'expression d'OAcGD2 n'est pas documentée dans les lignées d'ostéosarcomes, ni dans les tissus de patients. L'OAcGD2 n'étant pas exprimé dans les tissus sains, il serait une cible thérapeutique d'intérêt pour ces cancers résistants pour lesquels aucune amélioration n'a pu être obtenue sur la survie des patients depuis 1970. Cette étude sur des lignées d'ostéosarcomes permettra de documenter pour la première fois l'expression d'OAcGD2, et si des différences existent entre lignées sensibles et résistantes, d'étudier par la suite un lien entre profil gangliosidique et résistance à la doxorubicine.

Tous les éléments étudiés au cours de ce projet sont synthétisés dans la figure 39 afin de faciliter la lecture. Cette figure reprend les gènes de la biosynthèse étudiés par RT-qPCR (encadrés rouges) et les gangliosides étudiés en immunofluorescence, cytométrie en flux et spectrométrie de masse (encadrés bleus).

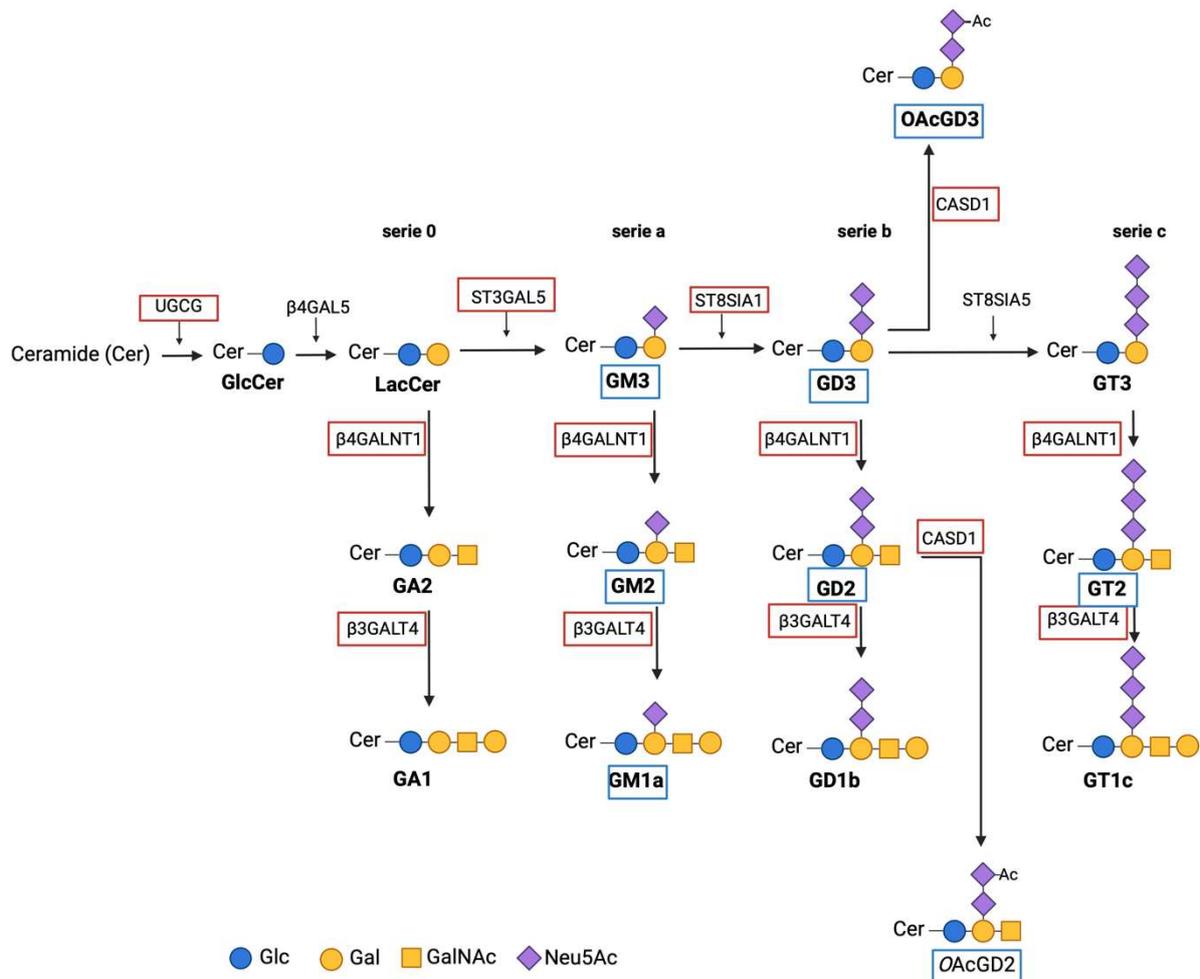


Figure 39 : Schéma simplifié de la biosynthèse des gangliosides pour l'étude du profil gangliosidique des cellules d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine.

Les encadrés rouges représentent les gènes étudiés par RT-qPCR et les encadrés bleus représentent les gangliosides étudiés en immunofluorescence, cytométrie en flux et spectrométrie de masse.

2. Matériels et méthodes

2.1. Culture cellulaire

Les cellules d'ostéosarcome KHOS, KHOSR2, U2OS et U2OSR2 ont été fournies par le Pr Duan (Université de Miami). Elles sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Lonza, ©) contenant 10 % de SVF décomplémenté, 2 mM de L-glutamine et supplémenté avec 1 mM de pyruvate de sodium.

Les cellules KHOSR2 et U2OSR2 (Lourda *et al.*, 2007), résistantes à la doxorubicine, sont stimulées avec 0,01 μM de doxorubicine tous les 10 jours. Toutes les lignées cellulaires sont maintenues à 37°C sous 5 % de CO_2 .

2.2. RT-qPCR (Reverse transcription – PCR quantitative)

L'extraction d'ARN des culots cellulaires de cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ et d'ostéosarcome U2OS, U2OSR2, KHOS, KHOSR2 est réalisée avec le kit NucleoSpin RNA Plus (Macherey-nagel, Düren, ©) en suivant le protocole du fabricant. La concentration est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop DeNovix et la pureté est vérifiée par les ratios d'absorbance à 260 et 280 nm. L'ARN (1 μg) subit une transcription inverse grâce au kit « RT First Strand cDNA Synthesis kit for q-PCR » (ThermoFisher Scientific, Villeneuve d'Ascq, ©) en suivant le protocole du fabricant. La qPCR est effectuée à l'aide du Kit qPCR Luna (New England Biolabs NEB, Massachusetts, USA) avec un mix de réaction de 25 μL contenant 12,5 μL de mix Luna 2X (NEB), 1 μL de chaque amorces à 300 nM (Eurogentec, Seraing, Belgium), dont les séquences sont données dans le tableau 1, 4 μL d'ADNc (1 :40) et 6,5 μL d'eau ultrapure.

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour la RT-qPCR des cellules d'ostéosarcome.

La température d'hybridation et la pente de la droite d'étalonnage reflétant l'efficacité de la PCR sont indiquées

Gènes	Amorce Sens 5'-3'	Amorce Antisens 5'-3'	Tm	Pente
<i>RPLP0</i>	GAT-GAC-CCC-AAA-GGA-GA	GTG-ATG-TGC-AGC-TGA-TCA-AGA-CT	56°C	-3,552
<i>UGCG</i>	CAC-CGC-ATT-ACA-CCT-CAA	CCG-TGA-ACC-AAG-CCT-ACT	60°C	-3,300
<i>β4GALT4</i>	TAT-GTG-CTG-TCA-GCG-TCT-GCT	ACA-AAG-ACA-TCC-TCT-AAT-GGG-AGA-A	60°C	-3,355
<i>β4GALNT1</i>	CAG-CGC-TCT-AGT-CAC-GAT-TGC	CCA-CGG-TAA-CCG-TTG-GGT-AG	51°C	-3,352
<i>ST3GAL5</i>	ATC-GGT-GTC- ATT-GCC-GTT-GT	TTC-ATA-GCA-GCC-ATG-CAT-TGA	51°C	-3,406
<i>ST8SIA1</i>	GCG-ATG-CAA-TCT-CCC-TCC-T	TTC-CCG-AAT-TAT-GCT-GGG-AT	60°C	-3,431
<i>CASD1</i>	GTG-GAT-TTT-CTG-TGG-CAT-CC	AAG-CGC-TTC-ACT-GCT-ACC-AT	60°C	-3,269

La RT qPCR est réalisée sur l'appareil AriaMX (Agilent, AriaMX Real-Time PCR System) avec le programme suivant pour les gènes *UGCG*, *ST3GAL5*, *β 4GALT4*, *ST8SIA1*, *CASD1* : dénaturation initiale durant 3 min à 95°C, puis 40 cycles de PCR avec dénaturation pendant 15 s à 95°C hybridation/élongation pendant 30 s à 60°C. Pour le gène *β 4GALNT1* et le gène normalisateur *RPLP0* codant la Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0, seule l'amplification change avec 15 s à 95°C, 15 s à 51°C ou 56°C et 15 s à 60°C. Toutes les manipulations sont réalisées en triplicata sur trois échantillons biologiques. Les résultats sont analysés avec le logiciel fournisseur AriaMX V1.6 puis traités dans un tableur en utilisant la méthode de calcul des quantités du protocole de M.Pfaffl (Pfaffl, 2001).

2.3. Western Blot

Les cellules KHOS, KHOSR2, U2OS et U2OSR2 sont lavées avec du PBS 1X et incubées 20 min avec le tampon de lyse RIPA (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS, pH 7,5) supplémenté avec 1 mM d'orthovanadate de sodium, 10 mM de NaF, un cocktail d'inhibiteurs de protéases 1X. Le lysat cellulaire est centrifugé 15 min à 20000 g à 4°C. Les surnageants sont collectés et la quantification de protéines est déterminée grâce au kit micro-BCA (ThermoFischer Scientific, France) selon les instructions du fournisseur. Des extractions protéiques des cellules CCD-841-CoN étaient disponibles dans l'équipe et ont été utilisées comme contrôle positif pour l'expression de MDR1. Des quantités égales de protéines (20 μ g par puits) sont séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 10% dans du tampon de migration (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 0,1% (m/v) SDS, pH 8,8) et transférées sur membrane de nitrocellulose (GE Healthcare, USA) dans du tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, 20% (v/v) méthanol, pH 8,8) à 200 mA pendant 2 h. Les membranes sont bloquées dans du lait dilué dans du TBS-Tween à 5% pendant 1 h. Elles sont ensuite incubées 2 h avec les anticorps primaires dirigés contre MDR1 (13342S, Cell signaling, USA; 1:1,000) ou la GAPDH. Après 3 rinçages, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire anti IgG de lapin couplé à la HRP (Horseradish peroxidase) pendant 1 h à température ambiante (dilution au 1 :10000). Après 3 rinçages avec le TBS-Tween, les bandes sont détectées à l'aide de la caméra CCD (Fusion Solo, France) et le logiciel d'acquisition Fusion.

2.4. Cytométrie en flux

Les cellules MDA-MB-231 GD3S+, KHOS, KHOSR2, U2OS, U2OSR2 sont collectées dans des microtubes de 1,5 ml à raison de 100000 cellules dans 200 µL de PBS 1X. Les tubes sont placés sur glace et les cellules sont incubées avec les anticorps monoclonaux anti-GD2, anti-OAcGD2, anti-GD3, anti-OAcGD3 à 100 µg/mL pendant 30 min. L'anticorps monoclonal anti-OAcGD2 murin IgG3 (8B6), l'anticorps monoclonal anti-OAcGD2 chimérique humain IgG1 c8B6 et l'anticorps monoclonal murin anti-GD2 IgG3 14.18 sont produits et fournis par OGD2 Pharma (Nantes). L'anticorps anti-GD3 R24 provient de Abcam (Pays-Bas) et l'anticorps anti-OAcGD3 CD60B (UM4D4) provient de Santa-Cruz Biotechnologies (Allemagne). Après 3 rinçages au PBS 1X et centrifugation 3 min à 400 g, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 488 (Invitrogen) pendant 30 min à une concentration de 3 µg/mL. Les cellules sont lavées 3 fois avec le PBS et centrifugées 3 min à 400 g. La cytométrie de flux est effectuée avec le cytomètre BD accuri C6 plus avec le filtre bandepass 533/30 et les résultats sont analysés avec le logiciel BD Csamplur.

2.5. Extraction et purification des glycosphingolipides

Les différents culots cellulaires sont lavés au PBS et lyophilisés avant les différentes étapes d'extraction. Une fois lyophilisés, les lipides sont extraits par deux fois avec un mélange CHCl₃/CH₃OH (2 :1, v/v), une fois avec du CHCl₃/CH₃OH (1 :2, v/v) et une fois avec du CHCl₃/CH₃OH/H₂O (1 :2 :0.8, v/v/v) en utilisant des centrifugations intermédiaires à 2500 g pendant 20 min. Ces fractions organiques sont rassemblées, séchées sous flux d'azote et saponifiées en condition douce avec une solution de NaOH 0.1M dans du CHCl₃/CH₃OH (1 :1, v/v) pendant 2 h à 37°C. Après évaporation, les glycolipides sont repris dans un mélange CH₃OH/0.1% TFA (1 :1, v/v) et finalement purifiés sur cartouche SPE SUPELLEAN™ ENVI™-18 (SUPELCO – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) équilibrée dans le même solvant. Après lavage avec un mélange de CH₃OH/0.1% TFA (1 :1, v/v), les GSL sont élués par un mélange CH₃OH, CHCl₃/CH₃OH (1 :1, v/v) et CHCl₃/CH₃OH (2 :1, v/v). Les fractions éluées sont séchées sous azote avant les futures analyses structurales.

2.6. Spectrométrie de masse

Les glycolipides sont perméthylés selon la méthode de Ciucanu and Kerek (Ciucanu and Kerek, 1984) avant l'analyse par spectrométrie de masse. Les échantillons sont repris par un mélange DMSO/NaOH/ICH₃ puis incubés 2 h sous agitation à température ambiante. La réaction est arrêtée par ajout d'une solution froide d'acide acétique à 5 % et 1 ml de chloroforme. La phase aqueuse est éliminée et la phase chloroformique est lavée 5 fois avec 2 ml d'eau avant d'être séchée sous flux d'azote. Les GSL sont ensuite re-solubilisés dans 100 µL d'ACN, et 1 µL est mélangé à 1 µL d'une solution matricielle d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque à 10 mg.mL⁻¹ dans l'ACN/H₂O (1 :1, v/v) et déposé sur la cible MALDI. L'acquisition se fait sur un système Axima Résonance (SHIMADZU, Kyoto, Japan). L'énergie du laser est optimisée pour chaque échantillon entre 90 eV et 120 eV, le nombre d'acquisition par spectre est de 2300, l'analyseur temps de vol est en mode réflectron, et la gamme de masse sélectionnée va de 1000 Da à 3000 Da. Pour l'analyse MS₂, la sélection de l'ion parent s'est faite à une résolution de 120 et la collision avec une tension entre 120 V et 250 V.

2.7. Hydrolyse des Acides sialiques et dérivation au DMB

Les GSL secs sont soumis à une hydrolyse par ajout d'acide trifluoroacétique (TFA 0.1M) à 80°C pendant 2 h afin de cliver de manière spécifique les acides sialiques. Les échantillons sont séchés au speedvac (Concentrator 5301, Eppendorf). Les acides sialiques hydrolysés sont ensuite couplés au dichlorhydrate de 1,2-diamino-4,5-méthylènedioxybenzène (DMB). Les échantillons ont été chauffés à 50°C pendant 2 h dans l'obscurité dans du DMB 7 mM, du β-mercaptoéthanol 1 M, de l'hydrosulfite de sodium 18 mM dans de l'acide acétique 5 mM. Les acides sialiques couplés au DMB (DMB-Sia) ont ensuite été analysés par LC-FLD. Les acides sialiques marqués au DMB sont injectés sur un système micro-LC Prominence LC-20AB (Shimadzu) et déposés sur une colonne LC InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 (4,6 x 150 mm, 2,7 µm) et séparés de manière isocratique par un mélange de solvants acétonitrile/méthanol/eau (9 :7 :84).

3. Résultats

3.1. Etude de la résistance des cellules à la doxorubicine

Afin de contrôler la sensibilité à la doxorubicine des lignées d'ostéosarcome sensibles (KHOS et U2OS) et résistantes (KHOSR2 et U2OSR2) envoyées par le Pr Duan (Université de Miami), nous avons étudié l'expression de la protéines MDR1 par RT-qPCR et Western-Blot.

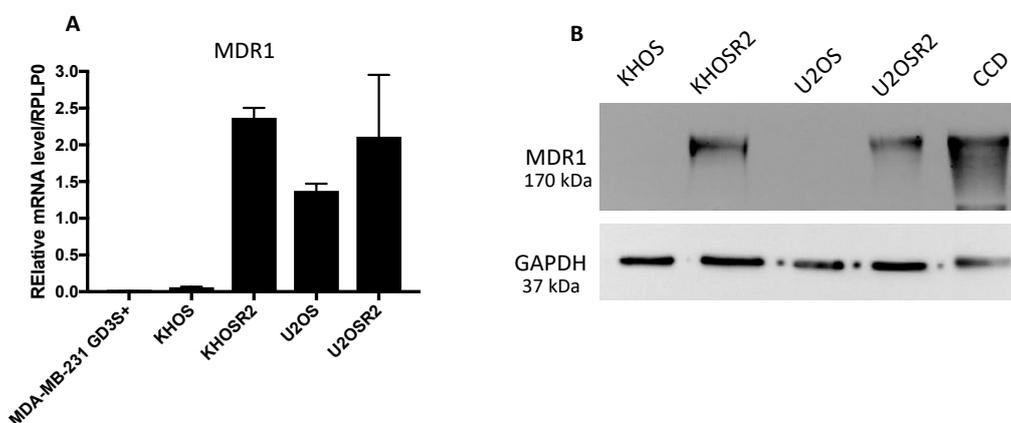


Figure 40 : Expression de MDR1 dans les lignées d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine.

(A) RT-qPCR du gène *MDR1* normalisé par rapport à l'expression du gène *RPLP0* dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+ et les cellules d'ostéosarcomes KHOS, KHOSR2, U2OS, U2OSR2. (B) Expression de MDR1 évaluée par western blot dans les lignées d'ostéosarcome. Les cellules CCD-842-CoN ont été utilisées comme témoin positif. (n=3)

L'étude par RT-qPCR nous montre une expression plus importante des transcrits du gène *MDR1* dans les lignées d'ostéosarcome résistantes à la doxorubicine KHOSR2 et U2OSR2 par rapport aux cellules sensibles à la doxorubicine KHOS et U2OS (Figure 40 A). L'étude par western blot nous a permis de confirmer l'augmentation de l'expression de MDR1 au niveau protéique (170 kDa) dans les cellules KHOSR2 et U2OSR2 par rapport aux cellules sensibles à la doxorubicine. Les cellules coliques embryonnaires CCD-841-CoN ont été utilisées ici comme contrôle positif pour l'expression de MDR1 (Figure 40 B).

Après confirmation la surexpression de la protéine MDR1 dans les cellules KHOSR2 et U2OSR2 résistantes à la doxorubicine, nous avons entrepris l'étude de l'expression des

gangliosides dans les différentes lignées d'ostéosarcome par différentes stratégies : RT-qPCR, cytométrie en flux, spectrométrie de masse et dérivation des acides sialiques au DMB.

3.2. Etude de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des gangliosides dans les cellules d'ostéosarcomes par RT-qPCR

Les recherches antérieures ont montré que certaines lignées d'ostéosarcomes, dont les cellules U2OS, expriment du GD2 et faiblement du GD3. Notre étude se veut plus large : nous avons analysé par RT-qPCR l'expression de gènes codant différentes enzymes impliquées dans la synthèse des gangliosides. La résistance à la thérapie et donc les niveaux élevés de MDR1 ont été associés à l'expression accrue de l'UGCG (UDP Glucose Ceramide Glycosyltransférase) (Wegner *et al.*, 2018). L'UGCG est l'enzyme initiatrice de la biosynthèse des gangliosides (Figure 39). Nous avons étudié l'expression du gène codant l'UGCG dans les cellules sensibles et résistantes à la doxorubine. Nous avons également analysé par RT-qPCR l'expression de gènes codant des enzymes responsables de la biosynthèse des gangliosides simples et complexes comme la ST3GAL5 (GM3 synthétase), β 3GALT4 (GM1a/GD1b synthétase), ST8SIA1, β 4GALNT1 et CASD1.

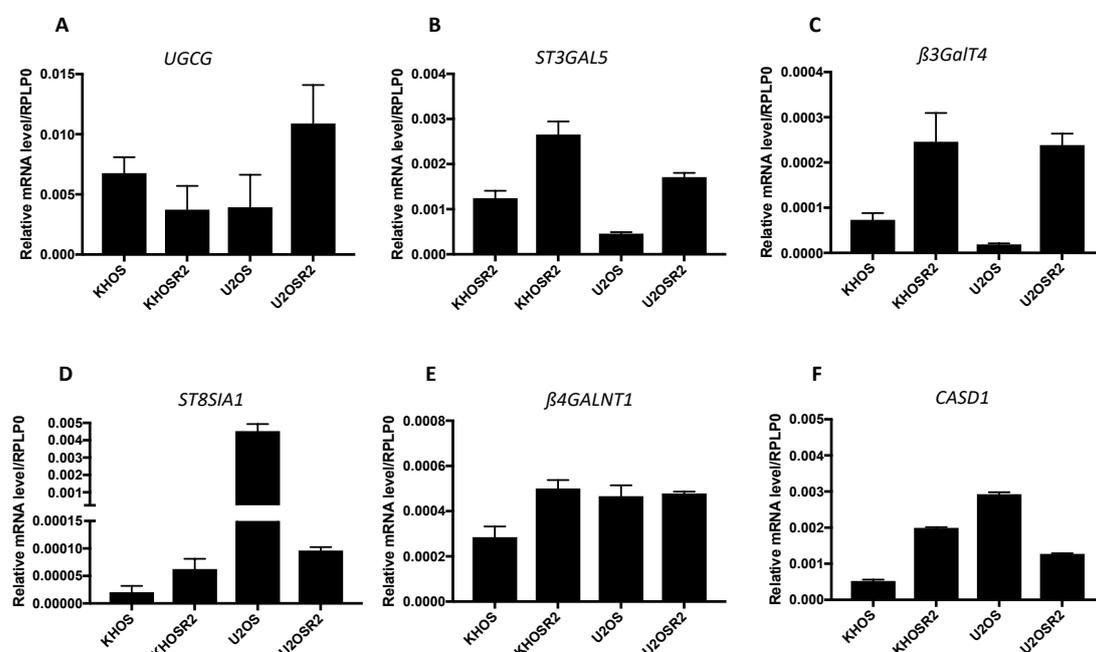


Figure 41 : Expression de gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des gangliosides dans les cellules d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubine par RT-qPCR

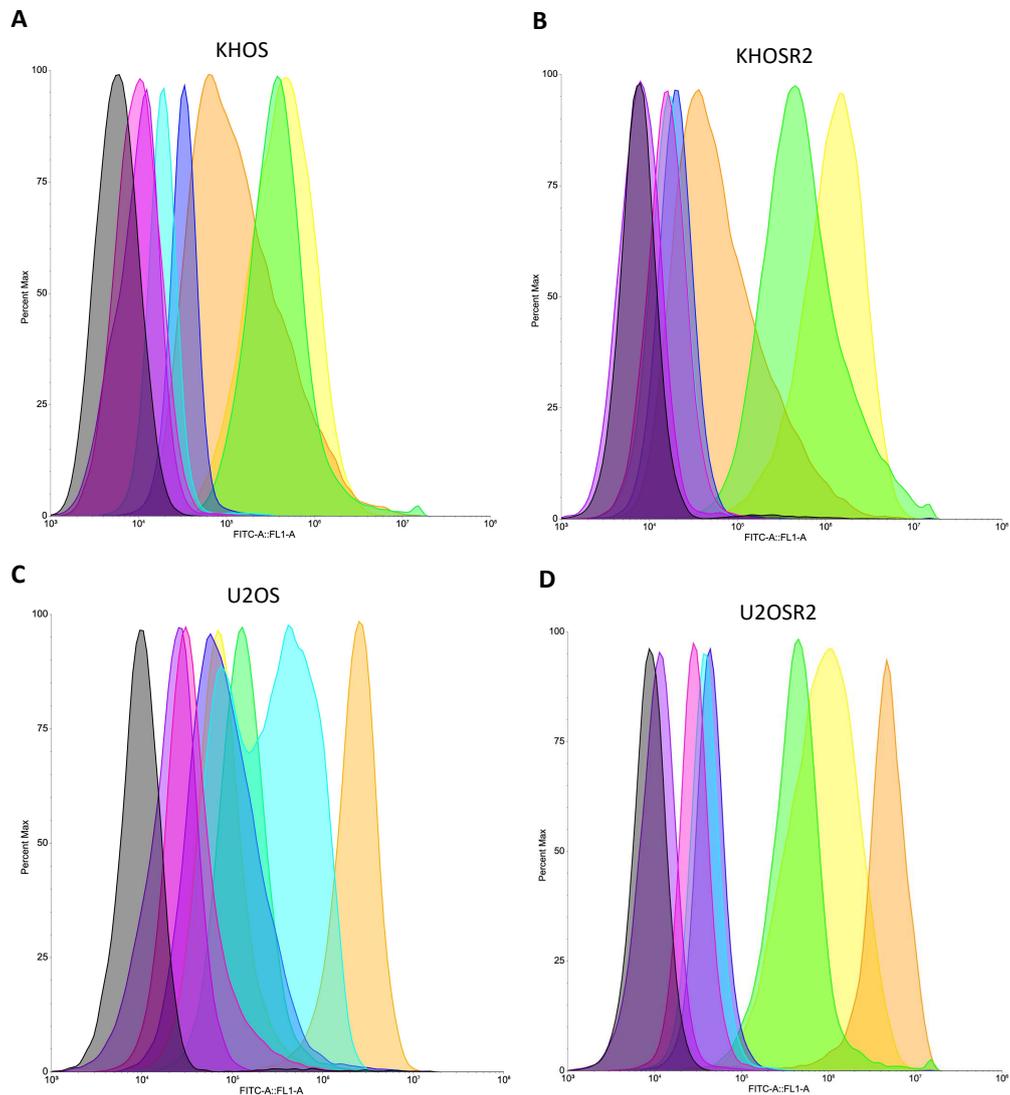
Étude par RT-qPCR de l'expression des gènes *UCGC* (A), *ST3GAL5* (B), *β3GALT4* (C), *ST8SIA1* (D), *β4GALNT1* (E), *CASD1* (F) dans les cellules d'ostéosarcomes KHOS, KHOSR2, U2OS, U2OSR2. L'expression des différents gènes a été normalisée par rapport à l'expression des ARNm du gène RPLP0 (n=3).

L'expression du gène *UGCG* est diminuée dans les cellules KHOSR2 résistantes à la doxorubicine par rapport à l'expression retrouvée dans les cellules KHOS. A l'inverse, l'expression du gène *UGCG* est augmentée dans les cellules U2OSR2 par rapport aux cellules U2OS. (Figure 41 A). L'expression des gènes *ST3GAL5* et *β3GALT4* est fortement augmentée dans les deux lignées résistantes par rapport aux lignées sensibles (Figure 41 B et C). Parmi les cellules d'ostéosarcomes, l'expression du gène *ST8SIA1* est la plus élevée dans les cellules U2OS, et très faible dans les autres lignées. L'expression du gène *ST8SIA1* est néanmoins plus élevée dans la lignée KHOSR2 que dans la lignée KHOS (Figure 41 D). Nous observons une augmentation dans l'expression du gène *β4GALNT1* d'un facteur 2 pour la lignée KHOSR2 par rapport à la lignée KHOS, et une expression identique de ce gène pour les U2OS et U2OSR2 (Figure 41 E). Le gène *CASD1* est également plus exprimé dans la lignée KHOSR que dans la lignée KHOS, mais diminué dans la lignée U2OSR2 en comparaison avec la lignée U2OS (Figure 41 F). Ce travail a été en partie réalisé par Maxime Grember lors de son stage en Master 1 en janvier-février 2023.

Suite aux résultats obtenus lors de la RT-qPCR, nous avons réalisé des analyses par cytométrie en flux sur l'ensemble des lignées cellulaires afin d'étudier l'expression du GM1, GM2, GM3, GD3, OAcGD3, GD2 et OAcGD2 à la surface des lignées d'ostéosarcome.

3.3. Etude du profil ganglioside des cellules d'ostéosarcome par cytométrie en flux

Nos recherches se focalisent principalement sur l'expression des gangliosides complexes dans des contextes de cancer, et en particulier le GD2 et l'OAcGD2. Nos résultats de RT-qPCR (Figure 41) et d'autres études démontrant l'expression du GD2 mais aussi du GD3 dans les ostéosarcomes (Shibuya *et al.*, 2012) nous avons également étudié l'expression du GD3 ainsi que du OAcGD3 puisque *CASD1* est exprimée dans toutes les lignées d'ostéosarcome testées (Figure 41 E). De plus, au vu de la variation d'expression des gènes *ST3GAL5* et *β3GALT4* dans les lignées résistantes à la doxorubicine, nous avons étudié l'expression des gangliosides simples, GM1, GM2, et GM3 (Figure 42).



F

	Ganglioside	KHOS	KHOSR2	U2OS	U2OSR2
DOX		Sensible	Résistante	Sensible	Résistante
FACS	GM1	++	+++	+	+++
	GM2	+	+	++	+++
	GM3	++	+++	++	+++
	GD3	+	+	+	+
	OAcGD3	-	-	-	-
	GD2	+	+	++	+
	OAcGD2	+	+	+	+

Légende:

- Autofluorescence
- GM1
- GM2
- GM3
- GD3
- OAcGD3
- GD2
- OAcGD2

Figure 42 : Etude de l'expression des gangliosides dans les lignées d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine par cytométrie en flux.

Expression des gangliosides GM1 (bleu), GD3 (vert foncé), OAcGD3 (marron), GD2 (orange) et OAcGD2 (vert clair) dans cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+, utilisées comme contrôle (A), les

lignées d'ostéosarcome KHOS (B), KHOSR2 (C), U2OS (D) et U2OSR2 (D) (F) Tableau récapitulatif l'expression des gangliosides observés dans les lignées d'ostéosarcomes selon les représentations suivantes : « - » signifie qu'il n'y a pas d'expression, « + » signifie qu'il y a une expression, l'ajout de symbole « + » indique une expression plus forte. DOX : doxorubicine (n=3)

Un tableau récapitulatif a été dressé (Figure 42 F) afin de faciliter la lecture des résultats obtenus en cytométrie en flux. Nous observons une expression du GM1 et du GM3 dans toutes les lignées d'ostéosarcome avec une augmentation d'expression dans les deux lignées résistantes à la doxorubicine par rapport aux lignées sensibles (Figure 42 A-F). Le ganglioside GM2 est exprimé dans toutes les lignées d'ostéosarcome, à des niveaux similaires dans les cellules KHOS et KHOSR2, et à des niveaux plus élevés dans les lignées U2OSR et U2OS. Le ganglioside GD3 est observé à de faibles niveaux dans toutes les lignées d'ostéosarcome, et l'OAcGD3 n'est pas exprimé à la surface des lignées d'ostéosarcome (Figure 42 A-F). Le GD2 et l'OAcGD2 sont très faiblement exprimés dans les lignées KHOS, KHOSR et U2OSR, mais à des niveaux beaucoup plus élevés dans les U2OS (Figure 42 A-F).

Il nous a semblé important de compléter notre étude avec d'autres techniques qui permettent une analyse moins ciblée des glycolipides exprimés dans les différentes lignées d'ostéosarcome. Nous avons commencé une collaboration avec le Pr Christophe Biot et le Dr Clément Delannoy de l'équipe Chemobiology au sein de l'UGSF pour des analyses du profil gangliosidique en spectrométrie de masse et dérivation des acides sialiques au DMB.

3.4. Analyse des glycosphingolipides par spectrométrie de masse

Les analyses par spectrométrie de masse permettent une meilleure séparation et caractérisation des gangliosides (Cavdarli *et al.*, 2020). Les culots cellulaires ont été divisés en plusieurs fraction : glycoprotéines associées aux membranes, protéines solubles, GSL, et acides sialiques libres. Nous avons étudié la nature des acides sialiques présents dans la fraction des GSL pour chaque lignée d'ostéosarcome ainsi que la lignée cellulaire contrôle MDA-MB-231 GD3S+, par spectrométrie de masse MALDI-TOF. La perméthylation des GSL que nous avons effectuée ne permet pas ici de visualiser les gangliosides O-acétylés.

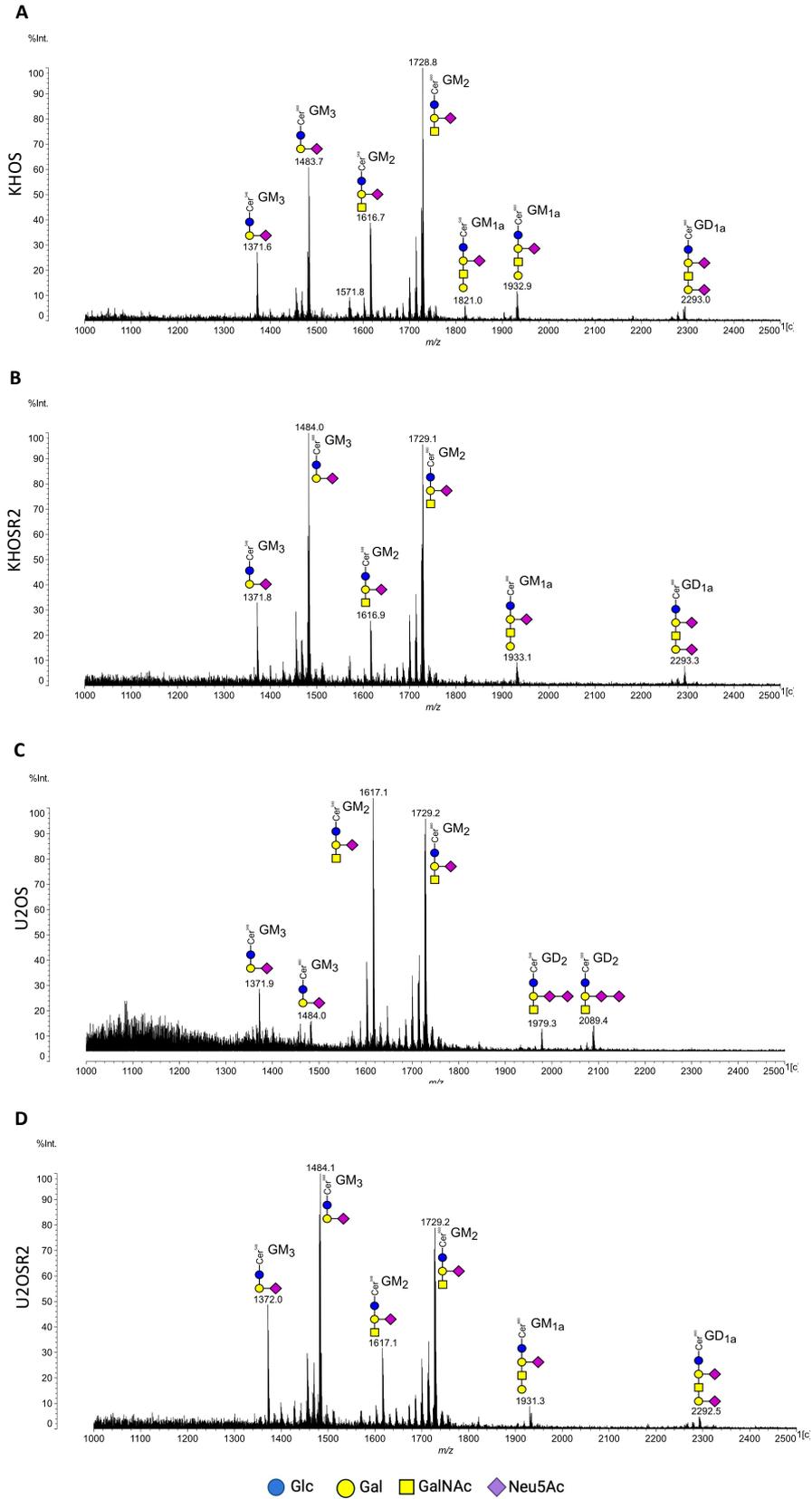


Figure 43 : Profil des glycosphingolipides de lignées d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Spectres de spectrométrie de masse dans les cellules d'ostéosarcome KHOS (A), KHOSR2 (B), U2OS (C) et U2OSR2 (D).

Les résultats obtenus en spectrométrie de masse indiquent peu de différences dans la composition en gangliosides entre les cellules KHOS et les cellules résistantes KHOSR2. Nous observons la présence majeure de gangliosides simples tels que le GM1, le GM2 et le GM3, seul le ganglioside complexe GD1a synthétisé à partir du GM1a est présent (Figure 43 A et B). Par contre, nous observons un changement d'expression des gangliosides simples et complexes entre les cellules sensibles U2OS et les cellules résistantes U2OSR2. Les cellules U2OSR2 ont un profil assez similaire aux KHOS et KHOSR2, avec une expression majeure de gangliosides de la série a : GM3, GM2, GM1a et GD1a. Les U2OS expriment les gangliosides simples GM3 et GM2 et le ganglioside complexe GD2, et n'expriment pas de GM1a et GD1a (Figure 43 C et D). Ces résultats qui témoignent d'une synthèse accrue de gangliosides de la série b aux dépens des gangliosides de la série a dans la lignée U2OS sont en accord avec les résultats de cytométrie de flux, et les résultats de RT-qPCR qui montrent une expression très forte de *ST8SIA1* dans les U2OS et très faible dans les U2OSR. Ces analyses ont été effectuées en collaboration avec le Dr Clément Delannoy et le Pr Christophe Biot (UGSF, Université de Lille).

La détection et l'analyse des gangliosides *O*-acétylés reste un challenge en spectrométrie de masse à cause de la labilité des groupements *O*-acétyl. Afin de mettre en évidence des variations éventuelles de la *O*-acétylation des gangliosides dans les différentes lignées, nous avons alors quantifié l'acide sialique (Neu5Ac) et l'acide sialique acétylé (Neu5,9Ac₂) dans la fraction des GSL des différentes lignées d'ostéosarcome.

3.5. Analyse des acides sialiques

Notre équipe a montré que le principal acide sialique *O*-acétylé dans les cellules cancéreuses est l'acide 9-*O*-acétyl-neuraminique (Neu5,9Ac₂) (Cavdarli *et al.*, 2019a). Nous avons alors quantifié les acides sialiques Neu5Ac et les acides sialiques 9-*O*-acétylés (Neu5,9Ac₂) dans les cellules d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine en utilisant l'analyse en LC-ESI/MS des acides sialiques dérivés au DMB.

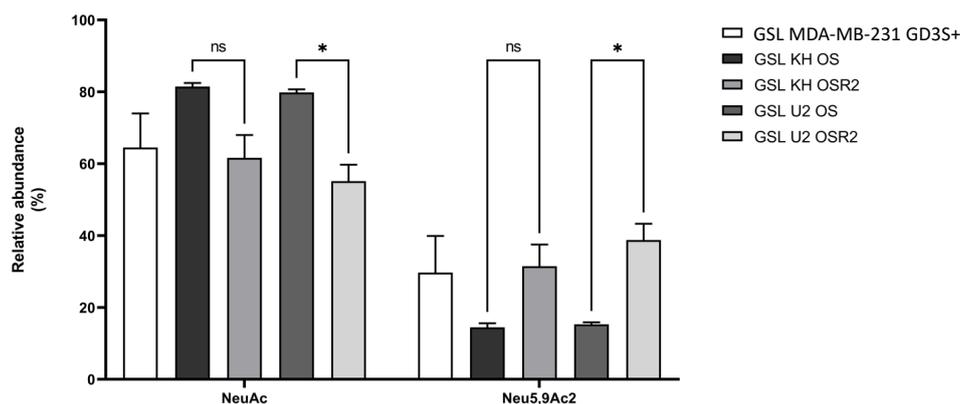


Figure 44 : Quantification de l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) et d'acide *N*-acétylneuraminique 9-*O*-acétylé (Neu5,9Ac₂) des gangliosides des lignées d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine.

Les culots cellulaires ont été fractionnés et les GSL ont été récupérés pour être analysés. Les acides sialiques ont été dérivés grâce au DMB et analysés en LC-ESI/MS. (n=3)

Les résultats obtenus par le Dr Clément Delannoy montrent une diminution d'acides sialiques Neu5Ac mais une augmentation des acides sialiques *O*-acétylés Neu5,9Ac₂ dans les cellules résistantes à la doxorubicine KHOSR2 et U2OSR2 en comparaison aux cellules sensibles KHOS et KHOSR2 (Figure 44). Ces résultats montrent une cohérence avec les résultats de RT-qPCR pour les lignées KHOS/KHOSR, qui montrent une augmentation de l'expression du gène codant la SOAT CASD1 dans la lignée résistante (Figure 44). Par contre, une diminution de l'expression de *CASD1* est observée dans la lignée U2OSR par rapport à la lignée U2OS, confirmant différents niveaux de régulation de la *O*-acétylation de gangliosides.

4. Conclusion

Plusieurs stratégies ont été entreprises afin d'établir un profil gangliosidique de cellules d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine. Par RT-qPCR, nous avons quantifié l'expression des gènes *UGCG* (codant la GlcCer synthétase), *ST3GAL5* (GM3 synthétase), *β4GALNT1* (GM2/GD2 synthétase), *ST8SIA1* (GD3 synthétase), *β4GALT4* (GM1 synthétase) et *CASD1*. L'observation la plus marquante est une forte expression de *ST8SIA1* dans les U2OS, accompagnée d'une biosynthèse de gangliosides complexes : le GD2 et l'OAcGD2 ont été détectés par cytométrie de flux, et les analyses par spectrométrie de masse montrent la présence de GD2. Par contre, dans les U2OSR2, *ST8SIA1* est très faiblement

exprimé. En conséquence, ces cellules expriment majoritairement des gangliosides simples, GM1, GM2 et GM3. De manière générale, les KHOS et KHOSR2 expriment des gangliosides simples GM1, GM2 et GM3 et le ganglioside complexe GD1a. Nous observons donc une corrélation entre l'expression de l'enzyme clé de biosynthèse des gangliosides complexes, *ST8SIA1*, et le profil gangliosidique des différentes lignées (tableau 7 A). L'augmentation de l'expression de *ST3GAL5* dans les lignées résistantes permet également d'expliquer les quantités accrues détectées par cytométrie en flux de GM3, GM2 et GM1 dans les lignées résistantes par rapport à leur contrôle sensible à la doxorubicine.

L'étude des acides sialiques *O*-acétylés suggère une augmentation de Neu5,9Ac₂ dans les lignées cellulaires résistantes par rapport aux lignées sensibles. Notre approche ciblée sur l'OAcGD3 et l'OAcGD2 par cytométrie de flux ne permet pas d'établir de corrélation entre cette augmentation de Neu5,9Ac₂ et l'expression de ces gangliosides *O*-acétylés. Néanmoins, le GD1a pourrait exister sous forme OAcGD1a. D'autres approches comme la séparation des gangliosides par chromatographie sur couche mince suivie par une révélation par une lectine reconnaissant les acides sialiques 9-*O*-acétylés permettra de compléter cette étude.

Il semble que les deux lignées utilisées pour notre étude aient donc un profil gangliosidique différent : les U2OS expriment le GD2, comme décrit dans la littérature, et nous montrons pour la première fois l'expression d'OAcGD2 dans cette lignée, mais aussi à de faibles niveaux dans les différentes lignées d'ostéosarcome. La lignée U2OSR2 présente un profil gangliosidique tout à fait différent, avec des gangliosides simples, du fait de la répression de *ST8SIA1*. La lignée KHOS ne semble pas refléter l'expression du GD2 établi dans les tumeurs, mais présente essentiellement des gangliosides simples qui sont augmentés dans la lignée résistante.

Tableau 7 : Synthèse des résultats obtenus lors des analyses d'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des gangliosides et l'expression des gangliosides.

Résultats obtenus en RT-qPCR (A), cytométrie en flux (B), spectrométrie de masse (C) et dérivation au DMB (D). L'absence d'expression est représentée avec le symbole « - », une expression est représentée avec le symbole « + », une expression plus forte est représentée par « ++ ».

A

	Gène	KHOS	KHOSR2	U2OS	U2OSR2
Doxorubicine		Sensible	Résistante	Sensible	Résistante
RT-qPCR	UGCG	+	+	+	++
	β4GalT4	+	++	+	++
	ST8SIA1	+	+	++	+
	β4GALNT1	+	++	++	++
	CASD1	+	++	++	+
	ST3GAL5	+	++	+	++

B

	Ganglioside	KHOS	KHOSR2	U2OS	U2OSR2
Doxorubicine		Sensible	Résistante	Sensible	Résistante
Cytométrie en Flux	GM1	++	+++	+	+++
	GD3	+	+	+	+
	OAcGD3	-	-	-	-
	GD2	+	+	++	+
	OAcGD2	+	+	+	+
	GM2	+	+	++	+++
	GM3	++	+++	++	+++

C

	Ganglioside	KHOS	KHOSR2	U2OS	U2OSR2
Doxorubicine		Sensible	Résistante	Sensible	Résistante
Spectrométrie de masse	GM1	+	+	-	+
	GD3	-	-	-	-
	OAcGD3	-	-	-	-
	GD2	-	-	+	-
	OAcGD2	-	-	-	-
	GD1	+	+	-	+
	GM2	++	++	++	++
	GM3	+	++	+	++

D

	Ganglioside	KHOS	KHOSR2	U2OS	U2OSR2
Doxorubicine		Sensible	Résistante	Sensible	Résistante
Dérivation DMB	Neu5Ac	++	+	++	+
	Neu5,9Ac2	+	++	+	++

Discussion générale et perspectives

La *O*-acétylation des résidus d'acide sialique est l'une des principales modifications des gangliosides. Les gangliosides *O*-acétylés sont exprimés au cours de l'embryogenèse, disparaissent dans les tissus sains adultes, mais sont exprimés au cours du développement tumoral et sont donc considérés comme des marqueurs des cancers d'origine neuroectodermique. L'expression du GD2 et d'OAcGD2 a été démontrée dans le cancer du sein, le neuroblastome, le glioblastome et le sarcome (Alvarez-Rueda *et al.*, 2011; Terme *et al.*, 2014). Il est intéressant de noter que l'OAcGD2 est un nouveau marqueur de CSC dans différents sous-types de cancer du sein (Cheng *et al.*, 2021). L'anticorps anti-OAcGD2 8B6 a éliminé les cellules présentant des niveaux élevés d'OAcGD2 et a réduit la croissance tumorale dans un modèle PDX, démontrant le potentiel des anticorps anti-OAcGD2 en tant qu'outils immunothérapeutiques prometteurs pour cibler les CSC (Cheng *et al.*, 2021). De plus, l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 s'est révélé aussi efficace que l'anticorps anti-GD2 ch14.18 (biosimilaire du dinutuximab) dans un modèle de xélogreffe de neuroblastome chez la souris sans induction d'allodynie chez le rat, ce qui suggère que l'OAcGD2 est une cible thérapeutique aussi précieuse et moins toxique que le GD2 dans la plupart des cancers positifs au GD2/OAcGD2 (Terme *et al.*, 2014). L'effet de l'*O*-acétylation de l'acide sialique des gangliosides sur la biologie des cellules cancéreuses est inconnu. Les données disponibles sur le GD3 et l'OAcGD3 suggèrent que le GD3 active le programme apoptotique au niveau des membranes mitochondriales en induisant la libération de facteurs apoptotiques, tandis que la synthèse d'OAcGD3 réprime l'activité pro-apoptotique du GD3 dans l'ALL (Malisan *et al.*, 2002). Cependant, aucune donnée n'est disponible sur les rôles respectifs du GD2 et d'OAcGD2 dans le cancer, et en particulier si ces deux molécules activent les RTK et/ou des voies de signalisation intracellulaires conduisant à des propriétés malignes accrues.

La biosynthèse et la dégradation des gangliosides *O*-acétylés sont des processus finement régulés qui dépendent de surtout de l'équilibre entre les activités SOAT et SIAE, qui transfèrent et clivent les groupements *O*-acétyl (Mandal *et al.*, 2015). La protéine CASD1 est la seule SOAT humaine. Le rôle de CASD1 dans la biosynthèse du 7-OAcGD3 a d'abord été mis en évidence dans des cellules COS7 (Arming *et al.*, 2011), et ensuite confirmé dans les cellules haploïdes HAP-1 (Baumann *et al.*, 2015). Des études réalisées dans l'équipe avant mon arrivée ont démontré le rôle clé de CASD1 dans la biosynthèse d'OAcGD2 dans des cellules de cancer du sein triple négatif SUM159PT (Cavdarli *et al.*, 2021). En utilisant des stratégies de

transfection de plasmides et de siARN pour moduler l'expression de CASD1, nous avons observé que les niveaux d'OAcGD2 sont en corrélation avec les niveaux de CASD1. Cependant, l'inhibition stable de CASD1 par stratégie de shARN ou la surexpression stable n'ont pas été aussi informatives que les transfections transitoires. Dans le premier cas, les cellules transfectées avec un shARN ciblant CASD1 n'ont pas proliféré. La surexpression stable de CASD1 a conduit à la sélection de 3 clones présentant une expression plus élevée d'OAcGD2 et une capacité accrue de migration et d'invasion, mais l'expression d'OAcGD2 et de CASD1 a disparu dans ces clones sélectionnés après 2 mois de culture (Cavdarli *et al.*, 2021).

Nous comprenons encore mal comment les cellules cancéreuses dérivées du neuroectoderme régulent l'expression d'OAcGD2. Nous avons donc utilisé la technologie de pointe du criblage par siARN à haut débit couplé à l'imagerie confocale pour disséquer le réseau génétique (kinases et phosphatases) qui régule l'expression d'OAcGD2 dans les cellules de cancer du sein. L'analyse du criblage par siARN du phosphatome/kinome cellulaire sur la base de l'intensité de fluorescence obtenue par immunodétection à l'aide de l'anticorps anti-OAcGD2 8B6 dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+ a révélé un réseau de gènes impliqués dans la synthèse d'OAcGD2, et permis l'identification de 43 gènes, avec 18 gènes régulant à la baisse l'expression d'OAcGD2 et 25 gènes régulant à la hausse l'expression d'OAcGD2. Ces gènes sont impliqués dans le métabolisme (métabolisme cellulaire général, métabolisme des lipides), le trafic membranaire et la signalisation cellulaire. Nous avons sélectionné deux gènes dont l'inhibition augmente fortement l'expression d'OAcGD2 : *CERK* et *PI3KC2A*.

PIK3C2A fait partie de la famille des phosphoinositide 3-kinases. Localisée au niveau de la membrane plasmique, PIK3C2A participe à l'endocytose par les vésicules recouvertes de clathrine (Gaidarov *et al.*, 2001) et à la dégradation des constituants endocytés (Gulluni *et al.*, 2019). La surexpression de PIK3C2A a été décrite dans le cancer du rein (Qin *et al.*, 2023) et le cancer du pancréas (Singh *et al.*, 2023) dans des analyses transcriptomiques, et l'inhibition de PIK3C2A par siARN diminue la prolifération de cellules cancéreuses.

Du fait de la localisation des gangliosides à la surface cellulaire et de leur recyclage par les vésicules recouvertes de clathrine et de l'implication de PIK3C2A dans la biologie des cellules cancéreuses, nous avons étudié l'impact de l'inhibition de PI3KC2A sur l'expression d'OAcGD2. L'utilisation de siARN individuels ciblant PIK3C2A ou de l'inhibiteur PIK90 n'ont pas confirmé l'augmentation d'expression d'OAcGD2 observée lors du criblage réalisé

précédemment par S. Cavdarli dans les cellules MDA-MB-231 GD3S+. De plus, les résultats semblent dépendre du type cellulaire, avec des résultats différents dans les cellules de neuroblastome Kelly par rapport aux cellules MDA-MB-231 GD3S+. Enfin, le seul inhibiteur utilisé pour cibler PIK3C2A n'est pas spécifique, il cible également d'autres PIK (Yi *et al.*, 2013). Ces observations ne nous ont pas permis de comprendre comment PIK3C2A régule l'expression d'OAcGD2. Nous nous sommes donc focalisés sur la stratégie d'inhibition de CERK, qui a un lien plus direct avec la biosynthèse des gangliosides.

Les gènes des voies métaboliques, en particulier du métabolisme des lipides, ont attiré notre attention en raison de leur implication potentielle dans l'O-acétylation du GD2. Plusieurs gènes identifiés par le criblage à siARN que nous avons effectué sont impliqués dans le métabolisme des lipides : *CERK*, *PIK3C2A*, *PKD3*, *PFKFB2*, *PFKFB4*, *NADK*, *PPAP2A* et *PPAP2B*. Il est intéressant de noter que *CERK* code pour la céramide kinase qui utilise le céramide comme substrat pour produire le C1P. Sachant que le céramide est le substrat commun pour la synthèse des gangliosides et du C1P, la déplétion du siARN de CERK fournit plus de céramide disponible pour la synthèse des gangliosides. Pour ces raisons, et en raison du rôle documenté de CERK dans la biologie des cellules cancéreuses, notre étude s'est concentrée sur CERK pour moduler la synthèse d'OAcGD2 dans les cellules cancéreuses dérivées du neuroectoderme.

Le C1P et l'enzyme responsable de sa biosynthèse, la céramide kinase, sont des régulateurs connus de la croissance et de la survie des cellules normales et malignes par le biais de voies de signalisation régulées par le stress (Gomez-Larrauri *et al.*, 2021). Le C1P régule l'invasion, la migration et la dissémination des cellules cancéreuses dans de nombreux cancers, tels que les cancers du poumon, du sein et du pancréas (Rivera *et al.*, 2016). CERK et C1P sont également des acteurs clés dans la régulation des réponses inflammatoires. L'inhibition de CERK dans les cellules cancéreuses par des inhibiteurs spécifiques a mis en évidence l'intérêt de cibler cette molécule dans le cancer. Le traitement par l'inhibiteur de CERK, NVP231, de cellules de cancer du sein triple négatif MDA-MB-231 réduit les capacités migratoires et invasives de ces cellules par la voie p13K/Akt (Schwalm *et al.*, 2020). Nous avons confirmé que CERK est un modulateur clé de la synthèse d'OAcGD2 dans différentes lignées cellulaires cancéreuses.

L'analyse transcriptionnelle des profils d'expression génique de plus de 2 200 patientes atteintes d'un cancer du sein a révélé qu'une forte expression de *CERK* est associée à un risque

accru de récurrence chez les femmes atteintes d'un cancer du sein (Payne *et al.*, 2014). En outre, l'expression de *CERK*, de la galactosylcéramide synthase et de *ST8SIA1* est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du sein, en particulier pour les cancers ER négatifs (Ruckhäberle *et al.*, 2009). La surexpression de *CERK* et de *SPHK1* est également associée à des métastases ganglionnaires, à un stade avancé de la tumeur, à un potentiel prolifératif élevé et à l'expression de marqueurs de métastases et de résistance aux médicaments, tels que *ABCC1* et *ABCC2* dans le cancer du sein (Bhadwal *et al.*, 2022). Ces études suggèrent que le ciblage de *CERK*, qui peut être considérée comme une enzyme pro-survie, pourrait être particulièrement bénéfique dans la thérapie anti-cancéreuse.

Nos études bioinformatiques utilisant Survexpress ont montré qu'une expression élevée de *CERK* est associée à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers : les gliomes de bas grade, le carcinome du sein, le carcinome épidermoïde de la tête et du cou, la leucémie myéloïde aiguë et le mélanome, en particulier en combinaison avec une forte expression des gènes clés impliqués dans la biosynthèse des gangliosides complexes, *ST8SIA1*, *B4GALNT1*, *CASD1*. Ces données suggèrent qu'une expression élevée des gènes impliqués dans la synthèse d'OAcGD2 révèle un mauvais pronostic, ce qui pourrait être utilisé comme indicateur pour prédire le pronostic des tumeurs en clinique.

L'expression des gènes *ST8SIA1*, *B4GALNT1* et *CASD1*, qui codent pour des enzymes impliquées dans la synthèse d'OAcGD2, et l'expression d'OAcGD2 ont ensuite été étudiées dans diverses lignées de cellules cancéreuses dérivées du neuro-ectoderme : cancer du sein, neuroblastome, glioblastome et gliome pédiatrique (DIPG). Les lignées cellulaires DIPG présentent les niveaux d'expression les plus élevés des trois gènes parmi toutes les lignées cellulaires testées, ainsi qu'une expression marquée d'OAcGD2 à la surface des cellules. L'expression d'OAcGD2 n'a jamais été documentée dans les DIPG, mais le GD2 est exprimé dans les lignées cellulaires DIPG mutantes H3K27M, et ce ganglioside est une cible thérapeutique potentielle pour ces tumeurs, pour lesquelles il existe très peu d'options thérapeutiques (de Billy *et al.*, 2022). Les stratégies basées sur l'utilisation de CAR anti-GD2, en combinaison avec des agents tels que les inhibiteurs de l'IGF1R/IR, semblent prometteuses pour les patients atteints de DMG/DIPG (Majzner *et al.*, 2022; de Billy *et al.*, 2022). D'après nos données, les CAR anti-OAcGD2 pourraient également constituer une option thérapeutique.

Malgré leur intérêt évident en tant que modèles cellulaires pour notre étude actuelle, les cellules DIPG n'ont pas pu être utilisées pour les expériences d'inhibition de CERK, puisqu'elles ne peuvent pas être transfectées par des siRNA par lipofection. Nous avons choisi de les utiliser pour les expériences d'ADCC de ces travaux. Outre les lignées cellulaires DIPG, tous les gènes étaient les plus fortement exprimés dans la lignée de cancer de sein MDA-MB-231 GD3S+ et dans la lignée de neuroblastome Kelly, qui ont donc été sélectionnés pour les études d'inhibition de CERK. L'inhibition de CERK au niveau transcriptionnel par des siRNA individuels, ou au niveau protéique en utilisant un inhibiteur pharmacologique NVP231, a confirmé l'augmentation de l'expression d'OAcGD2 révélée par la stratégie de criblage à haut débit, dans ces deux lignées cellulaires cancéreuses exprimant OAcGD2. Il est probable que l'inhibition de CERK n'affecte pas spécifiquement l'expression des gangliosides OAcGD2, mais plus largement le profil des gangliosides. Cependant, les produits terminaux de la chaîne de biosynthèse, tels que l'OAcGD2, pourraient être plus affectés que la plupart des gangliosides intermédiaires. Des analyses par spectrométrie de masse seront nécessaires pour déterminer dans quelle mesure l'expression des gangliosides est affectée dans les différentes lignées cellulaires.

Le C1P, produit de l'activité de CERK, a été associé à la survie et à la migration des cellules. En accord avec les observations faites dans les cellules de cancer du sein et dans les cellules cancéreuses du pancréas (Rivera *et al.*, 2016; Schwalm *et al.*, 2020), nous observons une diminution marquée de la migration des cellules MDA-MB-231 GD3S+, étudiée à la fois par des essais de blessure et des essais en transwell, avec l'inhibiteur sélectif de CERK, NVP-231, ou par traitement avec les siRNA 2 et 4 spécifiques ciblant CERK. Ces données suggèrent que le ciblage de l'expression et de l'activité de CERK peut à la fois augmenter la présence d'OAcGD2 à la surface des cellules et permettre de contrôler la dissémination des cellules cancéreuses.

L'anticorps anti-OAcGD2 8B6 induit la mort des cellules tumorales OAcGD2+ principalement par un mécanisme ADCC dans les lignées cellulaires de neuroblastome. Le ganglioside OAcGD2 est fortement exprimé dans les lignées de glioblastomes adultes et l'anticorps anti-OAcGD2 8B6 induit une ADCC contre les cellules tumorales de glioblastome OAcGD2+ (Fleurence *et al.*, 2016). L'anticorps anti-OAcGD2 8B6 inhibe la prolifération et la formation de mammosphères de PDX de tumeurs mammaires présentant des niveaux élevés

d'OAcGD2, mais présente une efficacité beaucoup plus faible sur des PDX avec des niveaux faibles d'OAcGD2 (Cheng *et al.*, 2021). Des niveaux élevés d'OAcGD2 dans les modèles PDX augmentent donc la sensibilité des cellules à l'activité cytotoxique de l'anticorps anti-OAcGD2 8B6.

L'ADCC est considérée comme un mécanisme clinique important, et l'amélioration de l'ADCC est devenue une approche logique pour améliorer l'efficacité des anticorps thérapeutiques anti-GD2 (Ahmed *et al.*, 2013). Nous avons dans un premier temps comparé les différences dans l'activité ADCC de l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 avec celle de l'anticorps anti-GD2 ch14.18. L'ADCC a été observée avec les anticorps anti-OAcGD2 c8B6 ou anti-GD2 ch14.18, sur les lignées cellulaires MDA-MB-231 GD3S+ et DIPG13 grâce aux cellules NK de donneurs sains. Il est intéressant de noter que la lyse spécifique a atteint des valeurs maximales de 40 % pour l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 et de 33 % pour l'anticorps anti-GD2 ch14.18, ce qui suggère que l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 est plus efficace *in vitro* que l'anticorps anti-GD2 dans les tests ADCC. Enfin, l'inhibition de CERK dans les deux modèles cellulaires a augmenté de manière significative la mort cellulaire induite par l'anticorps anti-OAcGD2 dans la plupart des conditions expérimentales testées (ratios cellules effectrice/cellules cible), ce qui pourrait être lié à la fois à l'augmentation de l'expression d'OAcGD2 à la surface des cellules, mais aussi à des effets plus généraux de l'inhibition de CERK, comme le suggère l'effet modéré de l'inhibition de CERK seule sur la viabilité cellulaire. En outre, l'inhibition de CERK par siRNA/petites molécules peut diminuer la prolifération cellulaire dans deux lignées cellulaires de cancer du sein, BT-474 et MDA-MB-231 (Schwalm *et al.*, 2020). En accord avec ces données, notre étude met en évidence la diminution des capacités de migration des cellules MDA-MB-231 GD3S+ lorsque CERK est inhibée. Par conséquent, CERK apparaît maintenant comme une cible thérapeutique de grand intérêt dans les cancers du sein triple négatifs et triple positifs. Dans notre étude, l'inhibition de CERK diminuerait à la fois la progression tumorale et la sensibilité à l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 par un mécanisme d'ADCC.

Ces données ouvrent la voie au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des composés qui augmentent l'expression d'OAcGD2 et diminuent les propriétés malignes des cellules. Le traitement par HDAC augmente l'expression du GD2 dans les cellules de neuroblastome, et combinaison de thérapies de l'anticorps anti-GD2 avec le vorinostat est

extrêmement efficace pour supprimer la croissance du neuroblastome dans un modèle orthotopique agressif de neuroblastome intra-surrénalien, entraînant une augmentation de la survie (van den Bijgaart *et al.*, 2019; van den Bijgaart *et al.*, 2020). Puisque que le GD2 et l'OAcGD2 semblent exprimés de manière concomitante dans la plupart des cancers, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de HDAC dans les cellules de cancer du sein MDA-MB-231 GD3S+, et confirmé une cytotoxicité plus élevée de l'anticorps anti-OAcGD2 c8B6 en présence de SAHA, inhibiteur de HDAC.

Ces résultats préliminaires prometteurs et l'absence d'allodynie générée par les anticorps anti-OAcGD2 en modèle animal fournissent une justification solide pour les futurs essais cliniques. Les anticorps anti-OAcGD2 en combinaison avec des drogues tels que les inhibiteurs de CERK ou le vorinostat, présentent un intérêt particulier pour les cancers exprimant le OAcGD2. Une étude préclinique, grâce à l'injection de cellules cancéreuses de sein MDA-MB-231 GD3S+ chez la souris, conforterait la stratégie thérapeutique envisagée.

La prise en charge des ostéosarcomes implique généralement une polychimiothérapie comportant l'utilisation de la doxorubicine. Bien que cette approche combine plusieurs médicaments, elle est souvent associée à des effets secondaires importants et n'apporte qu'une amélioration limitée du taux de survie des patients qui récidivent. Par conséquent, il est impératif de développer des stratégies thérapeutiques plus efficaces pour les personnes atteintes d'ostéosarcomes. L'expression du GD2 dans les cellules d'ostéosarcome a été mise en évidence dans plusieurs lignées cellulaires, mais aussi *in vivo* (Shibuya *et al.*, 2012), et dans des biopsies de patients (Roth *et al.*, 2014). L'anticorps anti-GD2 diminue les propriétés malignes des cellules d'ostéosarcome (Liu *et al.*, 2014). Une combinaison thérapeutique incluant le cisplatine et l'anticorps anti-GD2 14G2a a montré une augmentation de la cytotoxicité (Zhu *et al.*, 2018). Actuellement, des essais cliniques de phase II sont en cours incluant soit le dinutuximab, soit le naxitamab, en combinaison avec le GM-CSF. Le GD2 est donc un marqueur et une cible thérapeutique dans les ostéosarcomes, mais les essais cliniques basés sur l'utilisation du dinutuximab ou du naxitamab risquent de présenter les effets toxiques déjà documentés pour ces anticorps (cf partie II, §6.2.1. et §6.3.1).

Les enzymes impliquées dans l'expression des gangliosides et par conséquent les gangliosides, semblent jouer un rôle dans les mécanismes de résistance des cellules tumorales aux traitements. Les traitements de chimiothérapie, comme la doxorubicine, induisent une

surexpression de la glycoprotéine MDR1, marqueur de résistance. Une corrélation a été effectuée entre une expression élevée de UGCG dans les cellules de cancer de l'ovaire, de cancer du côlon, les leucémies et la résistance aux traitements. En ce qui concerne les gangliosides, le GM3 est augmenté dans les glioblastomes résistants (Benchekroun *et al.*, 1988) et dans les cancers du poumons résistant (Guthmann *et al.*, 2004).

Le GD2 est donc largement décrit dans les lignées cellulaires et les tissus d'ostéosarcomes, mais l'expression d'OAcGD2 n'a jamais été étudiée. Si l'OAcGD2 est en effet présent dans ces cellules, il représenterait une cible thérapeutique prometteuse : en effet, contrairement au GD2, son absence d'expression sur les nerfs périphériques limite les risques de toxicité associés à son ciblage. Nous avons donc entrepris une analyse exhaustive des gangliosides et des gènes impliqués dans leur biosynthèse afin de déterminer le profil gangliosidique de deux lignées d'ostéosarcomes sensibles et résistants à la doxorubicine. Cette étude vise également à étudier l'impact du profil gangliosidique sur les mécanismes de résistance (voies de signalisation impliquées).

Nous avons commencé par établir un profil gangliosidique de cellules d'ostéosarcome sensibles et résistantes à la doxorubicine. Par RT-qPCR, nous avons quantifié l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des gangliosides. Nous avons observé une forte expression de *ST8SIA* dans les U2OS par RT-qPCR, accompagnée d'une expression du GD2 et d'OAcGD2 par cytométrie de flux. Les analyses par spectrométrie de masse confirment la présence de GD2. La faible expression de *ST8SIA1* dans les U2OSR2 est corrélée à l'expression majoritaire de gangliosides simples tels que GM1, GM2 et GM3, observés en cytométrie en flux et spectrométrie de masse. Les cellules KHOS et KHOSR2 expriment des gangliosides simples GM1, GM2 et GM3. L'augmentation de l'expression de *ST3GAL5* dans les lignées résistantes augmente l'expression des gangliosides simples GM3, GM2 et GM1 par rapport aux lignées sensibles à la doxorubicine.

L'étude des acides sialiques *O*-acétylés suggère une augmentation de Neu5,9Ac₂ dans les lignées cellulaires résistantes par rapport aux lignées sensibles. Notre approche ciblée sur l'OAcGD3 et l'OAcGD2 par cytométrie de flux ne permet pas d'établir de corrélation entre cette augmentation de Neu5,9Ac₂ et l'expression de ces gangliosides *O*-acétylés. Néanmoins, le GD1a pourrait exister sous forme OAcGD1a. D'autres approches comme la séparation des gangliosides par chromatographie sur couche mince suivie par une révélation par une lectine

reconnaissant les acides sialiques 9-*O*-acétylés permettra de compléter cette étude. Cette étude est actuellement effectuée en collaboration avec le Dr Martina Mulhenhoff (Université de Hannovre).

Il semble que les deux lignées utilisées pour notre étude aient donc un profil gangliosidique différent : les U2OS expriment le GD2, comme décrit dans la littérature (Shibuya *et al.*, 2012), et nous montrons pour la première fois l'expression d'OAcGD2 dans cette lignée. Les autres lignées d'ostéosarcome expriment également le OAcGD2 à des niveaux plus faibles. La lignée U2OSR2 présente un profil gangliosidique tout à fait différent de la lignée sensible, avec des gangliosides simples, du fait de la répression de *ST8SIA1*. La lignée KHOS ne semble pas refléter l'expression du GD2 établi dans les tumeurs, mais exprime uniquement des gangliosides simples qui sont augmentés en quantité dans la lignée résistante.

Hanahan et Weinberg ont défini les caractéristiques des cellules cancéreuses incluant le microenvironnement tumoral ; de ce fait, nous ne pouvons nous affranchir de celui-ci (Hanahan, 2022). En effet, des données préliminaires d'OGD2 Pharma montrent que les cellules KHOS présentent *in vivo*, en modèle murin, une forte expression d'OAcGD2 en comparaison aux cellules cultivées *in vitro*. Pour ces raisons, les différentes lignées cellulaires sensibles et résistantes à la doxorubicine seront injectées à des souris Scid. L'injection se fera au niveau du tibia, cette zone a été définie comme la plus appropriée en termes de croissance cellulaire mais également de réponse au traitement à la doxorubicine pour les ostéosarcomes (Crenn *et al.*, 2017). Le prélèvement des tumeurs après sacrifice nous permettra d'analyser les gangliosides par différentes stratégies. Si l'expression d'OAcGD2 augmente dans les cellules résistantes à la doxorubicine par rapport aux cellules sensibles, l'anticorps anti-OAcGD2 pourrait représenter une cible thérapeutique prometteuse.

Nous étudierons également l'impact de l'inhibition de la biosynthèse des gangliosides (par siARN ou inhibiteur), à différents niveaux de la voie de biosynthèse, afin de déterminer si la résistance à la doxorubicine est liée à l'expression des gangliosides. En effet, les ostéosarcomes surexpriment de nombreuses voies de signalisation impliquant des récepteurs à activité tyrosine kinase, comme la voie PI3K/Akt qui surexprime MDM2 (murine double minute 2) et inhibe le suppresseur de tumeur p53 (Nirala *et al.*, 2023). La voie PI3K/Akt est impliquée dans la résistance des cellules cancéreuses aux traitements, et les gangliosides sont impliqués dans l'activation des RTK, qui peuvent activer la voie PI3K/Akt. Il apparaît donc

indispensable d'étudier les liens éventuels entre le profil gangliosidique et la résistance aux drogues, et de déterminer quelles voies de signalisation sont activées dans les différentes lignées cellulaires. Ce travail fait l'objet du projet de Master 2 de Maxime Grember de janvier à juin 2024.

Bibliographie

- Aguirre-Gamboa, R., Gomez-Rueda, H., Martínez-Ledesma, E., Martínez-Torteya, A., Chacolla-Huaringa, R., Rodriguez-Barrientos, A., *et al.* (2013) SurvExpress: An Online Biomarker Validation Tool and Database for Cancer Gene Expression Data Using Survival Analysis. *PLoS One* **8**: e74250.
- Ahmed, M., Goldgur, Y., Hu, J., Guo, H.-F., and Cheung, N.-K.V. (2013) In silico Driven Redesign of a Clinically Relevant Antibody for the Treatment of GD2 Positive Tumors. *PLOS ONE* **8**: e63359.
- Almansour, N.M. (2022) Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. *Front Mol Biosci* **9**: 836417.
- Alvarez-Rueda, N., Desselle, A., Cochonneau, D., Chaumette, T., Clemenceau, B., Leprieur, S., *et al.* (2011) A Monoclonal Antibody to O-Acetyl-GD2 Ganglioside and Not to GD2 Shows Potent Anti-Tumor Activity without Peripheral Nervous System Cross-Reactivity. *PLOS ONE* **6**: e25220.
- Amin, M.B., Greene, F.L., Edge, S.B., Compton, C.C., Gershenwald, J.E., Brookland, R.K., *et al.* (2017) The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **67**: 93–99.
- Arming, S., Wipfler, D., Mayr, J., Merling, A., Vilas, U., Schauer, R., *et al.* (2011) The human Cas1 protein: a sialic acid-specific O-acetyltransferase? *Glycobiology* **21**: 553–564.
- Audry, M., Jeanneau, C., Imberty, A., Harduin-Lepers, A., Delannoy, P., and Breton, C. (2011) Current trends in the structure-activity relationships of sialyltransferases. *Glycobiology* **21**: 716–726.
- Bajjalieh, S.M., Martin, T.F., and Floor, E. (1989) Synaptic vesicle ceramide kinase. A calcium-stimulated lipid kinase that co-purifies with brain synaptic vesicles. *J Biol Chem* **264**: 14354–14360.
- Balaguer, J., García Hidalgo, L., Hladun, R., Márquez Vega, C., and Pérez Alonso, V. (2023) Recent Evidence-Based Clinical Guide for the Use of Dinutuximab Beta in Pediatric Patients with Neuroblastoma. *Target Oncol* **18**: 77–93.
- Barker, E., Mueller, B.M., Handgretinger, R., Herter, M., Yu, A.L., and Reisfeld, R.A. (1991) Effect of a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody on cell-mediated lysis of human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **51**: 144–149.
- Battula, V.L., Shi, Y., Evans, K.W., Wang, R.-Y., Spaeth, E.L., Jacamo, R.O., *et al.* (2012) Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* **122**: 2066–2078.

- Baumann, A.-M.T., Bakkers, M.J.G., Buettner, F.F.R., Hartmann, M., Grove, M., Langereis, M.A., *et al.* (2015) 9-O-Acetylation of sialic acids is catalysed by CASD1 via a covalent acetyl-enzyme intermediate. *Nat Commun* **6**: 7673.
- Benchekroun, M.N., Vrignaud, P., Montaudon, D., and Robert, J. (1988) Alteration of ganglioside composition and metabolism in doxorubicin-resistant rat tumoral cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **963**: 553–557.
- Bhadwal, P., Dahiya, D., Shinde, D., Vaiphei, K., Math, R.G.H., Randhawa, V., and Agnihotri, N. (2020) LC-HRMS based approach to identify novel sphingolipid biomarkers in breast cancer patients. *Sci Rep* **10**: 4668.
- Bhadwal, P., Randhawa, V., Vaiphei, K., Dahiya, D., and Agnihotri, N. (2022) Clinical relevance of CERK and SPHK1 in breast cancer and their association with metastasis and drug resistance. *Sci Rep* **12**: 18239.
- Bijgaart, R.J.E. van den, Kroesen, M., Brok, I.C., Reijnen, D., Wassink, M., Boon, L., *et al.* (2020) Anti-GD2 antibody and Vorinostat immunocombination therapy is highly effective in an aggressive orthotopic neuroblastoma model. *Oncoimmunology* **9**: 1817653.
- Bijgaart, R.J.E. van den, Kroesen, M., Wassink, M., Brok, I.C., Kers-Rebel, E.D., Boon, L., *et al.* (2019) Combined sialic acid and histone deacetylase (HDAC) inhibitor treatment up-regulates the neuroblastoma antigen GD2. *J Biol Chem* **294**: 4437–4449.
- Billy, E. de, Pellegrino, M., Orlando, D., Pericoli, G., Ferretti, R., Businaro, P., *et al.* (2022) Dual IGF1R/IR inhibitors in combination with GD2-CAR T-cells display a potent anti-tumor activity in diffuse midline glioma H3K27M-mutant. *Neuro Oncol* **24**: 1150–1163.
- Birks, S.M., Danquah, J.O., King, L., Vlasak, R., Gorecki, D.C., and Pilkington, G.J. (2011) Targeting the GD3 acetylation pathway selectively induces apoptosis in glioblastoma. *Neuro-Oncology* **13**: 950–960.
- Biswas, K., Yoshioka, K., Asanuma, K., Okamoto, Y., Takuwa, N., Sasaki, T., and Takuwa, Y. (2013) Essential role of class II phosphatidylinositol-3-kinase-C2 α in sphingosine 1-phosphate receptor-1-mediated signaling and migration in endothelial cells. *J Biol Chem* **288**: 2325–2339.
- Bobowski, M., Vincent, A., Steenackers, A., Colomb, F., Van Seuninghen, I., Julien, S., and Delannoy, P. (2013) Estradiol represses the G(D3) synthase gene ST8SIA1 expression in human breast cancer cells by preventing NF κ B binding to ST8SIA1 promoter. *PLoS One* **8**: e62559.
- Bornancin, F. (2011) Ceramide kinase: the first decade. *Cell Signal* **23**: 999–1008.
- Brambilla, D., Zamboni, S., Federici, C., Lugini, L., Lozupone, F., De Mito, A., *et al.* (2012) P-glycoprotein binds to ezrin at amino acid residues 149-242 in the FERM domain and plays a key role in the multidrug resistance of human osteosarcoma. *Int J Cancer* **130**: 2824–2834.
- Bremer, E.G., Schlessinger, J., and Hakomori, S. (1986) Ganglioside-mediated modulation of cell growth. Specific effects of GM3 on tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Biological Chemistry* **261**: 2434–2440.

- Brown, J.R., and Auger, K.R. (2011) Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 4.
- Bubna, A.K. (2015) Vorinostat-An Overview. *Indian J Dermatol* **60**: 419.
- Camacho, L., Ouro, A., Gomez-Larrauri, A., Carracedo, A., and Gomez-Muñoz, A. (2022) Implication of Ceramide Kinase/C1P in Cancer Development and Progression. *Cancers (Basel)* **14**: 227.
- Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., and Mitchell, J.B. (1987) Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* **47**: 936–942.
- Cavdarli, S., Dewald, J.H., Yamakawa, N., Guérardel, Y., Terme, M., Le Doussal, J.-M., *et al.* (2019a) Identification of 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid (Neu5,9Ac2) as main O-acetylated sialic acid species of GD2 in breast cancer cells. *Glycoconj J* **36**: 79–90.
- Cavdarli, S., Groux-Degroote, S., and Delannoy, P. (2019b) Gangliosides: The Double-Edge Sword of Neuro-Ectodermal Derived Tumors. *Biomolecules* **9**: 311.
- Cavdarli, S., Schröter, L., Albers, M., Baumann, A.-M., Vicogne, D., Le Doussal, J.-M., *et al.* (2021) Role of Sialyl-O-Acetyltransferase CASD1 on GD2 Ganglioside O-Acetylation in Breast Cancer Cells. *Cells* **10**: 1468.
- Cavdarli, S., Yamakawa, N., Clarisse, C., Aoki, K., Brysbaert, G., Le Doussal, J.-M., *et al.* (2020) Profiling of O-acetylated Gangliosides Expressed in Neuroectoderm Derived Cells. *Int J Mol Sci* **21**: E370.
- Cazet, A., Bobowski, M., Rombouts, Y., Lefebvre, J., Steenackers, A., Popa, I., *et al.* (2012) The ganglioside G(D2) induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the G(D3) synthase. *Glycobiology* **22**: 806–816.
- Cazet, A., Groux-Degroote, S., Teylaert, B., Kwon, K.-M., Lehoux, S., Slomianny, C., *et al.* (2009) G_{D3} synthase overexpression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *bchm* **390**: 601–609.
- Cazet, A., Lefebvre, J., Adriaenssens, E., Julien, S., Bobowski, M., Grigoriadis, A., *et al.* (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.
- Cerato, E., Birkle, S., Portoukalian, J., Mezazigh, A., Chatal, J.F., and Aubry, J. (1997) Variable region gene segments of nine monoclonal antibodies specific to disialogangliosides (GD2, GD3) and their O-acetylated derivatives. *Hybridoma* **16**: 307–316.
- Chapman, P.B., Morrissey, D., Panageas, K.S., Williams, L., Lewis, J.J., Israel, R.J., *et al.* (2000) Vaccination with a Bivalent GM2 and GD2 Ganglioside Conjugate Vaccine: A Trial Comparing Doses of GD2-Keyhole Limpet Hemocyanin1. *Clinical Cancer Research* **6**: 4658–4662.

Charles A Janeway, J., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M.J. (2001) The components of the immune system. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*. Garland Science, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27092/>. Accessed April 21, 2024.

Charles, I. (2019) *Kuby Immunology 7th Edition 2013*. <http://196.188.170.250:8080/xmlui/handle/123456789/4399>. Accessed April 21, 2024.

Chen, H.Y., Challa, A.K., and Varki, A. (2006) 9-O-Acetylation of Exogenously Added Ganglioside GD3: THE GD3 MOLECULE INDUCES ITS OWN O-ACETYLATION MACHINERY *. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 7825–7833.

Cheng, J.-Y., Hung, J.-T., Lin, J., Lo, F.-Y., Huang, J.-R., Chiou, S.-P., *et al.* (2021) O-Acetyl-GD2 as a Therapeutic Target for Breast Cancer Stem Cells. *Front Immunol* **12**: 791551.

Cheng, M., Santich, B.H., Xu, H., Ahmed, M., Huse, M., and Cheung, N.-K.V. (2016) Successful engineering of a highly potent single-chain variable-fragment (scFv) bispecific antibody to target disialoganglioside (GD2) positive tumors. *Oncoimmunology* **5**: e1168557.

Cheresh, D.A., Reisfeld, R.A., and Varki, A.P. (1984) O-acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science* **225**: 844–846.

Cheung, I.Y., Cheung, N.-K.V., Modak, S., Mauguen, A., Feng, Y., Basu, E., *et al.* (2021) Survival Impact of Anti-GD2 Antibody Response in a Phase II Ganglioside Vaccine Trial Among Patients With High-Risk Neuroblastoma With Prior Disease Progression. *J Clin Oncol* **39**: 215–226.

Cheung, N.K., Kushner, B.H., Yeh, S.D., and Larson, S.M. (1998) 3F8 monoclonal antibody treatment of patients with stage 4 neuroblastoma: a phase II study. *International Journal of Oncology* **12**: 1299–1605.

Cheung, N.K., Lazarus, H., Miraldi, F.D., Abramowsky, C.R., Kallick, S., Saarinen, U.M., *et al.* (1987a) Ganglioside GD2 specific monoclonal antibody 3F8: a phase I study in patients with neuroblastoma and malignant melanoma. *J Clin Oncol* **5**: 1430–1440.

Cheung, N.K., Neely, J.E., Landmeier, B., Nelson, D., and Miraldi, F. (1987b) Targeting of ganglioside GD2 monoclonal antibody to neuroblastoma. *J Nucl Med* **28**: 1577–1583.

Cheung, N.K., Saarinen, U.M., Neely, J.E., Landmeier, B., Donovan, D., and Coccia, P.F. (1985) Monoclonal antibodies to a glycolipid antigen on human neuroblastoma cells. *Cancer Res* **45**: 2642–2649.

Cheung, N.-K.V., Cheung, I.Y., Kushner, B.H., Ostrovnya, I., Chamberlain, E., Kramer, K., and Modak, S. (2012a) Murine anti-GD2 monoclonal antibody 3F8 combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and 13-cis-retinoic acid in high-risk patients with stage 4 neuroblastoma in first remission. *J Clin Oncol* **30**: 3264–3270.

Cheung, N.-K.V., Guo, H., Hu, J., Tassev, D.V., and Cheung, I.Y. (2012b) Humanizing murine IgG3 anti-GD2 antibody m3F8 substantially improves antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity while retaining targeting in vivo. *Oncoimmunology* **1**: 477–486.

- Chumpen Ramirez, S., Ruggiero, F.M., Daniotti, J.L., and Valdez Taubas, J. (2017) Ganglioside glycosyltransferases are S-acylated at conserved cysteine residues involved in homodimerisation. *Biochem J* **474**: 2803–2816.
- Chung, T.-W., Kim, S.-J., Choi, H.-J., Kim, K.-J., Kim, M.-J., Kim, S.-H., *et al.* (2009) Ganglioside GM3 inhibits VEGF/VEGFR-2-mediated angiogenesis: direct interaction of GM3 with VEGFR-2. *Glycobiology* **19**: 229–239.
- Ciucanu, I., and Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* **131**: 209–217.
- Cochonneau, D., Terme, M., Michaud, A., Dorvillius, M., Gautier, N., Frikeche, J., *et al.* (2013) Cell cycle arrest and apoptosis induced by O-acetyl-GD2-specific monoclonal antibody 8B6 inhibits tumor growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett* **333**: 194–204.
- Constantine-Paton, M., Blum, A.S., Mendez-Otero, R., and Barnstable, C.J. (1986) A cell surface molecule distributed in a dorsoventral gradient in the perinatal rat retina. *Nature* **324**: 459–462.
- Cores, E.P., Holland, J.F., Wang, J.J., and Sinks, L.F. (1972) Doxorubicin in disseminated osteosarcoma. *JAMA* **221**: 1132–1138.
- Corfield, A.P., Myerscough, N., Warren, B.F., Durdey, P., Paraskeva, C., and Schauer, R. (1999) Reduction of sialic acid O-acetylation in human colonic mucins in the adenoma-carcinoma sequence. *Glycoconj J* **16**: 307–317.
- Crenn, V., Biteau, K., Amiaud, J., Dumars, C., Guiho, R., Vidal, L., *et al.* (2017) Bone microenvironment has an influence on the histological response of osteosarcoma to chemotherapy: retrospective analysis and preclinical modeling. *Am J Cancer Res* **7**: 2333–2349.
- Crespo, P.M., Muhlinen, N. von, Iglesias-Bartolomé, R., and Daniotti, J.L. (2008) Complex gangliosides are apically sorted in polarized MDCK cells and internalized by clathrin-independent endocytosis. *The FEBS Journal* **275**: 6043–6056.
- D'Angelo, G., Uemura, T., Chuang, C.-C., Polishchuk, E., Santoro, M., Ohvo-Rekilä, H., *et al.* (2013) Vesicular and non-vesicular transport feed distinct glycosylation pathways in the Golgi. *Nature* **501**: 116–120.
- 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 Meer, G. van (2004) The cell biology of glycosphingolipids. *Semin Cell Dev Biol* **15**: 375–387.
- Dewald, J.H., Cavdarli, S., Steenackers, A., Delannoy, C.P., Mortuaire, M., Spriet, C., *et al.* (2018) TNF differentially regulates ganglioside biosynthesis and expression in breast cancer cell lines. *PLoS One* **13**: e0196369.

Dhillon, S. (2015) Dinutuximab: first global approval. *Drugs* **75**: 923–927.

Diana, A., Carlino, F., Franzese, E., Oikonomidou, O., Criscitiello, C., De Vita, F., *et al.* (2020) Early Triple Negative Breast Cancer: Conventional Treatment and Emerging Therapeutic Landscapes. *Cancers (Basel)* **12**: 819.

Dinutuximab Overview - Creative Biolabs <https://www.creativebiolabs.net/dinutuximab-overview.htm>. Accessed April 21, 2024.

Dong, Y., Ikeda, K., Hamamura, K., Zhang, Q., Kondo, Y., Matsumoto, Y., *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 Science* **101**: 2039–2047.

Dotti, G., Gottschalk, S., Savoldo, B., and Brenner, M.K. (2014) Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunological Reviews* **257**: 107–126.

Dubois, C., Manuguerra, J.C., Hauttecoeur, B., and Maze, J. (1990) Monoclonal antibody A2B5, which detects cell surface antigens, binds to ganglioside GT3 (II3 (NeuAc)3LacCer) and to its 9-O-acetylated derivative. *J Biol Chem* **265**: 2797–2803.

Duchemin, A.-M., Ren, Q., H.Neff, N., and Hadjiconstantinou, M. (2002) GM1 ganglioside induces phosphorylation and activation of Trk and Erk in brain. 696–707.

Elamrani, A., Khyatti, M., Benhessou, M., Attaleb, M., and Ennaji, M.M. (2013) Cancer du sein : Données Actuelles Breast cancer : Current Datas. *ScienceLib Editions Mersenne Volume 5*.

Elis, W., Triantafellow, E., Wolters, N.M., Sian, K.R., Caponigro, G., Borawski, J., *et al.* (2008) Down-regulation of class II phosphoinositide 3-kinase alpha expression below a critical threshold induces apoptotic cell death. *Mol Cancer Res* **6**: 614–623.

Etchevers, H.C., Dupin, E., and Le Douarin, N.M. (2019) The diverse neural crest: from embryology to human pathology. *Development* **146**: dev169821.

Falasca, M., Hughes, W.E., Dominguez, V., Sala, G., Fostira, F., Fang, M.Q., *et al.* (2007) The role of phosphoinositide 3-kinase C2alpha in insulin signaling. *J Biol Chem* **282**: 28226–28236.

Federico, S.M., McCarville, M.B., Shulkin, B.L., Sondel, P.M., Hank, J.A., Hutson, P., *et al.* (2017) A Pilot Trial of Humanized Anti-GD2 Monoclonal Antibody (hu14.18K322A) with Chemotherapy and Natural Killer Cells in Children with Recurrent/Refractory Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **23**: 6441–6449.

Fitzpatrick, A., and Tutt, A. (2019) Controversial issues in the neoadjuvant treatment of triple-negative breast cancer. *Ther Adv Med Oncol* **11**: 1758835919882581.

Fleurence, J., Cochonneau, D., Fougeray, S., Oliver, L., Geraldo, F., Terme, M., *et al.* (2016) Targeting and killing glioblastoma with monoclonal antibody to O-acetyl GD2 ganglioside. *Oncotarget* **7**: 41172–41185.

- Frost, J.D., Hank, J.A., Reaman, G.H., Friedrich, S., Seeger, R.C., Gan, J., *et al.* (1997) A phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus interleukin-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the Children's Cancer Group. *Cancer* **80**: 317–333.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E., and Cantley, L.C. (1998) Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: 481–507.
- Fukumoto, S., Mutoh, T., Hasegawa, T., Miyazaki, H., Okada, M., Goto, G., *et al.* (2000) GD3 Synthase Gene Expression in PC12 Cells Results in the Continuous Activation of TrkA and ERK1/2 and Enhanced Proliferation *. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 5832–5838.
- Furman, W.L., McCarville, B., Shulkin, B.L., Davidoff, A., Krasin, M., Hsu, C.-W., *et al.* (2022) Improved Outcome in Children With Newly Diagnosed High-Risk Neuroblastoma Treated With Chemoimmunotherapy: Updated Results of a Phase II Study Using hu14.18K322A. *J Clin Oncol* **40**: 335–344.
- 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.
- Gaidarov, I., Smith, M.E.K., Domin, J., and Keen, J.H. (2001) The Class II Phosphoinositide 3-Kinase C2 α Is Activated by Clathrin and Regulates Clathrin-Mediated Membrane Trafficking. *Molecular Cell* **7**: 443–449.
- Gasparini, M., Rouesse, J., Oosterom, A. van, Wagener, T., Somers, R., Russel, J.A., *et al.* (1985) Phase II study of cisplatin in advanced osteogenic sarcoma. European Organization for Research on Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Cancer Treat Rep* **69**: 211–213.
- Gelderman, K.A., Tomlinson, S., Ross, G.D., and Gorter, A. (2004) Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol* **25**: 158–164.
- Giraud, C.G., Daniotti, J.L., and Maccioni, H.J.F. (2001) Physical and functional association of glycolipid N-acetyl-galactosaminyl and galactosyl transferases in the Golgi apparatus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 1625–1630.
- Giraud, C.G., and Maccioni, H.J.F. (2003) Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells. *J Biol Chem* **278**: 40262–40271.
- Golinelli, G., Grisendi, G., Dall'Ora, M., Casari, G., Spano, C., Talami, R., *et al.* (2022) Anti-GD2 CAR MSCs against metastatic Ewing's sarcoma. *Transl Oncol* **15**: 101240.
- Gomez-Larrauri, A., Ouro, A., Trueba, M., and Gomez-Muñoz, A. (2021) Regulation of cell growth, survival and migration by ceramide 1-phosphate - implications in lung cancer progression and inflammation. *Cellular Signalling* **83**: 109980.
- Gómez-Muñoz, A., Kong, J.Y., Salh, B., and Steinbrecher, U.P. (2004) Ceramide-1-phosphate blocks apoptosis through inhibition of acid sphingomyelinase in macrophages. *J Lipid Res* **45**: 99–105.

- Gouazé, V., Liu, Y.-Y., Prickett, C.S., Yu, J.Y., Giuliano, A.E., and Cabot, M.C. (2005) Glucosylceramide synthase blockade down-regulates P-glycoprotein and resensitizes multidrug-resistant breast cancer cells to anticancer drugs. *Cancer Res* **65**: 3861–3867.
- Goulet, D.R., and Atkins, W.M. (2020) Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *J Pharm Sci* **109**: 74–103.
- Graf, C., Klumpp, M., Habig, M., Rovina, P., Billich, A., Baumruker, T., *et al.* (2008) Targeting ceramide metabolism with a potent and specific ceramide kinase inhibitor. *Mol Pharmacol* **74**: 925–932.
- Gray, J., Moreno, L., Weston, R., Barone, G., Rubio, A., Makin, G., *et al.* (2022) BEACON-Immuno: Results of the dinutuximab beta (dB) randomization of the BEACON-Neuroblastoma phase 2 trial—A European Innovative Therapies for Children with Cancer (ITCC–International Society of Paediatric Oncology Europe Neuroblastoma Group (SIOPEN) trial. *JCO* **40**: 10002–10002.
- Gulluni, F., De Santis, M.C., Margaria, J.P., Martini, M., and Hirsch, E. (2019) Class II PI3K Functions in Cell Biology and Disease. *Trends Cell Biol* **29**: 339–359.
- Gulluni, F., Martini, M., Santis, M.C.D., Campa, C.C., Ghigo, A., Margaria, J.P., *et al.* (2017) Mitotic Spindle Assembly and Genomic Stability in Breast Cancer Require PI3K-C2 α Scaffolding Function. *Cancer Cell* **32**: 444-459.e7.
- Gusterson, B.A., and Stein, T. (2012) Human breast development. *Semin Cell Dev Biol* **23**: 567–573.
- Guthmann, M.D., Bitton, R.J., Carnero, A.J.L., Gabri, M.R., Cinat, G., Koliren, L., *et al.* (2004) Active specific immunotherapy of melanoma with a GM3 ganglioside-based vaccine: a report on safety and immunogenicity. *J Immunother* **27**: 442–451.
- Haar Àvila, I. van der, Windhouwer, B., and Vliet, S.J. van (2023) Current state-of-the-art on ganglioside-mediated immune modulation in the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* **42**: 941–958.
- Haga, Y., Hatanaka, K., and Hakomori, S. (2008) Effect of lipid mimetics of GM3 and lyso-GM3 dimer on EGF receptor tyrosine kinase and EGF-induced signal transduction. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 393–404.
- Hakomori, S. (1981) Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **50**: 733–764.
- Hama, Y., Li, Y.-T., and Li, S.-C. (1997) Interaction of GM2 Activator Protein with Glycosphingolipids *. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 2828–2833.
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., and Nishijima, M. (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**: 803–809.
- Hanahan, D. (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **12**: 31–46.

- Hanson, Q.M., and Barb, A.W. (2015) A perspective on the structure and receptor binding properties of immunoglobulin G Fc. *Biochemistry* **54**: 2931–2942.
- 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.
- Harduin-Lepers, A. (2023) The vertebrate sialylation machinery: structure-function and molecular evolution of GT-29 sialyltransferases. *Glycoconj J* **40**: 473–492.
- Hatano, K., Miyamoto, Y., Nonomura, N., and Kaneda, Y. (2011) Expression of gangliosides, GD1a, and sialyl paragalactoside 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. *International Journal of Cancer* **129**: 1838–1847.
- Heiner, J.P., Miraldi, F., Kallick, S., Makley, J., Neely, J., Smith-Mensah, W.H., and Cheung, N.K. (1987) Localization of GD2-specific monoclonal antibody 3F8 in human osteosarcoma. *Cancer Res* **47**: 5377–5381.
- Helling, F., and Livingston, P.O. (1994) Ganglioside conjugate vaccines. Immunotherapy against tumors of neuroectodermal origin. *Mol Chem Neuropathol* **21**: 299–309.
- Hersey, P., and Jamal, O. (1989) Expression of the gangliosides GD3 and GD2 on lymphocytes in tissue sections of melanoma. *Pathology* **21**: 51–58.
- Hingorani, P., Krailo, M., Buxton, A., Hutson, P., Sondel, P.M., Diccianni, M., *et al.* (2022) Phase 2 study of anti-disialoganglioside antibody, dinutuximab, in combination with GM-CSF in patients with recurrent osteosarcoma: A report from the Children’s Oncology Group. *Eur J Cancer* **172**: 264–275.
- Hirabayashi, Y., Hirota, M., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Obata, K., and Ando, S. (1989) Developmentally expressed O-acetyl ganglioside GT3 in fetal rat cerebral cortex. *Neuroscience Letters* **106**: 193–198.
- Hoeflerlin, L.A., Wijesinghe, D.S., and Chalfant, C.E. (2013) The Role of Ceramide-1-Phosphate in Biological Functions. In *Sphingolipids: Basic Science and Drug Development*. Gulbins, E., and Petrache, I. (eds). Springer, Vienna. pp. 153–166 https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1368-4_8. Accessed April 21, 2024.
- Hoffmann, T.K., Meidenbauer, N., Dworacki, G., Kanaya, H., and Whiteside, T.L. (2000) Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res* **60**: 3542–3549.
- Hugonnet, M., Singh, P., Haas, Q., and Gunten, S. von (2021) The Distinct Roles of Sialyltransferases in Cancer Biology and Onco-Immunology. *Front Immunol* **12** <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2021.799861/full>. Accessed April 21, 2024.

Hwang, W.Y.K., and Foote, J. (2005) Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods* **36**: 3–10.

Iber, H., Zacharias, C., and Sandhoff, K. (1992) 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* **2**: 137–142.

Imai, K., and Takaoka, A. (2006) Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 714–727.

Ito, A., Saito, S., Masuko, T., Oh-eda, M., Matsuura, T., Satoh, M., *et al.* (2001) Monoclonal antibody (5F3) defining renal cell carcinoma-associated antigen disialosyl globopentaosylceramide (V3NeuAcIV6NeuAcGb5), and distribution pattern of the antigen in tumor and normal tissues. *Glycoconj J* **18**: 475–485.

Itoh, M., Kitano, T., Watanabe, M., Kondo, T., Yabu, T., Taguchi, Y., *et al.* (2003) Possible role of ceramide as an indicator of chemoresistance: decrease of the ceramide content via activation of glucosylceramide synthase and sphingomyelin synthase in chemoresistant leukemia. *Clin Cancer Res* **9**: 415–423.

Iwabuchi, K., Prinetti, A., Sonnino, S., Mauri, L., Kobayashi, T., Ishii, K., *et al.* (2008) Involvement of very long fatty acid-containing lactosylceramide in lactosylceramide-mediated superoxide generation and migration in neutrophils. *Glycoconj J* **25**: 357–374.

Iwasawa, T., Zhang, P., Ohkawa, Y., Momota, H., Wakabayashi, T., Ohmi, Y., *et al.* (2018) Enhancement of malignant properties of human glioma cells by ganglioside GD3/GD2. *International Journal of Oncology* **52**: 1255–1266.

Jaffe, N., Farber, S., Traggis, D., Geiser, C., Kim, B.S., Das, L., *et al.* (1973) Favorable response of metastatic osteogenic sarcoma to pulse high-dose methotrexate with citrovorum rescue and radiation therapy. *Cancer* **31**: 1367–1373.

Jean, S., and Kiger, A.A. (2014) Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *J Cell Sci* **127**: 923–928.

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.

Kasprovicz, A., Sophie, G.-D., Lagadec, C., and Delannoy, P. (2022) Role of GD3 Synthase ST8Sia I in Cancers. *Cancers* **14**: 1299.

Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., and Waterfield, M.D. (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 615–675.

Kiura, K., Watarai, S., Ueoka, H., Tabata, M., Gemba, K., Aoe, K., *et al.* (1998) An alteration of ganglioside composition in cisplatin-resistant lung cancer cell line. *Anticancer Res* **18**: 2957–2960.

Klenk, E. (1942) Über die Ganglioside, eine neue Gruppe von zuckerhaltigen Gehirnlipoiden. *273*: 76–86.

Knight, Z.A., Gonzalez, B., Feldman, M.E., Zunder, E.R., Goldenberg, D.D., Williams, O., *et al.* (2006) A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell* **125**: 733–747.

Köhler, G., and Milstein, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495–497.

Kroesen, M., Büll, C., Gielen, P.R., Brok, I.C., Armandari, I., Wassink, M., *et al.* (2016) Anti-GD2 mAb and Vorinostat synergize in the treatment of neuroblastoma. *Oncoimmunology* **5**: e1164919.

Kushner, B., and Cheung, N. (1989) GM-CSF enhances 3F8 monoclonal antibody-dependent cellular cytotoxicity against human melanoma and neuroblastoma. *Blood* **73**: 1936–1941.

Kushner, B.H., Cheung, I.Y., Modak, S., Basu, E.M., Roberts, S.S., and Cheung, N.-K. (2018) Humanized 3F8 Anti-GD2 Monoclonal Antibody Dosing With Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Patients With Resistant Neuroblastoma: A Phase 1 Clinical Trial. *JAMA Oncol* **4**: 1729–1735.

Kushner, B.H., Kramer, K., and Cheung, N.K. (2001) Phase II trial of the anti-G(D2) monoclonal antibody 3F8 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for neuroblastoma. *J Clin Oncol* **19**: 4189–4194.

Kushner, B.H., Kramer, K., Modak, S., and Cheung, N.-K.V. (2011) Successful Multifold Dose Escalation of Anti-GD2 Monoclonal Antibody 3F8 in Patients With Neuroblastoma: A Phase I Study. *JCO* **29**: 1168–1174.

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. *Molecules and Cells* **27**: 113–118.

Kwon, H.-Y., Kim, S.-J., Kim, C.-H., Son, S.-W., Kim, K.-S., Lee, J.-H., *et al.* (2010) Triptolide downregulates human GD3 synthase (hST8Sia I) gene expression in SK-MEL-2 human melanoma cells. *Exp Mol Med* **42**: 849–855.

Ladenstein, R., Pötschger, U., Valteau-Couanet, D., Luksch, R., Castel, V., Yaniv, I., *et al.* (2018) Interleukin 2 with anti-GD2 antibody ch14.18/CHO (dinutuximab beta) in patients with high-risk neuroblastoma (HR-NBL1/SIOPEN): a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **19**: 1617–1629.

- Lamour, N.F., Stahelin, R.V., Wijesinghe, D.S., Maceyka, M., Wang, E., Allegood, J.C., *et al.* (2007) Ceramide kinase uses ceramide provided by ceramide transport protein: localization to organelles of eicosanoid synthesis. *Journal of Lipid Research* **48**: 1293–1304.
- Lang, Z., Guerrero, M., Li, R., and Ladisch, S. (2001) Ganglioside GD1a enhances VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration. *Biochem Biophys Res Commun* **282**: 1031–1037.
- Lannert, H., Bünning, G., Jeckel, D., and Wieland, F.T. (1994) Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus. *FEBS Letters* **342**: 91–96.
- Ledeen, R., and Wu, G. (2011) New findings on nuclear gangliosides: overview on metabolism and function. *Journal of Neurochemistry* **116**: 714–720.
- Ledeen, R., and Wu, G. (2018) Gangliosides of the Nervous System. In *Gangliosides: Methods and Protocols*. Sonnino, S., and Prinetti, A. (eds). Springer, New York, NY. pp. 19–55 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8552-4_2. Accessed April 21, 2024.
- Li, Y., Zhang, H., Merkhher, Y., Chen, L., Liu, N., Leonov, S., and Chen, Y. (2022) Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol* **15**: 121.
- Liang, Y.-J., Ding, Y., Levery, S.B., Lobaton, M., Handa, K., and Hakomori, S. (2013) Differential expression profiles of glycosphingolipids in human breast cancer stem cells vs. cancer non-stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 4968–4973.
- Liu, B., Wu, Y., Zhou, Y., and Peng, D. (2014) Endothelin A receptor antagonism enhances inhibitory effects of anti-ganglioside GD2 monoclonal antibody on invasiveness and viability of human osteosarcoma cells. *PLoS One* **9**: e93576.
- Liu, T., Li, Z., Zhang, Q., Bernstein, K.D.A., Lozano-Calderon, S., Choy, E., *et al.* (2016) Targeting ABCB1 (MDR1) in multi-drug resistant osteosarcoma cells using the CRISPR-Cas9 system to reverse drug resistance. *Oncotarget* **7**: 83502–83513.
- Liu, Y.-Y., Gupta, V., Patwardhan, G.A., Bhinge, K., Zhao, Y., Bao, J., *et al.* (2010) Glucosylceramide synthase upregulates MDR1 expression in the regulation of cancer drug resistance through cSrc and β -catenin signaling. *Molecular Cancer* **9**: 145.
- Liu, Y.Y., Han, T.Y., Giuliano, A.E., and Cabot, M.C. (1999) Expression of glucosylceramide synthase, converting ceramide to glucosylceramide, confers adriamycin resistance in human breast cancer cells. *J Biol Chem* **274**: 1140–1146.
- Liu, Y.-Y., Yu, J.Y., Yin, D., Patwardhan, G.A., Gupta, V., Hirabayashi, Y., *et al.* (2008) A role for ceramide in driving cancer cell resistance to doxorubicin. *FASEB J* **22**: 2541–2551.
- Lourda, M., Trougakos, I.P., and Gonos, E.S. (2007) Development of resistance to chemotherapeutic drugs in human osteosarcoma cell lines largely depends on up-regulation of Clusterin/Apolipoprotein J. *Int J Cancer* **120**: 611–622.
- Lyu, X., Zhao, Q., Hui, J., Wang, T., Lin, M., Wang, K., *et al.* (2022) The global landscape of approved antibody therapies. *Antib Ther* **5**: 233–257.

- Ma, Q., Zhuo, D., Guan, F., Li, X., Yang, X., and Tan, Z. (2022) Vesicular Ganglioside GM1 From Breast Tumor Cells Stimulated Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Recipient MCF-10A Cells. *Front Oncol* **12** <https://www.frontiersin.org/journals/oncology/articles/10.3389/fonc.2022.837930/full>. Accessed April 21, 2024.
- Maalej, K.M., Merhi, M., Inchakalody, V.P., Mestiri, S., Alam, M., Maccalli, C., *et al.* (2023) CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances. *Molecular Cancer* **22**: 20.
- Machy, P., Mortier, E., and Birklé, S. (2023) Biology of GD2 ganglioside: implications for cancer immunotherapy. *Front Pharmacol* **14** <https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2023.1249929/full>. Accessed April 21, 2024.
- Maffucci, T., and Falasca, M. (2014) New insight into the intracellular roles of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem Soc Trans* **42**: 1378–1382.
- Mahajan, V.S., Alsufyani, F., Mattoo, H., Rosenberg, I., and Pillai, S. (2019) Alterations in sialic-acid O-acetylation glycoforms during murine erythrocyte development. *Glycobiology* **29**: 222–228.
- Majzner, R.G., Ramakrishna, S., Yeom, K.W., Patel, S., Chinnasamy, H., Schultz, L.M., *et al.* (2022) GD2-CAR T cell therapy for H3K27M-mutated diffuse midline gliomas. *Nature* **603**: 934–941.
- Malisan, F., Franchi, L., Tomassini, B., Ventura, N., Condò, I., Rippo, M.R., *et al.* (2002) Acetylation suppresses the proapoptotic activity of GD3 ganglioside. *J Exp Med* **196**: 1535–1541.
- Malykh, Y.N., Schauer, R., and Shaw, L. (2001) N-Glycolylneuraminic acid in human tumours. *Biochimie* **83**: 623–634.
- Mandal, C., Schwartz-Albiez, R., and Vlasak, R. (2015) Functions and Biosynthesis of O-Acetylated Sialic Acids. In *SialoGlyco Chemistry and Biology I: Biosynthesis, structural diversity and sialoglycopathologies*. Gerardy-Schahn, R., Delannoy, P., and Itzstein, M. von (eds). Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 1–30 https://doi.org/10.1007/128_2011_310. Accessed April 21, 2024.
- Margaria, J.P., Ratto, E., Gozzelino, L., Li, H., and Hirsch, E. (2019) Class II PI3Ks at the Intersection between Signal Transduction and Membrane Trafficking. *Biomolecules* **9**: 104.
- Markham, A. (2021) Naxitamab: First Approval. *Drugs* **81**: 291–296.
- Marquina, G., Waki, H., Fernandez, L.E., Kon, K., Carr, A., Valiente, O., *et al.* (1996) Gangliosides expressed in human breast cancer. *Cancer Res* **56**: 5165–5171.
- Marti, C., Kroner, T., Remagen, W., Berchtold, W., Cserhati, M., and Varini, M. (1985) High-dose ifosfamide in advanced osteosarcoma. *Cancer Treat Rep* **69**: 115–117.

- 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.F. (2000) GM1 Synthase Depends on N-Glycosylation for Enzyme Activity and Trafficking to the Golgi Complex. *Neurochem Res* **25**: 725–731.
- Mauri, L., Sonnino, S., and Prinetti, A. (2018) Chemical and Physicochemical Properties of Gangliosides. In *Gangliosides: Methods and Protocols*. Sonnino, S., and Prinetti, A. (eds). Springer, New York, NY. pp. 1–17 https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8552-4_1. Accessed April 21, 2024.
- Mennel, H.D., Bosslet, K., Geissel, H., and Bauer, B.L. (2000) Immunohistochemically visualized localisation of gangliosides Glac2 (GD3) and Gtri2 (GD2) in cells of human intracranial tumors. *Experimental and Toxicologic Pathology* **52**: 277–285.
- Merrill, A.H. (2002) De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem* **277**: 25843–25846.
- Merrill, A.H. (2011) Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem Rev* **111**: 6387–6422.
- Michel, C., Echten-Deckert, G. van, Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E., and Merrill, A.H. (1997) Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-trans-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J Biol Chem* **272**: 22432–22437.
- Mirabello, L., Troisi, R.J., and Savage, S.A. (2009) International osteosarcoma incidence patterns in children and adolescents, middle ages and elderly persons. *Int J Cancer* **125**: 229–234.
- 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.
- Mitsutake, S., and Igarashi, Y. (2005) Calmodulin is involved in the Ca²⁺-dependent activation of ceramide kinase as a calcium sensor. *J Biol Chem* **280**: 40436–40441.
- Miyakoshi, L.M., Todeschini, A.R., Mendez-Otero, R., and Hedin-Pereira, C. (2012) Role of the 9-O-acetyl GD3 in subventricular zone neuroblast migration. *Mol Cell Neurosci* **49**: 240–249.
- Molé, C.M., Béne, M.C., Montagne, P.M., Seilles, E., and Faure, G.C. (1994) Light chains of immunoglobulins in human secretions. *Clin Chim Acta* **224**: 191–197.
- Morrison, S.L., Johnson, M.J., Herzenberg, L.A., and Oi, V.T. (1984) Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 6851–6855.

Mountford, J.K., Petitjean, C., Putra, H.W.K., McCafferty, J.A., Setiabakti, N.M., Lee, H., *et al.* (2015) The class II PI 3-kinase, PI3KC2 α , links platelet internal membrane structure to shear-dependent adhesive function. *Nat Commun* **6**: 6535.

Mueller, B.M., Romerdahl, C.A., Gillies, S.D., and Reisfeld, R.A. (1990) Enhancement of antibody-dependent cytotoxicity with a chimeric anti-GD2 antibody. *J Immunol* **144**: 1382–1386.

Mujoo, K., Kipps, T.J., Yang, H.M., Cheresch, D.A., Wargalla, U., Sander, D.J., and Reisfeld, R.A. (1989) Functional properties and effect on growth suppression of human neuroblastoma tumors by isotype switch variants of monoclonal antiganglioside GD2 antibody 14.18. *Cancer Res* **49**: 2857–2861.

Mukherjee, K., Chava, A.K., Mandal, C., Dey, S.N., Kniep, B., Chandra, S., and Mandal, C. (2008) O-acetylation of GD3 prevents its apoptotic effect and promotes survival of lymphoblasts in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Journal of Cellular Biochemistry* **105**: 724–734.

Munn, D.H., and Cheung, N.K. (1989) Antibody-dependent antitumor cytotoxicity by human monocytes cultured with recombinant macrophage colony-stimulating factor. Induction of efficient antibody-mediated antitumor cytotoxicity not detected by isotope release assays. *J Exp Med* **170**: 511–526.

Murray, J.L., Cunningham, J.E., Brewer, H., Mujoo, K., Zukiwski, A.A., Podoloff, D.A., *et al.* (1994) Phase I trial of murine monoclonal antibody 14G2a administered by prolonged intravenous infusion in patients with neuroectodermal tumors. *JCO* **12**: 184–193.

Nakajima, M., Guo, H., Hoseini, S.S., Suzuki, M., Xu, H., and Cheung, N.-K.V. (2021) Potent antitumor effect of T cells armed with anti-GD2 bispecific antibody. *Pediatric Blood & Cancer* **68**: e28971.

Neal, Z.C., Yang, J.C., Rakhmilevich, A.L., Buhtoiarov, I.N., Lum, H.E., Imboden, M., *et al.* (2004) Enhanced activity of hu14.18-IL2 immunocytokine against murine NXS2 neuroblastoma when combined with interleukin 2 therapy. *Clin Cancer Res* **10**: 4839–4847.

Neri, D., and Sondel, P.M. (2016) Immunocytokines for cancer treatment: past, present and future. *Curr Opin Immunol* **40**: 96–102.

Ng, S.K.L., Neo, S.-Y., Yap, Y.-W., Karuturi, R.K.M., Loh, E.S.L., Liau, K.-H., and Ren, E.-C. (2009) Ablation of phosphoinositide-3-kinase class II alpha suppresses hepatoma cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* **387**: 310–315.

Nguyen, K., Yan, Y., Yuan, B., Dasgupta, A., Sun, J., Mu, H., *et al.* (2018) ST8SIA1 Regulates Tumor Growth and Metastasis in TNBC by Activating the FAK-AKT-mTOR Signaling Pathway. *Mol Cancer Ther* **17**: 2689–2701.

Nguyen, R., Zhang, X., Sun, M., Abbas, S., Seibert, C., Kelly, M.C., *et al.* (2022) Anti-GD2 Antibodies Conjugated to IL15 and IL21 Mediate Potent Antitumor Cytotoxicity against Neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **28**: 3785–3796.

Nirala, B.K., Yamamichi, T., and Yustein, J.T. (2023) Deciphering the Signaling Mechanisms of Osteosarcoma Tumorigenesis. *International Journal of Molecular Sciences* **24**: 11367.

Ohkawa, Y., Zhang, P., Momota, H., Kato, A., Hashimoto, N., Ohmi, Y., *et al.* (2021) Lack of GD3 synthase (St8sia1) attenuates malignant properties of gliomas in genetically engineered mouse model. *Cancer Sci* **112**: 3756–3768.

Ozkaynak, M.F., Gilman, A.L., London, W.B., Naranjo, A., Diccianni, M.B., Tenney, S.C., *et al.* (2018) A Comprehensive Safety Trial of Chimeric Antibody 14.18 With GM-CSF, IL-2, and Isotretinoin in High-Risk Neuroblastoma Patients Following Myeloablative Therapy: Children's Oncology Group Study ANBL0931. *Front Immunol* **9** <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2018.01355/full>. Accessed April 21, 2024.

Parameswaran, R., Lim, M., Arutyunyan, A., Abdel-Azim, H., Hurtz, C., Lau, K., *et al.* (2013) O-acetylated N-acetylneuraminic acid as a novel target for therapy in human pre-B acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* **210**: 805–819.

Park, J.A., Santich, B.H., Xu, H., Lum, L.G., and Cheung, N.-K.V. (2021) Potent ex vivo armed T cells using recombinant bispecific antibodies for adoptive immunotherapy with reduced cytokine release. *J Immunother Cancer* **9**: e002222.

Park, S.S. (2019) Post-Glycosylation Modification of Sialic Acid and Its Role in Virus Pathogenesis. *Vaccines (Basel)* **7**: 171.

Pastukhov, O., Schwalm, S., Zangemeister-Wittke, U., Fabbro, D., Bornancin, F., Japtok, L., *et al.* (2014) The ceramide kinase inhibitor NVP-231 inhibits breast and lung cancer cell proliferation by inducing M phase arrest and subsequent cell death. *Br J Pharmacol* **171**: 5829–5844.

Payne, A.W., Pant, D.K., Pan, T., and Chodosh, L.A. (2014) Ceramide Kinase Promotes Tumor Cell Survival and Mammary Tumor Recurrence. *Cancer Res* **74**: 6352–6363.

Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.

Poon, V.I., Roth, M., Piperdi, S., Geller, D., Gill, J., Rudzinski, E.R., *et al.* (2015) Ganglioside GD2 expression is maintained upon recurrence in patients with osteosarcoma. *Clinical Sarcoma Research* **5**: 4.

Posor, Y., Eichhorn-Gruenig, M., Puchkov, D., Schöneberg, J., Ullrich, A., Lampe, A., *et al.* (2013) Spatiotemporal control of endocytosis by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Nature* **499**: 233–237.

Prokazova, N.V., Samovilova, N.N., Gracheva, E.V., and Golovanova, N.K. (2009) Ganglioside GM3 and its biological functions. *Biochemistry Moscow* **74**: 235–249.

Qin, C., Liu, S., Zhou, S., Wang, Q., Xia, X., Hu, J., *et al.* (2023) PIK3C2A is a prognostic biomarker that is linked to immune infiltrates in kidney renal clear cell carcinoma. *Front Immunol* **14**

<https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1114572/full>. Accessed April 21, 2024.

Raiser, P., Schleiermacher, G., Gambart, M., Dumont, B., Defachelles, A.-S., Thebaud, E., *et al.* (2024) Chemo-immunotherapy with dinutuximab beta in patients with relapsed/progressive high-risk neuroblastoma: does chemotherapy backbone matter? *European Journal of Cancer* **202** [https://www.ejancer.com/article/S0959-8049\(24\)00157-6/fulltext](https://www.ejancer.com/article/S0959-8049(24)00157-6/fulltext). Accessed April 21, 2024.

Rajput, K., Ansari, M.N., Jha, S.K., Pani, T., Medatwal, N., Chattopadhyay, S., *et al.* (2022) Ceramide Kinase (CERK) Emerges as a Common Therapeutic Target for Triple Positive and Triple Negative Breast Cancer Cells. *Cancers (Basel)* **14**: 4496.

Reivinen, J., Holthöfer, H., and Miettinen, A. (1994) O-Acetyl GD3 ganglioside in human peripheral blood T lymphocytes. *International Immunology* **6**: 1409–1416.

Ren, X., and Su, C. (2020) Sphingosine kinase 1 contributes to doxorubicin resistance and glycolysis in osteosarcoma. *Molecular Medicine Reports* **22**: 2183–2190.

Research, C. for D.E. and (2021) FDA grants accelerated approval to naxitamab for high-risk neuroblastoma in bone or bone marrow. *FDA* <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-grants-accelerated-approval-naxitamab-high-risk-neuroblastoma-bone-or-bone-marrow>. Accessed April 21, 2024.

Rippo, M.R., Malisan, F., Ravagnan, L., Tomassini, B., IP, C., Costantini, P., *et al.* (2000) GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **14**: 2047–54.

Rivera, I.-G., Ordoñez, M., Presa, N., Gangoiti, P., Gomez-Larrauri, A., Trueba, M., *et al.* (2016) Ceramide 1-phosphate regulates cell migration and invasion of human pancreatic cancer cells. *Biochem Pharmacol* **102**: 107–119.

Rosenbaum, E., Chugh, R., Ryan, C.W., Agulnik, M., Milhem, M.M., George, S., *et al.* (2022) A randomised phase II trial of a trivalent ganglioside vaccine targeting GM2, GD2 and GD3 combined with immunological adjuvant OPT-821 versus OPT-821 alone in metastatic sarcoma patients rendered disease-free by surgery. *Eur J Cancer* **176**: 155–163.

Roth, M., Linkowski, M., Tarim, J., Piperdi, S., Sowers, R., Geller, D., *et al.* (2014) Ganglioside GD2 as a Therapeutic Target for Antibody-Mediated Therapy in Osteosarcoma. *Cancer* **120**: 548–554.

Rother, J., Echten, G. van, Schwarzmann, G., and Sandhoff, K. (1992) Biosynthesis of sphingolipids: Dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **189**: 14–20.

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., *et al.* (2009) Gene expression of ceramide kinase, galactosyl ceramide synthase and ganglioside GD3 synthase is associated with prognosis in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* **135**: 1005–1013.
- Sahagan, B.G., Dorai, H., Saltzgeber-Muller, J., Toneguzzo, F., Guindon, C.A., Lilly, S.P., *et al.* (1986) A genetically engineered murine/human chimeric antibody retains specificity for human tumor-associated antigen. *J Immunol* **137**: 1066–1074.
- Saito, M., Yu, R.K., and Cheung, N.-K.V. (1985) Ganglioside GD2 specificity of monoclonal antibodies to human neuroblastoma cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **127**: 1–7.
- Saleh, M.N., Khazaeli, M.B., Wheeler, R.H., Dropcho, E., Liu, T., Urist, M., *et al.* (1992) Phase I trial of the murine monoclonal anti-GD2 antibody 14G2a in metastatic melanoma. *Cancer Res* **52**: 4342–4347.
- Sarkar, A., Banerjee, S., and Biswas, K. (2023) Multi-dimensional role of gangliosides in modulating cancer hallmarks and their prospects in targeted cancer therapy. *Front Pharmacol* **14**
<https://www.frontiersin.org/journals/pharmacology/articles/10.3389/fphar.2023.1282572/full>. Accessed April 21, 2024.
- Schauer, R. (2009) Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. *Curr Opin Struct Biol* **19**: 507–514.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., *et al.* (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676–682.
- Schnaar, R.L. (2023) Gangliosides as Siglec ligands. *Glycoconj J* **40**: 159–167.
- Schuetz, C.G., Doering, T., Kolter, T., and Sandhoff, K. (1999) The Glycosphingolipidoses from Disease to Basic Principles of Metabolism. **380**: 759–766.
- Schwalm, S., Erhardt, M., Römer, I., Pfeilschifter, J., Zangemeister-Wittke, U., and Huwiler, A. (2020) Ceramide Kinase Is Upregulated in Metastatic Breast Cancer Cells and Contributes to Migration and Invasion by Activation of PI 3-Kinase and Akt. *Int J Mol Sci* **21**: 1396.
- Serra, M., Pasello, M., Manara, M.C., Scotlandi, K., Ferrari, S., Bertoni, F., *et al.* (2006) May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol. *Int J Oncol* **29**: 1459–1468.
- Shammout, O.D.A., Ashmawy, N.S., Shakartalla, S.B., Altaie, A.M., Semreen, M.H., Omar, H.A., and Soliman, S.S.M. (2021) Comparative sphingolipidomic analysis reveals significant differences between doxorubicin-sensitive and -resistance MCF-7 cells. *PLoS One* **16**: e0258363.
- Shibuya, H., Hamamura, K., Hotta, H., Matsumoto, Y., Nishida, Y., Hattori, H., *et al.* (2012) Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Sci* **103**: 1656–1664.

- Shields, R.L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L.Y., Hong, K., Meng, Y.G., *et al.* (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* **277**: 26733–26740.
- Shusterman, S., London, W.B., Gillies, S.D., Hank, J.A., Voss, S.D., Seeger, R.C., *et al.* (2010) Antitumor activity of hu14.18-IL2 in patients with relapsed/refractory neuroblastoma: a Children's Oncology Group (COG) phase II study. *J Clin Oncol* **28**: 4969–4975.
- Simanshu, D.K., Kamlekar, R.K., Wijesinghe, D.S., Zou, X., Zhai, X., Mishra, S.K., *et al.* (2013) Non-vesicular trafficking by a ceramide-1-phosphate transfer protein regulates eicosanoids. *Nature* **500**: 463–467.
- Singh, S., Kaushik, A.C., Gupta, H., Jhinharia, D., and Sahi, S. (2023) Identification of prognostic markers and potential therapeutic targets using gene expression profiling and simulation studies in pancreatic cancer. *Curr Comput Aided Drug Des* .
- Skaper, S.D., Katoh-Semba, R., and Varon, S. (1985) GM1 ganglioside accelerates neurite outgrowth from primary peripheral and central neurons under selected culture conditions. *Developmental Brain Research* **23**: 19–26.
- Skov, L., Chan, L.S., Fox, D.A., Larsen, J.K., Voorhees, J.J., Cooper, K.D., and Baadsgaard, O. (1997) Lesional psoriatic T cells contain the capacity to induce a T cell activation molecule CDw60 on normal keratinocytes. *Am J Pathol* **150**: 675–683.
- Sonnino, S., Acquotti, D., Fronza, G., Cantù, L., Chigorno, V., Pitto, M., *et al.* (1988) Semisynthetic preparation of *N*-glycolylneuraminic acid containing GM1 ganglioside: chemical characterization, physico-chemical properties and some biochemical features. *Chemistry and Physics of Lipids* **46**: 181–191.
- Sorkin, L.S., Otto, M., Baldwin, W.M., Vail, E., Gillies, S.D., Handgretinger, R., *et al.* (2010) Anti-GD(2) with an FC point mutation reduces complement fixation and decreases antibody-induced allodynia. *Pain* **149**: 135–142.
- Stewart, R., Hammond, S.A., Oberst, M., and Wilkinson, R.W. (2014) The role of Fc gamma receptors in the activity of immunomodulatory antibodies for cancer. *J Immunother Cancer* **2**: 29.
- Sugiura, M., Kono, K., Liu, H., Shimizugawa, T., Minekura, H., Spiegel, S., and Kohama, T. (2002) Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *J Biol Chem* **277**: 23294–23300.
- Sun, J.C., Lopez-Verges, S., Kim, C.C., DeRisi, J.L., and Lanier, L.L. (2011) NK cells and immune "memory." *J Immunol* **186**: 1891–1897.
- Suzuki, Y., Yanagisawa, M., Ariga, T., and K.YU, R. (2011) Histone acetylation-mediated glycosyltransferase gene regulation in mouse brain during development. *Journal of Neurochemistry* 874–880.
- Svennerholm, L. (1980) Ganglioside designation. *Adv Exp Med Biol* **125**: 11.

Svennerholm, L., Boström, K., Fredman, P., Månsson, J.-E., Rosengren, B., and Rynmark, B.-M. (1989) Human brain gangliosides: developmental changes from early fetal stage to advanced age. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1005**: 109–117.

Svennerholm, L., Rynmark, B.-M., Vilbergsson, G., Fredman, P., Gottfries, J., Månsson, J.-E., and Percy, A. (1991) Gangliosides in Human Fetal Brain. *Journal of Neurochemistry* **56**: 1763–1768.

Taha, T.A., Mullen, T.D., and Obeid, L.M. (2006) A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta* **1758**: 2027–2036.

Takematsu, H., Diaz, S., Stoddart, A., Zhang, Y., and Varki, A. (1999) Lysosomal and Cytosolic Sialic Acid 9-O-Acetyltransferase Activities Can Be Encoded by One Gene via Differential Usage of a Signal Peptide-encoding Exon at the N Terminus *. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 25623–25631.

Terme, M., Dorvillius, M., Cochonneau, D., Chaumette, T., Xiao, W., Diccianni, M.B., *et al.* (2014) Chimeric Antibody c.8B6 to O-Acetyl-GD2 Mediates the Same Efficient Anti-Neuroblastoma Effects as Therapeutic ch14.18 Antibody to GD2 without Antibody Induced Allodynia. *PLOS ONE* **9**: e87210.

Tettamanti, G. (2003) Ganglioside/glycosphingolipid turnover: New concepts. *Glycoconj J* **20**: 301–317.

The nomenclature of lipids (recommendations 1976). IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (1978) *J Lipid Res* **19**: 114–128.

Uliana, A.S., Crespo, P.M., Martina, J.A., Daniotti, J.L., and Maccioni, H.J.F. (2006) Modulation of GalT1 and SialT1 Sub-Golgi Localization by SialT2 Expression Reveals an Organellar Level of Glycolipid Synthesis Control *. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 32852–32860.

Valcovici, M., Andrica, F., Serban, C., and Dragan, S. (2016) Cardiotoxicity of anthracycline therapy: current perspectives. *Arch Med Sci* **12**: 428–435.

Vandamme-Feldhaus, V., and Schauer, R. (1998) Characterization of the Enzymatic 7- O-Acetylation of Sialic Acids and Evidence for Enzymatic O-Acetyl Migration from C-7 to C-9 in Bovine Submandibular Gland1. *The Journal of Biochemistry* **124**: 111–121.

Varki, A. (2001) Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. *Am J Phys Anthropol* **Suppl 33**: 54–69.

Varki, A., Cummings, R.D., Aebi, M., Packer, N.H., Seeberger, P.H., Esko, J.D., *et al.* (2015) Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans. *Glycobiology* **25**: 1323–1324.

Visser, E.A., Moons, S.J., Timmermans, S.B.P.E., Jong, H. de, Boltje, T.J., and Büll, C. (2021) Sialic acid O-acetylation: From biosynthesis to roles in health and disease. *J Biol Chem* **297**: 100906.

Voduc, K.D., Cheang, M.C.U., Tyldesley, S., Gelmon, K., Nielsen, T.O., and Kennecke, H. (2010) Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol* **28**: 1684–1691.

- Wegner, M.-S., Gruber, L., Mattjus, P., Geisslinger, G., and Grösch, S. (2018) The UDP-glucose ceramide glycosyltransferase (UGCG) and the link to multidrug resistance protein 1 (MDR1). *BMC Cancer* **18**: 153.
- Wegner, M.-S., Schiffmann, S., Parnham, M.J., Geisslinger, G., and Grösch, S. (2016) The enigma of ceramide synthase regulation in mammalian cells. *Prog Lipid Res* **63**: 93–119.
- Wieczorek, A., Zaniewska-Tekieli, A., Ehlert, K., Pawinska-Wasikowska, K., Balwierz, W., and Lode, H. (2023) Dinutuximab beta combined with chemotherapy in patients with relapsed or refractory neuroblastoma. *Front Oncol* **13**: 1082771.
- Willinger, M., and Schachner, M. (1980) GM1 ganglioside as a marker for neuronal differentiation in mouse cerebellum. *Developmental Biology* **74**: 101–117.
- Xu, H., Cheng, M., Guo, H., Chen, Y., Huse, M., and Cheung, N.-K.V. (2015) Retargeting T cells to GD2 pentasaccharide on human tumors using Bispecific humanized antibody. *Cancer Immunol Res* **3**: 266–277.
- Xu, X., Huang, W., Heczey, A., Liu, D., Guo, L., Wood, M., *et al.* (2019) NKT cells co-expressing a GD2-specific chimeric antigen receptor and IL-15 show enhanced in vivo persistence and antitumor activity against neuroblastoma. *Clin Cancer Res* **25**: 7126–7138.
- Yamaji, T., Kumagai, K., Tomishige, N., and Hanada, K. (2008) Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: Their roles in sphingolipid metabolism. *IUBMB Life* **60**: 511–518.
- Yamamoto, A., Haraguchi, M., Yamashiro, S., Fukumoto, S., Furukawa, K., Takamiya, K., *et al.* (1996) Heterogeneity in the expression pattern of two ganglioside synthase genes during mouse brain development. *JNEUROCHEM* **66**: 26–34.
- Yamamoto, Y., Higashimoto, K., Ohkawa, Y., Soejima, H., Kaneko, K., Ohmi, Y., *et al.* (2023) Possible regulation of ganglioside GD3 synthase gene expression with DNA methylation in human glioma cells. *Glycoconjugate Journal* **40**: 1–10.
- Yang, L., Ma, X., Liu, Y.-C., Zhao, W., Yu, L., Qin, M., *et al.* (2017) Chimeric Antigen Receptor 4SCAR-GD2-Modified T Cells Targeting High-Risk and Recurrent Neuroblastoma: A Phase II Multi-Center Trial in China. *Blood* **130**: 3335.
- Yankelevich, M., Modak, S., Chu, R., Lee, D.W., Thakur, A., Cheung, N.-K.V., and Lum, L.G. (2019) Phase I study of OKT3 x hu3F8 bispecific antibody (GD2Bi) armed T cells (GD2BATs) in GD2-positive tumors. *JCO* **37**: 2533–2533.
- Yao, C., Wu, S., Li, D., Ding, H., Wang, Z., Yang, Y., *et al.* (2012) Co-administration phenoxodiol with doxorubicin synergistically inhibit the activity of sphingosine kinase-1 (SphK1), a potential oncogene of osteosarcoma, to suppress osteosarcoma cell growth both in vivo and in vitro. *Mol Oncol* **6**: 392–404.
- Yersal, O., and Barutca, S. (2014) Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World Journal of Clinical Oncology* **5**: 412–424.

- Yesmin, F., Bhuiyan, R.H., Ohmi, Y., Yamamoto, S., Kaneko, K., Ohkawa, Y., *et al.* (2022) Ganglioside GD2 Enhances the Malignant Phenotypes of Melanoma Cells by Cooperating with Integrins. *International Journal of Molecular Sciences* **23**: 423.
- Yi, Y.W., Hong, W., Kang, H.J., Kim, H.J., Zhao, W., Wang, A., *et al.* (2013) Inhibition of the PI3K/AKT pathway potentiates cytotoxicity of EGFR kinase inhibitors in triple-negative breast cancer cells. *J Cell Mol Med* **17**: 648–656.
- Yin, L., Duan, J.-J., Bian, X.-W., and Yu, S. (2020) Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research* **22**: 61.
- Yoshida, H., Koodie, L., Jacobsen, K., Hanzawa, K., Miyamoto, Y., and Yamamoto, M. (2020) B4GALNT1 induces angiogenesis, anchorage independence growth and motility, and promotes tumorigenesis in melanoma by induction of ganglioside GM2/GD2. *Sci Rep* **10**: 1199.
- 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.
- Yoshioka, K., Yoshida, K., Cui, H., Wakayama, T., Takuwa, N., Okamoto, Y., *et al.* (2012) Endothelial PI3K-C2 α , a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nat Med* **18**: 1560–1569.
- Yu, A.L., Gilman, A.L., Ozkaynak, M.F., London, W.B., Kreissman, S.G., Chen, H.X., *et al.* (2010) Anti-GD2 Antibody with GM-CSF, Interleukin-2, and Isotretinoin for Neuroblastoma. *N Engl J Med* **363**: 1324–1334.
- Yu, L., Huang, L., Lin, D., Lai, X., Wu, L., Liao, X., *et al.* (2022) GD2-specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the treatment of refractory and/or recurrent neuroblastoma in pediatric patients. *J Cancer Res Clin Oncol* **148**: 2643–2652.
- Yu, R.K., and Bieberich, E. (2001) Regulation of glycosyltransferases in ganglioside biosynthesis by phosphorylation and dephosphorylation. *Mol Cell Endocrinol* **177**: 19–24.
- Yu, R.K., Bieberich, E., Xia, T., and Zeng, G. (2004) Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system. *J Lipid Res* **45**: 783–793.
- Yu, R.K., Macala, L.J., Taki, T., Weinfield, H.M., and Yu, F.S. (1988) Developmental changes in ganglioside composition and synthesis in embryonic rat brain. *J Neurochem* **50**: 1825–1829.
- Zeng, G., and Yu, R.K. (2008) Cloning and transcriptional regulation of genes responsible for synthesis of gangliosides. *Curr Drug Targets* **9**: 317–324.
- Zhang, J., Webster, S., Duffin, B., Bernstein, M.N., Steill, J., Swanson, S., *et al.* (2023) Generation of anti-GD2 CAR macrophages from human pluripotent stem cells for cancer immunotherapies. *Stem Cell Reports* **18**: 585–596.

Zhu, S., Xu, Y., Wang, L., Liao, S., Wang, Y., Shi, M., *et al.* (2021) Ceramide kinase mediates intrinsic resistance and inferior response to chemotherapy in triple-negative breast cancer by upregulating Ras/ERK and PI3K/Akt pathways. *Cancer Cell Int* **21**: 42.

Zhu, W., Mao, X., Wang, W., Chen, Y., Li, D., Li, H., and Dou, P. (2018) Anti-ganglioside GD2 monoclonal antibody synergizes with cisplatin to induce endoplasmic reticulum-associated apoptosis in osteosarcoma cells. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **73**: 80–86.

Zhuo, D., and Guan, F. (2019) Ganglioside GM1 promotes contact inhibition of growth by regulating the localization of epidermal growth factor receptor from glycosphingolipid-enriched microdomain to caveolae. *Cell Proliferation* **52**: e12639.

Zirngibl, F., Ivasko, S.M., Grunewald, L., Klaus, A., Schwiebert, S., Ruf, P., *et al.* (2021) GD2-directed bispecific trifunctional antibody outperforms dinutuximab beta in a murine model for aggressive metastasized neuroblastoma. *J Immunother Cancer* **9**: e002923.

Zuo, P., Li, Y., He, C., Wang, T., Zheng, X., Liu, H., *et al.* (2023) Anti-tumor efficacy of anti-GD2 CAR NK-92 cells in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Front Immunol* **14** <https://www.frontiersin.org/journals/immunology/articles/10.3389/fimmu.2023.1145706/full>. Accessed April 21, 2024.