

# UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE DE LILLE

Laboratoire de glycobiologie structurale et fonctionnelle UMR CNRS/USTL n°8576

Laboratoire de biologie du développement INSERM ERI8

## THESE DE DOCTORAT

Sciences de la vie et de la santé

Présentée par

**Sylvain JULIEN**

### **L'antigène sialyl-Tn dans le cancer du sein :**

Etude de la *O*-glycosylation et de son influence  
sur la croissance de lignées cellulaires Sialyl-Tn positives.

**Soutenance le 26 Novembre 2004**

#### **Jury :**

Président :	Dr. Jean-Claude MICHALSKI	Université Lille 1
Rapporteurs :	Dr. Joy BURCHELL	Guy's Hospital, Londres
	Pr. Marc MAREEL	Hôpital Universitaire, Gand
Examineur :	Pr. Hubert HONDERMARCK	Université Lille 1
Directeurs :	Pr. Philippe DELANNOY	Université Lille 1
	Pr. Xuefen LE BOURHIS	Université Lille 1

## **Remerciements et autres considérations**

Au cours de mon doctorat, j'ai parfois été frappé par l'aigreur, voire la rancœur, visibles chez certaines personnes. Je trouvais ces sentiments surprenants de la part de personnes qui pourtant s'étaient investies pendant plusieurs années d'études et de travail dans la recherche, et je me suis longtemps interrogé quant à leur origine. Aujourd'hui je crois avoir trouvé une réponse. Elle tient en un seul mot : la confiance.

Faire de la recherche s'est s'employer à démontrer expérimentalement qu'une hypothèse est vraie ou fausse, qu'une idée est bonne ou mauvaise. Pour l'étudiant en DEA, ou le thésard en début de doctorat, l'idée de départ vient d'une autre personne. Il faut implicitement avoir confiance en cette personne, le tuteur, pour dédier les quatre prochaines années de travail à son idée. Et cette confiance doit être réciproque pour que le tuteur accepte de voir son idée défendue par une autre personne, pire, par un débutant. Il y a là une sorte de contrat très personnel qui, lorsqu'il n'est pas rempli, peut-être à l'origine de grands ressentiments de part et d'autre. Faire de la recherche ne peut donc pas être quelque chose de neutre sur un plan personnel. Et quelques soient les précautions ou les artifices dont on s'entourera, on ne pourra rester indifférent à son entourage.

Apprendre à faire de la recherche fut pour moi une activité très sociable et humaine. La communication a souvent été source d'inspiration ou de collaboration. De façon un peu intuitive, j'ai développé de nombreux échanges avec les chercheurs et les doctorants que j'ai côtoyés ces dernières années. J'ai dû aussi apprendre à cultiver ma propre disponibilité. J'espère y être parvenu. Et je tiens à remercier toutes celles et tous ceux qui ont partagé avec moi cet espace temps particulier qu'est la préparation d'une thèse.

**Philippe**, je te remercie d'abord d'avoir accepté de me confier l'idée de base de ce travail. Je pense avoir appris énormément sous ta direction et je pressens que les bénéfices de ton enseignement s'accumuleront encore avec le temps à venir. Tu m'as montré qu'une certaine forme de liberté pouvait s'acheter avec une certaine forme de rigueur, et que la recherche, toute exigeante qu'elle soit, reste une affaire de passionné. Merci pour tout.

**Xuefen**, nous travaillons ensemble depuis sept ans maintenant, même si les quatre dernières années furent sans conteste les plus denses. Avec Bénoni, tu es la première à avoir misé sur mon potentiel à long terme. Je pense que ce mémoire est le plus beau lot que je puisse te remettre. Je tiens à te remercier vivement pour la confiance enthousiaste et indéfectible que tu m'as accordée. Sans toi, nous ne serions pas ici aujourd'hui.

**Dr. Joy Burchell**, I wish to thank you to have accepted to review this thesis, and to take part in my jury. Thanks to you, the defence of my thesis will mark both the end of a work time in Lille and the beginning of our new collaboration, as a natural transition. Indeed, our research project appears as a logical continuation of the works I present in this report and since I am passionate by the "STn story", your lab seems to be the perfect site to continue to decipher this story.

**Professeur Marc Mareel**, je vous remercie d'être l'un des deux rapporteurs de ce travail. Je suis réellement honoré de votre présence dans mon jury de thèse. Je tiens enfin à vous remercier pour l'accueil généreux que vous m'avez réservé à plusieurs reprises dans votre laboratoire. J'ai beaucoup apprécié les échanges scientifiques que j'ai pu faire avec vous et les membres de votre équipe.

**Jean Claude**, merci d'avoir endossé la présidence de ce jury de thèse. Je suis heureux d'avoir pu travailler dans ce grand laboratoire qu'est le C9 et je tiens à te remercier pour ta disponibilité à mon égard. J'ai beaucoup apprécié nos échanges amicaux pendant ces quatre dernières années, et j'espère que nous garderons de bons rapports à l'avenir. Qui sait, peut-être entreprendrons nous ensemble d'autres projets ambitieux tels que l'escalade des montagnes grenobloises.

**Hubert**, je suis très heureux que tu aies accepté d'être l'examineur présent dans mon jury de thèse. Depuis mon premier stage, proposé par Bénoni, tu es l'éternel critique de mes travaux, infaillible et infatigable, parfois acide et ironique. Pour résister aux assauts de ta critique, j'ai dû apprendre à dresser le pavois d'une argumentation scientifique efficace et me forger une armure d'espièglerie, ce qui représente des acquis non négligeables. Historiquement, je suis affilié à ton laboratoire, et je te remercie de m'avoir pleinement intégré à ton équipe durant les années de préparation de cette thèse.

**Bénoni**, si les directeurs de thèse étaient en quelque sorte les parents scientifiques d'un docteur, vous seriez mon grand-père de laboratoire. En reprenant des études à la fac j'ignorais tout de la recherche universitaire. Vous m'avez ouvert la première porte menant à un laboratoire, puis accompagné jusqu'au DEA. Pour tout cela, je vous suis très reconnaissant. S'il m'est donné de poursuivre une longue carrière dans la recherche, j'aimerais pouvoir garder autant de fraîcheur scientifique et d'enthousiasme que vous en avez montré.

Je tiens à saluer toutes les personnes du C9 avec qui j'ai pu partager d'agréables moments, ainsi qu'à remercier ceux qui m'ont aidé dans mes travaux.

Mentions spéciales pour les résidentes du 017 : **Anne**, pour nos nombreuses discussions, conciliant des points de vue parfois distants. **Marie-Ange**, pour ta disponibilité, le temps et la patience qu'il t'a fallu pour faire mon éducation moléculaire. **Mélanie**, ma petite sœur de lait (5% en TBS tween), malgré ton admiration pour le maire de Valenciennes, tu es quelqu'un de bien.

Salutations amicales à Alex (merci de m'avoir laissé le choix dans la date), Guy, Anne-Sophie, Anne-Marie, Yann, Tony, Willy, Brigitte, Michèle et Jacqueline.

Je salue et remercie également toutes celles et ceux que j'ai côtoyé au SN3 : **Chann**, seul représentant d'une espèce de nounours breton un peu pataud mais d'une générosité sans égale. **Alessandro**, seul représentant d'une espèce de crevette italienne au comportement très sociable et d'une grande disponibilité. Grosses bises à **Nathalie** et **Elsa** et **Virginie** véritables nymphes de laboratoire, rayons de soleil de la salle de culture.

Mes amitiés à Albin (mentor pédagogique surpuissant), Eric (la terreur des souris), Franck, Ikram, Jean-Jacques, Thierry, Isabelle et Johann.

Une pensée pour celles et ceux qui m'ont précédé durant cette période doctorale et qui, ayant soutenu leur thèse, sont partis vers d'autres horizons : Robert-Alain, Valérie, Bénédicte, Laurent, Séverine et Simon.

Tout mon amour pour mes parents, ma sœur et mon frère... et pour Camille ma plus belle raison d'être.

# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b>	<b>1</b>
<b>QUELQUES MOTS D'INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
<b>GENERALITES</b>	<b>6</b>
<b>1 Le sein : de l'état normal à la pathologie cancéreuse</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Structure et fonction de la glande mammaire</b>	<b>8</b>
1.1.1 Un développement discontinu sous haute régulation	8
<i>Embryogénèse</i>	8
<i>Puberté</i>	10
<i>Influence des menstruations</i>	10
<i>Grossesse</i>	11
<i>Involution post-ménopausique</i>	12
1.1.2 Anatomie et histologie de la glande mammaire	12
<i>Anatomie du sein</i>	12
<i>Histologie de la glande mammaire</i>	14
1.1.3 Sécrétion du lait : produit de la glande sous sa forme aboutie--	16
<i>Le colostrum</i>	16
<i>Le lait maternel mature</i>	17
<i>La sécrétion apocrine des lipides</i>	17
<b>1.2 Le cancer du sein : la pathologie tumorale la plus répandue chez les femmes</b>	<b>19</b>
1.2.1 Données épidémiologiques	19
1.2.2 Facteurs de risques	20
<i>Age</i>	21
<i>Facteurs environnementaux</i>	21
<i>Vie génitale</i>	21
<i>Antécédents de pathologie mammaire bénigne</i>	22
<i>Antécédents familiaux</i>	22

1.2.3	Le carcinome du sein : une pathologie aux multiples aspects	23
	<i>Carcinomes in situ</i>	23
	<i>Carcinomes infiltrants</i>	24
	<i>Métastases des cancers du sein</i>	27
	<i>Classification anatomo-clinique des cancers du sein</i>	28
1.2.4	Traitements : les limites et les besoins d'innovation	28
	<i>La chirurgie</i>	29
	<i>La radiothérapie</i>	29
	<i>La chimiothérapie</i>	30
	<i>L'hormonothérapie</i>	31
	<i>Les traitements innovants</i>	32
1.2.5	Marqueurs tumoraux sériques : premiers pas vers une meilleure distinction des cancers	33
<b>2</b>	<b>Les mucines : les <i>O</i>-glycoprotéines des membranes épithéliales</b>	<b>34</b>
2.1	Les mucines : une famille hétérogène	34
2.2	Mucines exprimées dans les cellules épithéliales mammaires saines et dans le lait	36
2.3	Cancer du sein : comment les mucines participent à la pathologie	37
2.3.1	Expressions anormales de différentes mucines	37
2.3.2	Modification des propriétés d'adhérence des cellules	40
2.3.3	Mucines transductrices de signaux : émergence de nouvelles fonctions	41
2.3.4	Les mucines vues par le système immunitaire : cibles ou modulateurs ?	43
<b>3</b>	<b>La <i>O</i>-glycosylation, modification post-traductionnelle importante des mucines</b>	<b>46</b>
3.1	Structure et composition des <i>O</i> -glycannes	46
3.1.1	Biosynthèse et enzymes impliquées	47
3.1.2	<i>O</i> -glycosylation dans les cellules de sein normales	51
3.1.3	Perturbations de la <i>O</i> -glycosylation dans le cancer du sein : les masques <i>O</i> -glycanniques des cellules tumorales	51

3.1.4	Influences des <i>O</i> -glycannes sur le développement cancéreux	56
	<i>Incidence sur les propriétés anti-adhésives des cellules</i>	56
	<i>Intéraction avec l'endothélium</i>	57
	<i>Intéraction avec les siglecs</i>	58
<b>3.2</b>	<b>L'antigène sialyl-Tn</b>	<b>60</b>
3.2.1	Biosynthèse	61
3.2.2	Incidence dans les cancers : revue "sialyl-Tn : from diagnosis to therapy"	62
3.2.3	Sialyl-Tn et cancers du sein : confirmations et incertitudes	75
3.2.4	Application thérapeutique : les résultats mitigés du Thératope®	76
3.2.5	Modèles cellulaires d'étude : faible représentation des lignées sialyl-Tn positives	78
	<b>RESULTATS</b>	<b>80</b>
<b>1</b>	<b>Expression of Sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc <math>\alpha</math>2,6-Sialyltransferase (ST6GalNAc I) cDNA</b>	<b>82</b>
<b>2</b>	<b>Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration</b>	<b>94</b>
<b>3</b>	<b>Sialyl-Tn expression in MDA-MB-231 breast cancer cells promotes tumor development in SCID mice</b>	<b>121</b>
<b>4</b>	<b>Identification of STn positive glycoproteins</b>	<b>140</b>
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>145</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>159</b>



## Quelques mots d'introduction...

Le travail qui m'a été confié en début de doctorat m'a très rapidement et irrémédiablement séduit. Il s'agissait d'étudier l'effet que pouvait produire l'expression d'un antigène sur des cellules cancéreuses de sein, sachant que chez les patientes, cette expression est associée à un mauvais pronostic. Or, comme toutes les lignées cellulaires de cancer du sein disponibles dans notre laboratoire n'expriment pas cet antigène, le premier objectif du travail fut de produire des modèles cellulaires correspondant à nos besoins.

Pour atteindre ce premier objectif, nous disposions de l'ADN complémentaire correspondant à la séquence codant l'enzyme supposée responsable de la biosynthèse de l'antigène. Restait à construire un vecteur d'expression adéquat et de pratiquer des transfections de cellules dans le but d'y induire l'expression de l'enzyme, et si possible de son produit, l'antigène d'intérêt.

Sous cet angle, les choses paraissent relativement simples. Cependant, l'antigène en question, l'antigène sialyl-Tn, est un *O*-glycane sialylé et l'enzyme qui le produit est une sialyltransférase nommée ST6GalNAc I, qui intervient dans les premières étapes de la biosynthèse des *O*-glycannes de type mucine. Il y a dans les quelques lignes qui précèdent de nombreux éléments auxquels ma formation en biologie cellulaire ne m'avait pas sensibilisé. Du reste, je me suis assez vite rendu compte que l'œil du biochimiste ne percevait pas la cellule de la même façon que moi, celle-ci revêtant un aspect très moléculaire.

C'est sans doute la confrontation de ces deux disciplines, biologie cellulaire et biochimie, qui a été la plus grande difficulté de ce travail et, en même temps, la plus grande source d'enrichissement. Pour remplir nos objectifs, il m'a fallu me convertir à la glycobiologie et me plonger dans l'étude compliquée des glycannes, ces molécules trop souvent négligées par les biologistes et qui pourtant font partie intégrante de la très grande majorité des protéines. Dans le même temps, j'ai dû adapter ma façon de concevoir la biologie cellulaire en y incorporant

l'aspect glycobioologique. L'un des défis de ce travail fut donc de concilier des visions très éloignées, ou plus exactement de les marier, pour apprendre à parler des glycoprotéines des cellules.

Je me suis vite aperçu que cette mixité demandait souvent à être explicitée lors de mes échanges avec mes tuteurs et collaborateurs. Selon la sensibilité scientifique de chacun, tel ou tel concept demandait à être précisé ou détaillé afin d'apporter plus de clarté à l'ensemble de mes travaux, mais aussi pour obtenir les meilleurs critiques et conseils.

C'est cette expérience qui a guidé la rédaction de présent mémoire. Dans la revue générale, je décris le contexte de mon étude à un niveau biologique large (la glande mammaire et le cancer du sein), puis à un niveau plus moléculaire (mucines et *O*-glycosylation). Le sujet principal de mon travail, l'antigène sialyl-Tn ne sera abordé qu'à la fin de cette revue. Il me paraît en effet important de dépeindre le contexte le plus largement possible afin de pouvoir appréhender de la manière la plus complète tout l'intérêt porté à ce sujet précis. Que le lecteur veuille bien alors excuser l'abord parfois un peu rébarbatif du contenu énumératif de cette revue. J'espère néanmoins que chacun, en fonction de sa sensibilité scientifique, y trouvera matière à découverte.

La présentation des résultats se fait sous forme d'articles scientifiques, tels qu'ils ont été publiés ou soumis à publication. Ceux-ci sont parfois complétés de résultats non publiés. On pourra suivre dans cette partie, à travers les introductions et les discussions des articles, l'évolution de nos interrogations et de nos points de vue au cours de la préparation de cette thèse. La discussion générale qui suit se propose de reprendre l'ensemble de ces travaux afin d'en tirer les principaux enseignements, et de les mettre en perspectives.

Je vous souhaite une agréable lecture.

# Généralités

Le titre du projet de recherche à l'origine de cette thèse était "Incidence de l'expression de l'antigène sialyl-Tn sur le développement de cellules de cancer du sein". L'antigène sialyl-Tn est un **O-glycane** sialylé. Les O-glycannes sont des structures oligosaccharidiques retrouvées le plus souvent sur les **mucines**. Les mucines sont des protéines exprimées au niveau des épithélia sous forme sécrétée (mucus) ou membranaire (glycocalyx). L'épithélium de la **glande mammaire** saine produit certaines mucines, que l'on retrouve également dans les **cellules cancéreuses de sein**.

La revue générale qui suit s'articule en trois parties dans lesquelles sont développés les différents éléments cités ci-dessus. La première partie décrit la glande mammaire, sise dans le sein, d'un point de vue structural et fonctionnel. Le cancer du sein, état pathologique de cet organe, y est également abordé. La seconde partie traite de la famille des mucines ; de leur expression et fonction dans la glande mammaire saine, puis de leurs rôles variés dans le développement tumoral. Enfin, la troisième partie définit la O-glycosylation des mucines et énumère ses nombreuses anomalies et leurs conséquences observées dans le cancer du sein. C'est un O-glycane particulier, **l'antigène sialyl-Tn**, qui nous intéresse plus précisément. Nous verrons dans cette dernière partie l'origine et les conséquences de son expression dans les cancers. Enfin, je présenterai les enjeux thérapeutiques importants liés à l'antigène sialyl-Tn qui requièrent l'approfondissement des connaissances concernant son implication dans le développement tumoral.

# 1 Le sein : de l'état normal à la pathologie cancéreuse

Le sein, ou glande mammaire humaine, est une glande exocrine, d'origine ectodermique, qui demeure principalement associée à la peau. Apanage des mammifères, cette glande est retrouvée dès les monotrèmes (ornithorynque) chez qui elle est associée à un poil, le long duquel s'écoule les substances nutritives. Cette association se perdra au cours de l'évolution mais rappelle que la glande mammaire dérive d'une glande sébacée et sudoripare.

## 1.1 Structure et fonction de la glande mammaire

Le développement de la glande mammaire s'étale depuis l'embryogenèse jusqu'à la ménopause, et se déroule en plusieurs épisodes distincts, parfois séparés de nombreuses années. Ce développement discontinu est finement régulé et soumis à diverses influences paracrines (facteurs de croissance) et endocrines (hormones sexuelles ou pituitaires). C'est l'un des rares organes dont la majeure partie du développement se déroule chez l'adulte ce qui en fait un modèle d'étude de l'organogenèse particulier.

### 1.1.1 Un développement discontinu sous haute régulation

#### *Embryogénèse*

Chez l'embryon humain de quatre semaines se distinguent déjà deux épaissements ectodermiques latéraux : les crêtes mammaires (Figure 1A). C'est le long de ces structures, conservées au cours de l'évolution, que se différencient les ébauches glandulaires. Le nombre d'ébauches varie suivant les espèces, il est souvent le double du nombre d'embryons présents par gestation, donc deux chez l'Homme. L'ébauche se présente d'abord sous la forme d'un bourgeon primaire (6 semaines), épaissement ectodermique qui envahit le mésoderme sous-jacent, puis d'un bourgeon secondaire (4 mois) qui se ramifie en profondeur et se creuse d'une cupule à sa surface (6 mois) (Figure 1B). A la naissance, les ramifications

ectodermiques profondes, au nombre de 15 à 20, se creusent d'une lumière qui s'ouvre au niveau d'un mamelon ombilique à la surface de la peau. Autour de ce mamelon, une pigmentation cutanée définit l'aréole. En profondeur, le tissu conjonctif s'est organisé autour des canaux ectodermiques, futurs canaux galactophores, et forme des travées qui les individualisent.

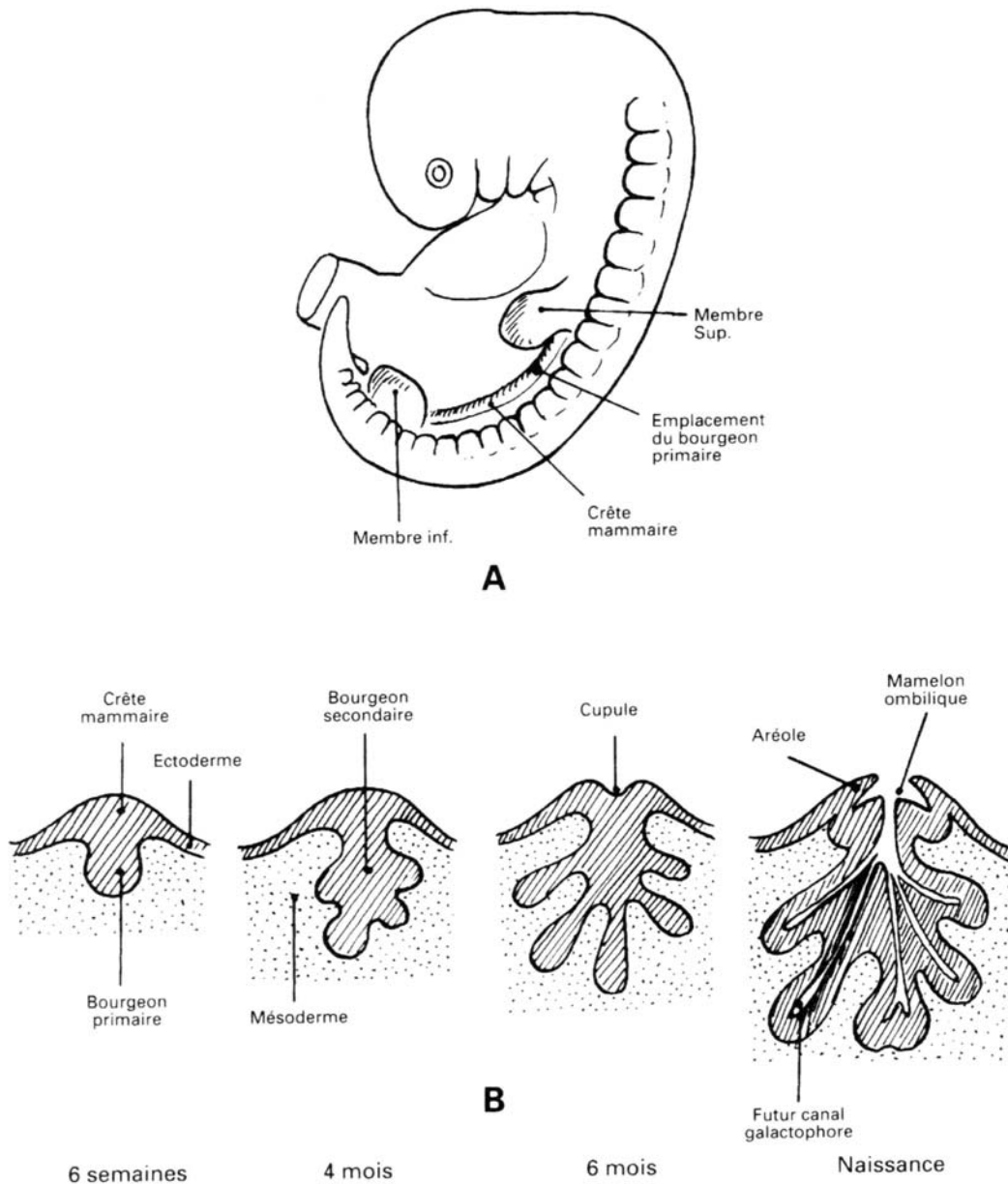


Figure 1 : **Développement embryonnaire de la glande mammaire.** A : Crête mammaire chez un embryon humain de 7-8 mm, 31-32 jours. B : Développement prénatal du sein. D'après Espié et Gorins : *Le sein du normal au pathologique - état de l'art* [1].

A ce stade, la glande est identique chez l'homme et chez la femme et n'est pas fonctionnelle. Elle demeurera sous cette forme immature chez l'homme, alors que son évolution va reprendre chez la femme, à la puberté, sous l'effet des hormones sexuelles.

### *Puberté*

Sous l'effet des oestrogènes ovariens, le développement de la glande peut reprendre au moment de la puberté. Le développement des canaux reste modéré, et ce sont surtout les adipocytes adjacents qui se multiplient et se chargent en graisse, provoquant la saillie de la glande et du mamelon. Des ébauches d'acini sécrétoires, connectées aux parties canalaire terminales, apparaissent également lors des premières ovulations. A ce stade, la glande a acquis sa forme normale chez la nullipare. Les cellules épithéliales qui la composent, n'ont pas encore atteint leur stade ultime de différenciation fonctionnelle mais sont très sensibles aux stimuli hormonaux.

### *Influence des menstruations*

Sous l'influence des hormones menstruelles, la glande mammaire subit de légères évolutions cycliques. En particulier, un accroissement modéré des canaux galactophores et des acini sécrétoires, suivi d'une faible activité sécrétrice en fin de cycle. Cette sécrétion sera résorbée par le tissu lui-même. Ces modifications reflètent la sensibilité du tissu épithélial aux stimuli hormonaux et peuvent être interprétées comme une "préparation" de la glande en vue d'une possible gestation. Elles sont suivies d'une légère involution (fin de cycle et début du cycle suivant) qui ramène la glande à sa morphologie d'origine. L'ensemble témoigne d'une grande plasticité tissulaire, mettant en jeu de façon répétitive des mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire, dont la défaillance peut conduire à la transformation cancéreuse.

## *Grossesse*

Une forte activité mitotique des cellules épithéliales caractérise les vingt premières semaines de la gestation. Les effets hormonaux combinés des oestrogènes (remaniement de la matrice extra-cellulaire) et de la progestérone (pro-mitotique) sont à l'origine de ce développement [2-4]. La progestérone induit notamment l'augmentation de l'expression des récepteurs de l'Epidermal Growth Factor (EGF) et de la prolactine [5]. Le rôle de la prolactine semble double, induisant un effet pro-mitotique par une voie encore mal connue, ainsi qu'une résistance à l'apoptose par la voie de signalisation JAK2-Stat5 [6-7].

Tout ceci se traduit par une augmentation du volume du sein. Les cellules épithéliales ont formé de nombreux acini aux terminaisons canalaire et ont atteint leur stade de différenciation ultime. Elles sont très polarisées baso-apicalement et présentent les caractéristiques cytologiques des cellules sécrétrices : noyau excentré basalement, développement du réticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de Golgi et accumulation de vacuoles de sécrétion. Leur activité sécrétrice se manifeste deux à cinq jours après l'accouchement sous l'effet de la prolactine.

Après l'arrêt de la lactation, il faut trois à quatre mois pour que la glande retourne à sa morphologie initiale. Elle est alors le siège d'importants remaniements tissulaires faisant intervenir l'apoptose ainsi que la phagocytose des cellules immunitaires. Au cours de cette régression, le système immunitaire a l'opportunité de découvrir des antigènes associés aux cellules mammaires et à la lactation, parfois exprimés de façon anormale par des cellules cancéreuses de sein. Cette "rencontre" pourrait être à l'origine de l'influence bénéfique des grossesses sur la diminution des risques de cancer du sein [1].



### *Involution post-ménopausique*

Cette involution se caractérise par la disparition d'une grande partie des structures acineuses et la réduction de deux tiers des structures canalaire. Le tissu conjonctif s'amenuise et devient plus lâche, au profit du développement du tissu adipeux.

#### 1.1.2 Anatomie et histologie de la glande mammaire

Les trois tissus qui composent le sein sont la peau, le tissu adipeux sous-jacent et la glande mammaire sécrétrice qui se développe dans le tissu adipeux.

### *Anatomie du sein*

Les seins se situent sur la paroi antérieure du thorax, dans une zone qui s'étend de la troisième à la septième côte (Figure 2). La couche graisseuse profonde repose sur l'aponévrose de la face antérieure du muscle grand pectoral. Le parenchyme de la glande mammaire forme un ensemble de 15 à 20 lobes étroitement imbriqués, débouchant chacun sur un galactopore au niveau du mamelon. De ce fait, la glande n'est solidaire que de la peau.

La glande est irriguée par un réseau artériel pré-glandulaire provenant principalement des artères thoraciques externes et internes, et par un réseau rétro-glandulaire, moins important, qui aborde la face postérieure de la glande par des artères intercostales perforantes. Le drainage veineux s'effectue selon deux voies à peu près superposables : une voie superficielle (ou sous-cutanée) qui aboutit sur un plan sagittal dans la veine thoracique interne ou sur un plan latéral dans la veine thoracique externe, et une voie profonde qui aboutit aux veines intercostales. Ces dernières communiquent avec le plexus intra-rachidien et pourrait expliquer les métastases vertébrales du cancer du sein. Le réseau capillaire sanguin est très développé, surtout en période de lactation. Il irrigue richement les lobules glandulaires et leurs acini.

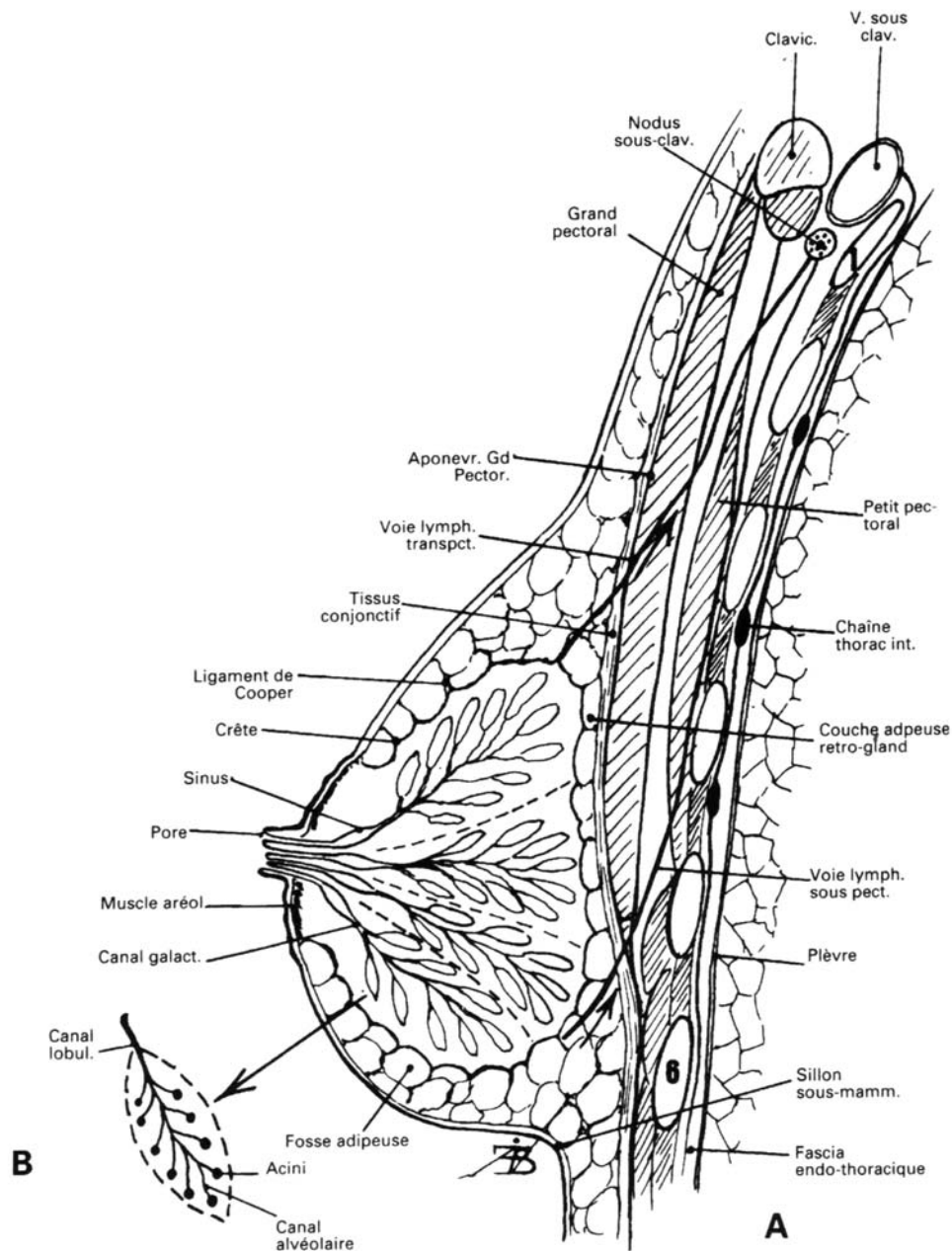


Figure 2 : **Anatomie de la glande mammaire** A : Coupe sagittale de sein passant par le mamelon. Quatre lobes ont été représentés. Les tirets indiquent les cloisons conjonctives. B : un lobule mammaire. *D'après Espié et Gorins [1].*

Il existe enfin un réseau lymphatique enrobant les lobules : le réseau péri-lobulaire. Pour une part ces vaisseaux suivent les canaux galactophores pour se jeter dans un plexus sous-aérolaire, les autres sortent de la glande à la périphérie. La majorité rejoindra ensuite des troncs collecteurs afférents aux ganglions lymphatiques axillaires, situés dans la graisse qui remplit le creux axillaire. Ces derniers se répartissent en cinq groupes principaux comprenant

un nombre de ganglions très variables selon les individus. Une autre voie, secondaire, draine les vaisseaux lymphatiques vers la chaîne thoracique interne qui remonte vers la veine sous clavière (à droite) ou le canal thoracique (à gauche).

L'organisation du drainage lymphatique explique clairement l'apparition de métastases du cancer du sein au niveau des ganglions axillaires. Par ailleurs, les voies veineuses et lymphatiques thoraciques internes, qui passent entre le sternum et les poumons, pourraient favoriser les phénomènes d'effusions pleurales.

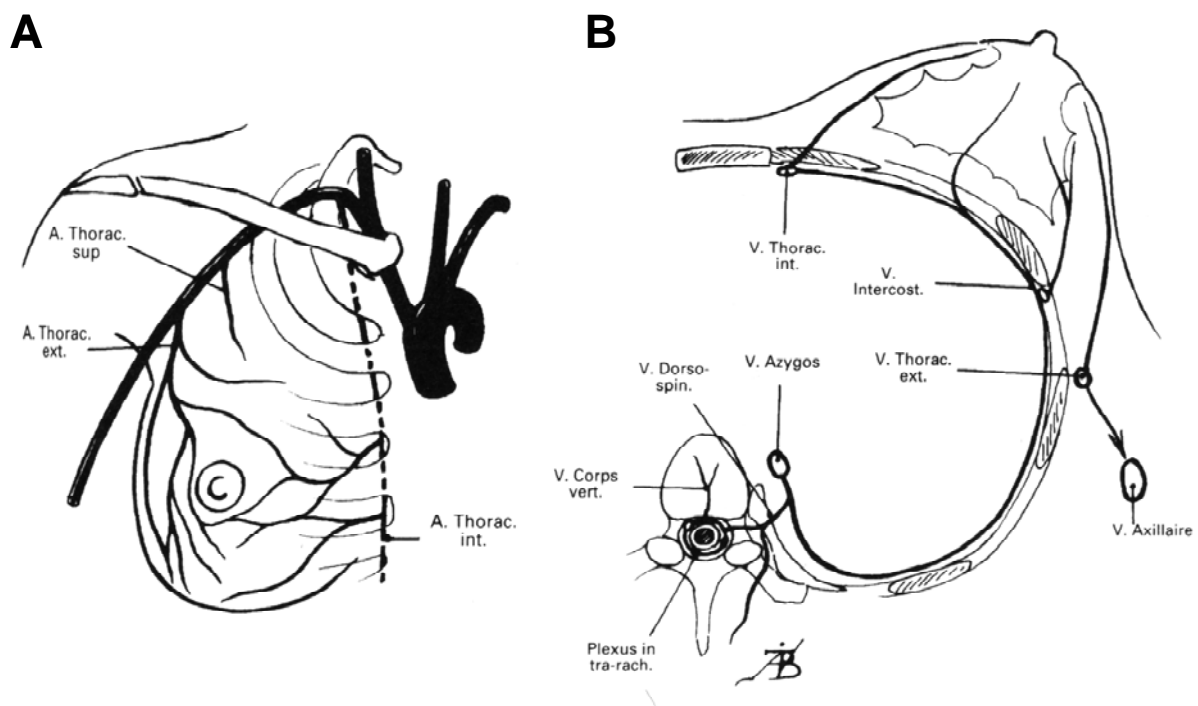


Figure 3 : **Irrigation artérielle et veineuse du sein** A : schéma du système artériel pré-glandulaire. B : schéma du drainage veineux. D'après Espié et Gorins [1].

### *Histologie de la glande mammaire*

Tout au long des canaux galactophores, l'épithélium glandulaire est limité par une lame basale. Celle-ci se forme par l'entremise d'un dialogue cellulaire. Stimulés par une sécrétion épithéliale de  $TGF\alpha$ , les fibroblastes du mésenchyme adjacent sécrètent du collagène de type I. En réponse, les cellules épithéliales sécrètent du collagène de type IV, de la laminine et de la fibronectine, qui vont s'assembler avec le collagène de type I pour former la lame basale.

Cette lame basale est capable de limiter la prolifération des cellules épithéliales et d'induire leur polarisation [8,9]. Par ailleurs, les adipocytes du stroma sont capables d'induire la ramification des canaux mammaires et leur organisation en alvéoles [10,11].

L'épithélium est composé de deux couches de cellules. Au plus proche de la membrane basale, on trouve des cellules myoépithéliales, disposées longitudinalement aux canaux, et caractérisées par une expression d'une forme d'actine caractéristiques des muscles lisses. Au dessus se trouve une couche de cellules épithéliales cubiques, organisées perpendiculairement à la membrane basale. Cellules myoépithéliales et épithéliales sont liées entre elles par des jonctions serrées. La couche de cellules myoépithéliales ne couvre pas entièrement la lame basale et laisse d'importantes plages accessibles aux cellules épithéliales cubiques.

En période de lactation, l'unité sécrétrice de base est l'acinus. Ce sont les cellules épithéliales cubiques polarisées qui sécrètent les composants du lait. Les cellules myoépithéliales contractiles favorisent l'éjection du lait accumulé dans les acini. Les acini sont regroupés de façon dense autour d'un canal alvéolaire qui débouche dans un canal lobulaire. Chaque canal lobulaire draine 5 à 20 canaux alvéolaires. L'ensemble des acini concernés forme donc un lobule mammaire, entouré d'un tissu conjonctif intra-lobulaire lâche, à prédominance cellulaire et hormono-sensible. Lobules et canaux afférents sont entourés d'un tissu conjonctif inter-lobulaire de soutien, constitué d'un collagène dense. Les canaux émergeant de lobules (extra-lobulaires) se regroupent ensuite pour former un canal galactophore, possédant une paroi conjonctive riche en fibres élastiques et un épithélium essentiellement pavimenteux (toujours à deux assises cellulaires). L'ensemble des lobules connectés à ce canal constitue un lobe. La glande mammaire est constituée de 10 à 15 lobes, fonctionnellement indépendants mais chirurgicalement indissociables.

### 1.1.3 Sécrétion du lait : produit de la glande sous sa forme aboutie

La fonction biologique du sein est de produire un liquide maternel, transmissible au nouveau né par succion : le lait. La sécrétion du lait se produit deux à cinq jours après la naissance. L'effondrement de la sécrétion de progestérone placentaire induit, par annulation d'un rétro-contrôle, une augmentation de la sécrétion de prolactine. Ce déséquilibre de la balance progestérone / prolactine induit la sécrétion. Les glucocorticoïdes jouent également un rôle dans l'induction de la production des protéines du lait. Enfin l'ocytocine, hormone sécrétée par l'hypophyse ainsi que par le corps jaune ovarien, peut également stimuler la sécrétion de composants du lait, mais agit surtout sur l'éjection du lait en stimulant la contraction des cellules myoépithéliales. La sécrétion hypophysaire d'ocytocine est provoquée par la stimulation nerveuse du mamelon et de l'aréole.

Si le lait maternel pourvoit aux besoins nutritionnels du nouveau né, ce n'est pas là sa seule fonction. En effet, cette sécrétion contient de nombreux agents protéiques et cellulaires à vocations immunitaires, en particulier en début de lactation.

#### *Le colostrum*

Il s'agit du lait des premiers jours, ou lait de transition, qui est riche en protéines et en acide aminés libres, rapidement assimilables. A la naissance, l'intestin du nouveau né est stérile. Il sera rapidement colonisé par les bactéries qui composeront la flore intestinale, certaines pouvant être plus pathogènes que bénéfiques. Pour favoriser une colonisation adéquate, le colostrum contient de nombreux agents immunologiques, bactéricides ou bactériostatiques tels que les IgA sécrétoires, la transferrine ou la lactoferrine, le facteur bifidus (oligosaccharides) voire des cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes).

### *Le lait maternel mature*

Quelques jours après la naissance, l'intestin et le foie de l'enfant se développent et lui permettent d'assimiler et de métaboliser des molécules plus complexes. Parallèlement, le lait maternel s'enrichit en lactose, en caséines et en graisse. Ces composants majeurs du lait mature sont indifféremment produits par toutes les cellules épithéliales sécrétrices, principalement dans les acini, parfois dans les canaux terminaux. Les caséines et les autres protéines solubles du lait sont sécrétées de façon mérocrine : synthèse réticulaire, transport golgien puis vésiculaire, et exocytose par fusion des vésicules avec la membrane plasmique apicale. Le lactose, synthétisé dans l'appareil de Golgi, s'accumule dans les vésicules de sécrétion et est relâché en même temps que les protéines. La sécrétion des lipides se fait selon le mode dit apocrine.

### *La sécrétion apocrine des lipides*

Les cellules épithéliales synthétisent et accumulent les lipides sous forme de triglycérides, aux chaînes d'acides gras variables en taille et en degré d'insaturation, qui s'agglomèrent dans le cytoplasme sous forme de gouttelettes. Les gouttelettes se regroupent et forment un amas lipidique important dans la région apicale. Ce dernier sera sécrété par "décapitation" de la cellule qui va perdre toute sa partie apicale ; c'est la sécrétion apocrine (Figure 4). Le globule gras se retrouve donc dans la lumière acineuse, entouré de membrane plasmique et d'un peu de cytoplasme de la cellule qui l'a synthétisé. Cette membrane est une double couche phospho-lipidique classique, dans laquelle on retrouve les protéines normalement exprimées sur la membrane apicale des cellules épithéliales, notamment les mucines.

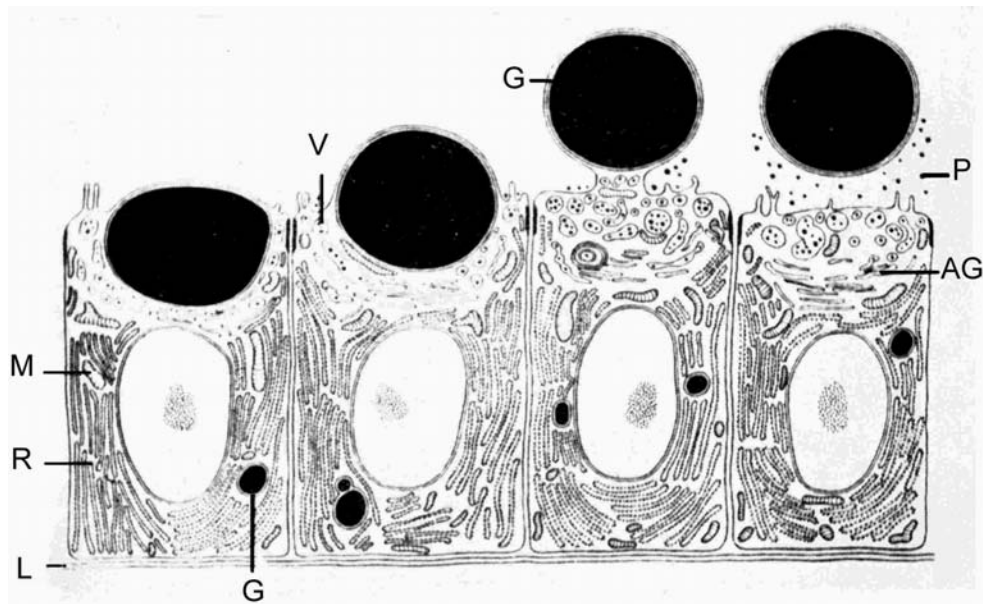


Figure 4 : **Sécrétion apocrine des lipides par les cellules épithéliales mammaires.** M : mitochondrie, R : réticulum endoplasmique, L : lame basale, G : gouttelette lipidique, V : vésicule de sécrétion protéique, P : protéines sécrétées, AG : appareil de Golgi. *D'après Kon et Cowie, Milk : the mammary gland and its secretion* [12].

La glande mammaire, bien que d'organisation tissulaire assez simple, se caractérise par un développement et une activité très complexe, gouvernés par un ensemble de facteurs : facteurs environnementaux (matrice extracellulaire, cellules fibroblastiques ou adipocytaires), facteurs de croissance solubles, hormones sexuelles, hypophysaires et surrénaliennes. La complexité de ces régulations et la grande plasticité de cette glande sont sans doute à mettre en relation avec l'importante fréquence des cancers du sein et surtout avec la grande variabilité de ces cancers, tant dans leurs caractères anatomo-pathologiques que dans leur évolution clinique.

## 1.2 **Le cancer du sein : la pathologie tumorale la plus répandue chez les femmes**

Bien que le cancer du sein soit l'un des mieux soignés de nos jours, il demeure le premier cancer féminin en terme de mortalité. C'est également le troisième cancer le plus mortel pour l'ensemble de la population, après les cancers du poumon et du côlon. C'est dire son impact important dans le domaine de la santé publique. La meilleure prise en charge du cancer du sein passe par les améliorations combinées du dépistage, de la prévention, des traitements loco-régionaux et systémiques ainsi que du suivi des patientes. Si le dépistage et la prévention sont actuellement en plein essor en France, traitement et suivi sont limités par la multiplicité des cas particuliers. En effet, l'appellation monolithique "cancer du sein" couvre une grande variété de pathologies cancéreuses affectant le même organe. Cette variabilité est reflétée par une grande diversité des caractères histologiques des tumeurs et de leur l'évolution clinique.

### 1.2.1 Données épidémiologiques

Avec un million de nouveaux cas de cancer du sein chaque année dans le monde, le cancer du sein est le cancer féminin le plus répandu (18% des cas) [13].

Les données épidémiologiques les plus récentes pour la France datent de l'année 2000 [14]. Elles sont parcellaires, puisque seuls 14 départements français possédaient des registres officiels de suivi des cancers du sein. On peut cependant retenir les estimations suivantes : 42000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année et 11000 décès sont imputés à un cancer du sein. Cela représente un tiers des diagnostics de cancer et 20% des décès par cancer pour les femmes. La probabilité qu'une femme française développe un cancer du sein au cours de sa vie est de 12%. La probabilité de décès par cancer du sein est de 4%. On estime à 300 000 le nombre de femmes vivant actuellement avec un cancer du sein.

Alors que la fréquence des cancers du sein a presque doublé entre 1980 et 2000, le taux de mortalité n'a pas évolué. Ce point positif reflète en partie les progrès thérapeutiques puisque



l'on soigne avec succès une proportion de plus en plus importante des cancers diagnostiqués. Mais il faut souligner que les progrès du dépistage permettent de déceler des cancers de plus en plus précoces qui sont de pronostic favorable. Le taux de mortalité reste dû, en majorité, aux cancers avancés, de mauvais pronostic, pour lesquels les progrès thérapeutiques n'ont pas encore réussi à faire chuter le taux de mortalité.

### 1.2.2 Facteurs de risques

Un certain nombre de facteurs de risque a été bien identifié (tableau 1) et d'autres sont encore étudiés et discutés. Le sexe demeure le premier facteur de risque, puisque plus de 99% des cancers du sein sont diagnostiqués chez les femmes.

Tableau 1: **Principaux facteurs de risque de cancer du sein.** *D'après McPherson et al. [13].*

<b>Facteur</b>	<b>Risque relatif</b>	<b>Groupe à haut risque</b>
Age	>10	>40 ans
Pays d'origine	5	Pays développés
Régime alimentaire	1,5	Excès de graisses saturées
Consommation d'alcool	1,3	Consommation excessive
Age des premières règles	3	<11 ans
Age à la ménopause	2	>54 ans
Age de la première grossesse à terme	3	>40 ans
Traitements hormonaux	1,3	Usage prolongé
Antécédent de maladie bénigne	4-5	Hyperplasie atypique

### *Age*

Les risques de cancer du sein et leur taux de mortalité augmentent régulièrement avec l'âge (un doublement tous les dix ans). Cette augmentation est cependant moins marquée après 45-50 ans, voire même diminue par exemple au Japon [15]. Ceci suggère l'importance de facteurs environnementaux.

### *Facteurs environnementaux*

Le risque augmente d'un facteur cinq pour les femmes des pays occidentaux industrialisés [13]. Il s'agit là d'une association au mode de vie, puisqu'il a été démontré que des populations d'origine asiatique migrantes aux États Unis ont vu leur risque se mettre au niveau du pays d'accueil en 2 à 3 générations [16,17]. Il a été également montré que la consommation excessive d'alcool augmente le risque d'un facteur 1,3. Il semble en revanche que le café et le tabac soient hors de cause.

### *Vie génitale*

L'âge précoce des premières règles (avant 11-12 ans) et l'âge avancé de la ménopause (après 54-55 ans) sont tous deux associés à une augmentation du risque d'un facteur 2 environ [1,13]. Il n'a jamais été montré que ces deux paramètres relevaient d'un même facteur causal, mais on peut intuitivement les associer à une durée prolongée de l'influence des oestrogènes sur l'épithélium mammaire (voir 1.1.1 p 10).

Par ailleurs, l'âge de la première grossesse (avant 35 ans) et le nombre d'enfant semblent jouer un rôle protecteur [1]. Pour certains l'allaitement de longue durée pourrait expliquer ce rôle protecteur, en soustrayant la glande aux influences oestrogéniques d'une part [18-20] et d'autre part en maintenant les cellules sous forme très différenciée [21].

Enfin, les traitements hormonaux contraceptifs ou substitutifs semblent présenter peu d'incidence quant aux risques du cancer du sein.

#### *Antécédents de pathologie mammaire bénigne*

Les hyperplasies sans atypie et atypiques augmentent les risques d'un facteur 2 et 5 respectivement. Une hyperplasie se caractérise par une prolifération exagérée de l'épithélium mammaire, qui comporte alors plus de deux couches de cellules. Elle est dite atypique lorsque les cellules perdent les caractères morphologiques épithéliaux. Ces déficiences dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire pourraient expliquer la prédisposition de ces patientes à développer ultérieurement un cancer.

#### *Antécédents familiaux*

Le tableau ci-dessous, détaille les risques relatifs de survenue de cancer en fonction des antécédents familiaux. On sait aujourd'hui que 7 à 10% des cas sont à composantes héréditaires et l'on a notamment bien décrit l'implication de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs BRCA1 et BRCA2 [22-25].

Tableau 2 : **Risques relatifs de cancer du sein liés aux antécédents familiaux.** D'après Espié et Gorins [1].

<b>Apparentée atteinte</b>	<b>Risque relatif</b>
Mère	1,7 - 4
Sœur	2 - 3
Sœur avant ménopause	3,6 - 5
Sœur après ménopause	2
Sœur, avant 40 ans, bilatéral	11
Sœur et mère	2,5 - 14
Sœur et mère, avant la ménopause, bilatéral	39
Apparentée du second degré	1,4 - 2
Apparentée du troisième degré	1,35

### 1.2.3 Le carcinome du sein : une pathologie aux multiples aspects

On distingue dans un premier temps les cancers *in situ* des cancers infiltrants ou invasifs. Dans le premier cas la membrane basale est demeurée intègre et les cellules cancéreuses prolifèrent dans la lumière de la glande. Dans le second cas, la barrière de la lame basale a été rompue et les cellules envahissent le stroma sous-jacent. Ces deux catégories se subdivisent encore en fonction de l'origine des cellules (canalaire ou lobulaire) et des critères anatomo-pathologiques et cytologiques des tumeurs. Un cancer *in situ* peut évoluer en cancer infiltrant, ceci n'étant ni systématique ni prévisible dans le temps.

#### *Carcinomes in situ*

Les carcinomes *in situ* représentent environ un quart des cancers diagnostiqués. Cette proportion est en constante augmentation du fait du développement intensif du dépistage et de la généralisation de la mammographie. En effet, on peut considérer cette forme comme étant un stade précoce de développement du cancer du sein, que les nouveaux moyens permettent de détecter plus facilement.

Les carcinomes intracanaux (CIC) ou carcinomes intragalactophoriques peuvent prendre leur départ à n'importe quel niveau de l'arbre galactophorique mais le font le plus souvent vers l'unité ducto-lobulaire terminale (canaux extralobulaires). Ils représentent 15 à 20% des cancers du sein. Il existe 5 sous types "architecturaux" :

- **Massif** : les canaux sont distendus et la lumière comblée par les cellules tumorales
- **Cribriforme** : la masse tumorale est creusée de trous de façon aléatoire
- **Papillaire** et **micropapillaire** : les cellules cancéreuses forment des sortes de villosités à l'intérieur de la lumière, plus ou moins importantes (papillaire > micropapillaire), soutenues par un tissu conjonctif grêle.

- **Comédo** : le centre des canaux présente une nécrose importante pouvant provoquer des écoulements mamelonnaires d'aspect laiteux.

Les carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS) ne représentent que 2 à 3% des cancers du sein. L'absence de symptôme rend souvent leur découverte fortuite. Ces cancers se développent dans les canalicules intra-lobulaires et peuvent se propager dans les canaux extra-lobulaires (diffusion pagetoïde).

Ces critères architecturaux, souvent observables de façon concomitante dans une même tumeur, ne sont pas suffisants pour définir les risques d'évolution et le meilleur traitement à apporter à la patiente. On tient également compte aujourd'hui du grade histologique de la tumeur et notamment du degré de différenciation et du grade nucléaire (variation de taille des noyaux, fréquence des mitoses) des cellules qui la composent.

### *Carcinomes infiltrants*

Les carcinomes infiltrants représentent les trois quarts des cancers diagnostiqués. On distingue également différentes formes selon l'aspect histologique des biopsies.

La forme la plus commune (80%) est le **carcinome canalaire infiltrant** dans lequel les cellules sont disposées autour de cavités glandulaires ou en massifs et en travées et envahissent largement le tissu conjonctif adjacent (Figure 5). Ces différences morphologiques associées aux variations de différenciation cellulaire et d'aspect nucléaire sont à la base de plusieurs méthodes de classement histopronostiques dont la plus utilisée est celle de Scarff-Bloom et Richardson [26].

Les **carcinomes lobulaires infiltrants** (4% des cas) se caractérise par des cellules rondes en "file indienne" et présente le plus souvent une composante lobulaire *in situ*, témoin présumé de l'évolution de la forme *in situ* à la forme infiltrante.

D'autres formes sont moins courantes encore et souvent associées à de meilleurs pronostiques :

- carcinome **médullaire** : avec une bonne délimitation histologique,
- carcinome **tubuleux** (3 à 5%) : associé à une composante CIC, les cellules cancéreuses y forment des tubes à lumière ouverte et contours anguleux,
- carcinome **mucineux** (1%) : les cellules sont disposées en lobules au sein de plages de substance mucoïde,
- carcinomes **papillaire infiltrant**, **adenoïde kystique**, **apocrine**, **secrétant** et **métaplastique**, présentent tous des caractéristiques morphologiques particulières (voir pour détails Espié et Gorins [1] pages 378-387).

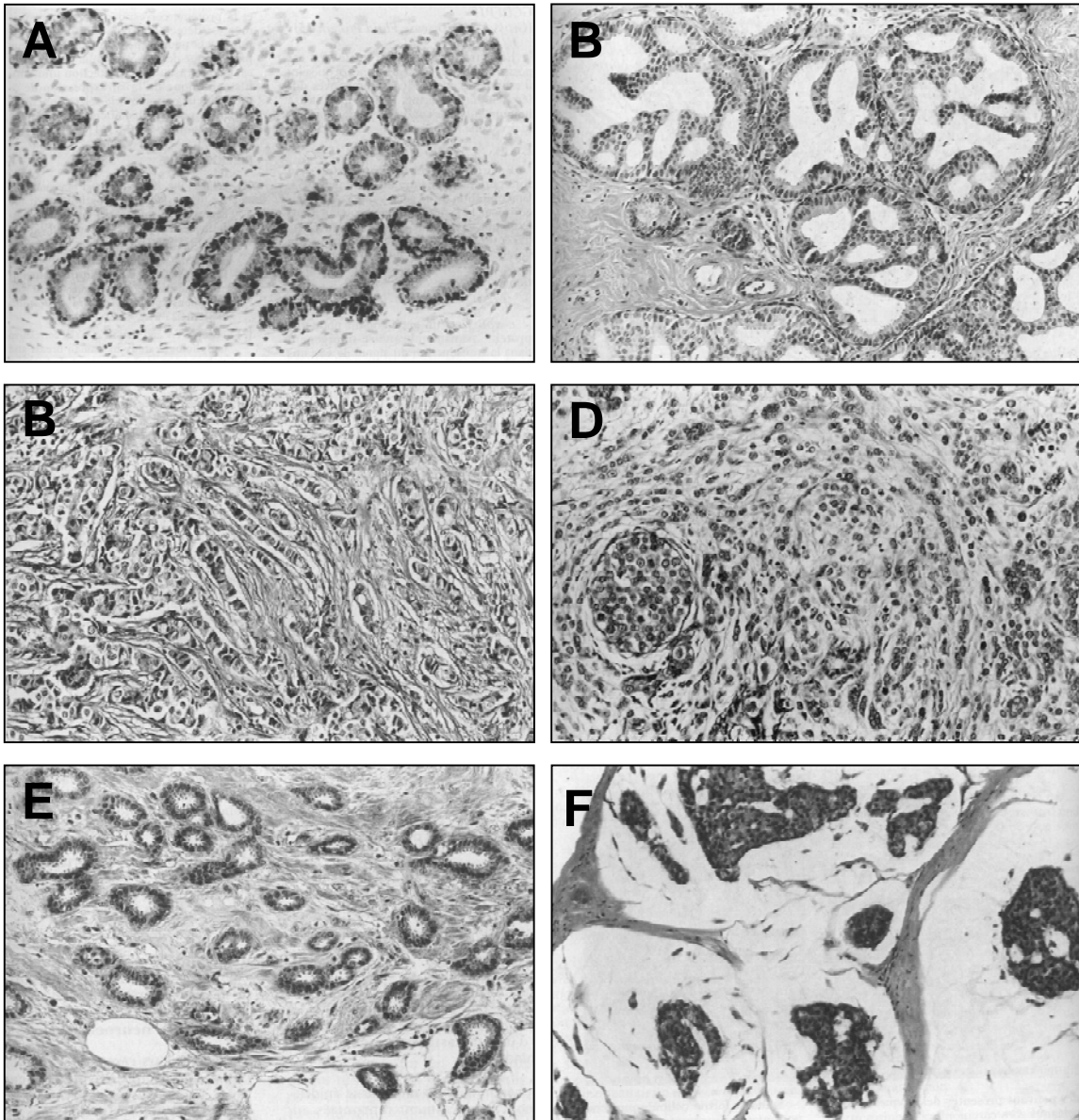


Figure 5 : **Exemples de coupes anatomo-pathologiques.** A : tissu mammaire normal avec marquage immuno-histologique de l'actine révélant les cellules myoépithéliales. B : carcinome in situ intracanaux cribriforme. C : carcinome canalaire infiltrant avec cellules en travées dans le tissu conjonctif. D : carcinome lobulaire infiltrant avec cellules en file indienne et composante lobulaire *in situ*. E : carcinome tubuleux avec tubes à lumière ouverte et contours anguleux. F : carcinome mucineux. Grossissement initial x200. D'après Espié et Gorins [1].

### *Métastases des cancers du sein*

La dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme, via les circulations sanguine et / ou lymphatique, est à l'origine de la formation de métastases. Ce sont des tumeurs secondaires apparaissant dans des tissus distants de la tumeur primaire. Cette dissémination ne peut se faire qu'à partir de tumeurs primaires infiltrantes, dans lesquelles les cellules cancéreuses sont en contact avec les capillaires sanguins et les vaisseaux lymphatiques qui irriguent le stroma de la glande. Néanmoins, on observe des rechutes métastatiques chez 2% des femmes soignées pour un CIC, qui devaient donc présenter une lésion micro-invasive non décelée.

Dans 70 à 80% des cas le développement métastatique du cancer se manifeste par un envahissement des ganglions lymphatiques, le plus souvent axillaires (voir 1.1.2 pp 13-14). La dissémination des cellules se fait ensuite à partir de ces foyers secondaires vers le reste de l'organisme. Mais cette étape n'est pas obligatoire et 20 à 30% des patientes soignées pour un cancer invasif présentent des métastases distantes sans envahissement ganglionnaire. Ceci témoigne de la dissémination des cellules par la voie sanguine. Outre les ganglions lymphatiques, les organes le plus souvent touchés par des métastases de cancer du sein sont les os (moelle osseuse), les poumons et le foie (Tableau 3) [27,28]. La survie des patientes est fonction des sites colonisés. Ainsi, les métastases pulmonaires et hépatiques sont associées à une diminution du taux de survie [27].

Tableau 3 : **Fréquence de localisation des métastases du cancer du sein.** D'après Mignot et Morvan : *Cancer du sein* [27].

<b>Siège des métastases au diagnostic</b>	<b>Pourcentage</b>
Squelette	29
Plèvre, poumon	12
Ganglions	10
Peau	5
Foie	3
Cerveau	2



Il existe une corrélation positive entre la taille de la tumeur initiale et les risques métastatiques [29]. De plus, la probabilité de survie est d'autant diminuée que le nombre de ganglions envahis sera important [30,31]. Toutes ces données sont bien sûr en faveur du développement du dépistage précoce des tumeurs primaires.

#### *Classification anatomo-clinique des cancers du sein*

Cette classification permet de distinguer les maladies selon leurs extensions cliniques et histopathologiques. La connaissance du stade contribue à déterminer le traitement et à évaluer le pronostic de la maladie.

Les classifications TNM de l'UICC (Union Internationale Contre le Cancer) et pTNM de l'AJC (American Joint Committee on Cancer staging and Results) reprennent globalement les mêmes paramètres à quelques variables techniques prêt. Ces variables sont la taille de la tumeur primitive (T), l'envahissement des ganglions lymphatiques (N) et l'existence d'éventuelles métastases distantes (M). La combinaison de ces variables permet de définir le stade d'un cancer, de 0 à IV, qui reflète son agressivité (Annexe I).

#### 1.2.4 Traitements : les limites et les besoins d'innovation

Au traitement chirurgical local s'ajoute trois grands types de traitements adjuvants (post-opératoire) ou néo-adjuvants (pré-opératoire), que sont la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie. Néanmoins, ces trois approches, bien qu'apportant des bénéfices certains aux patientes, ne sont pas dénuées de lourds effets secondaires. Ceci justifie la poursuite de recherche de traitements "innovants" se caractérisant par une plus grande spécificité et une moindre toxicité.

### *La chirurgie*

Longtemps considérée comme une maladie locale, le cancer du sein était principalement traité chirurgicalement. On peut même qualifier les traitements initiaux de radicaux, puisque Halsted préconise l'amputation complète du sein (mastectomie), l'amputation des muscles pectoraux et l'ablation des ganglions du creux axillaire [33]. Cependant, les moyens diagnostiques et pronostiques s'affinant, la chirurgie a évolué en faveur de traitements de plus en plus conservateurs pour les cancers les moins avancés. On pratique aujourd'hui la tumorectomie (exérèse locale de la tumeur et de ses marges) et le curage axillaire. Ce type d'opération est généralement suivi de traitements adjuvants locaux (radiothérapie) ou systémiques (chimio- et / ou hormonothérapie)

### *La radiothérapie*

La radiothérapie est utilisée de façon locale après tumorectomie, pour éliminer les cellules cancéreuses qui seraient toujours présentes sur le site de la tumeur primaire, et diminuer ainsi les risques de rechute locale. Elle s'applique soit de façon externe, soit en utilisant une sonde irradiante interne (curiethérapie). L'utilisation de la radiothérapie après mastectomie permet également de réduire les risques de rechute des patientes ayant été opérées pour des cancers avancés (paroi thoracique) [34]. Elle peut être aussi utilisée de façon néo-adjuvante, pour réduire la taille de la tumeur et proposer alors une chirurgie conservatrice. Enfin, la radiothérapie permet de traiter les métastases osseuses ou cérébrales, parfois moins sensibles aux autres traitements.

Il reste que les radiations peuvent causer des effets secondaires plus ou moins importants à court ou long terme. Par exemple, le lymphœdème du bras, impressionnante réaction au traitement, est de survenue assez rare mais doit être pris en charge rapidement.

## *La chimiothérapie*

Le principe de la chimiothérapie est d'empêcher les cellules engagées dans le cycle cellulaire de se diviser, avec pour conséquence la mort de ces cellules. L'arsenal des substances chimiques à disposition se répartit en plusieurs grandes familles utilisables en monochimiothérapie ou, le plus souvent, en polychimiothérapie :

- **Antimétabolites** (5 fluoro-uracile, méthotrexate) : ils inhibent la synthèse des acides nucléiques nécessaires à la réplication de l'ADN.
- **Anthracyclines** (epirubicine, doxorubicine, adriamycine) : ils s'intercalent entre les brins d'ADN et inhibent l'activité de la topo-isomérase II qui permet la fusion des brins d'ADN préalable à leur réplication.
- **Agents alkylants** (cyclophosphamide, melphalan) : ils provoquent la dimérisation d'acides nucléiques intra ou intercaténaire bloquant la duplication de l'ADN.
- **Alcaloïdes** (vinorelbine, vindesine, vincristine) : ils déstabilisent les fuseaux mitotiques en se liant à la tubuline qui les composent et empêchent la séparation des chromosomes homologues.
- **Taxanes** (docétaxel, praclitaxel) : ils stabilisent exagérément les fuseaux de tubuline empêchant les cellules de se séparer.

Bien qu'étant l'une des armes thérapeutiques les plus efficaces en usage actuellement, la chimiothérapie reste tristement célèbre en raison de ses nombreux effets secondaires : alopécie (perte des cheveux), diarrhées et vomissements, immuno-dépression, anémie. Cela est dû au fait que les agents chimiothérapeutiques ciblent l'ensemble des cellules en prolifération, sans distinction entre les cellules cancéreuses et les cellules des organes sains, dont la prolifération est nécessaire pour garantir l'homéostasie (cellules de l'épiderme, cellules de l'épithélium du tractus digestif, cellules sanguines). De plus, les taux de réponse au traitement ne dépassent pas 50% pour les meilleurs agents (Tableau 4). L'efficacité de ces

traitements, dépend en effet du taux de prolifération des cellules de la tumeur, qui est hétérogène d'une patiente à l'autre, ainsi que dans la tumeur elle-même. Paradoxalement, les tumeurs à fort index de prolifération (proportion importantes de cellules en division mitotique), tenues comme les plus agressives, seront également les plus sensibles à la chimiothérapie et deviendront donc, après traitement, de meilleur pronostic que des tumeurs proliférant lentement, peu sensibles à la thérapie.

Tableau 4 : **Principaux produits utilisés en chimiothérapie contre le cancer du sein.** *D'après Mignot et Morvan [27].*

<b>Agent</b>	<b>Nom Commercial en France</b>	<b>Taux de réponse (%)</b>
5-FU	5-Fluoro-Uracile	23
Méthotrexate	Ledertrexate®	30
Doxorubicine	Adriblastine®	35
Cyclophosphamide	Endoxan®	34
Melphalan	Alkéran®	21
Vinorelbine	Navelbine®	35
Vincristine	Oncovin®	20
Docétaxel	Taxotère®	<b>50</b>

### *L' hormonothérapie*

C'est ici le premier exemple de thérapie ciblée, définie en fonction d'une caractéristique biologique définie après analyse de la tumeur. La présence de récepteurs hormonaux dans les cellules cancéreuses peut en effet être détectée et dosée à partir de biopsie tumorale. On sait que ces récepteurs, s'ils sont stimulés, favorisent la prolifération des cellules et l'on qualifie alors les cellules d'hormono-dépendantes. La stratégie consiste ici à empêcher l'accès de ces récepteurs aux hormones oestrogéniques en utilisant une molécule antagoniste qui s'y liera à leur place. Le Tamoxifène est actuellement l'inhibiteur compétitif le plus utilisé dans cette optique. Cependant son efficacité sera limitée par l'hormono-indépendance des tumeurs de

certaines patientes et par l'apparition de résistance à l'hormonothérapie dans les tumeurs hormono-dépendantes, les mécanismes impliqués étant encore discutés [34-36].

### *Les traitements innovants*

Les limites des traitements actuels, associées aux effets secondaires parfois lourds, stimulent les réflexions concernant des thérapeutiques ciblées, autres que l'hormonothérapie, pour traiter le cancer du sein. L'objectif est donc de cibler une anomalie biologique considérée comme responsable de la prolifération tumorale ou de l'évolution clinique vers des formes plus agressives (invasion, angiogenèse, dissémination). Ceci requiert par conséquent une meilleure connaissance de ces anomalies biologiques.

L'Herceptine® est le premier médicament répondant à ces critères actuellement utilisable dans le cancer du sein. Il s'agit d'un anticorps monoclonal murin, recombinant et humanisé, dirigé contre la protéine oncogénique c-Erb-B2. c-Erb-B2 (également appelée Her2/neu), appartient à la famille des récepteurs de l'EGF. c-Erb-B2 est surexprimée dans 25 à 30% des cancers du sein et associée à un mauvais pronostic [37,38]. Les études cliniques ont montré que l'utilisation de l'Herceptine® apportait un bénéfice, en terme de survie, aux patientes traitées par chimiothérapie pour des cancers métastatiques [39].

La thérapeutique ciblée en est encore à ses balbutiements, mais d'autres médicaments répondant à ses critères sont actuellement en essais cliniques.

### 1.2.5 Marqueurs tumoraux sériques : premiers pas vers une meilleure distinction des cancers

Ce sont par définition des substances présentes dans les fluides biologiques des patientes, à des taux supérieurs à ceux de sujets sains ou ne présentant pas d'affection cancéreuse. Il s'agit souvent de protéines anormalement exprimées ou surexprimées par les cellules cancéreuses.

Il existe divers marqueurs sériques étudiés dans le cancer du sein (ACE, CA 19-9) mais le plus utilisé est le CA 15-3. En règle générale ces marqueurs ne sont pas utilisés pour le dépistage du cancer par manque de sensibilité (proportion de patientes positives au test trop faible) et de spécificité (proportion de sujet sain positive au test trop élevée). Bien que le niveau de détection du CA 15-3 soit corrélé à la taille de la tumeur primaire et au stade du cancer, aucune étude n'a été réalisée pour montrer l'utilité de ces taux d'expression dans les choix thérapeutiques en matière de traitements adjuvants. En revanche, ce marqueur est un indicateur de rechute métastatique, principalement utilisé pour le suivi du traitement systémique de ces rechutes [1].

Cependant le marqueur CA 15-3 n'est pas détecté chez toutes les patientes, d'où la nécessité de disposer d'un plus grand nombre de marqueurs utilisables seuls ou en combinaisons.

Chaque cancer du sein semble avoir sa propre histoire tant au niveau infra-clinique que clinique. La grande diversité des affections malignes de cet organe réduit considérablement l'efficacité des traitements appliqués aujourd'hui. Une trop grande proportion de patientes ne répond pas à ces traitements, où y répond de façon très hétérogène, rendant les pronostics et les choix thérapeutiques difficiles. La médecine a besoin aujourd'hui de nouvelles cibles thérapeutiques, de plus en plus précises, que la meilleure connaissance de la biologie des cellules cancéreuses pourrait lui apporter.

## **2 Les mucines : les *O*-glycoprotéines des membranes épithéliales**

Parmi les variables biologiques des cellules de cancer du sein, l'expression anormale des mucines a suscité de nombreuses interrogations et recherches. Les mucines sont les protéines de l'interface des épithélia avec l'extérieur du corps. On les retrouve dans les organes des voies aéro-digestives (bouche, poumon, œsophage, estomac, intestin et côlon), ceux des voies urogénitales (vessie, vagin, utérus), dans la muqueuse oculaire et dans la glande mammaire. Leur fonction principale est de créer une barrière physique entre l'extérieur et l'épithélium, pour protéger ce dernier des agressions physiques et bactériennes. La famille des mucines regroupe aujourd'hui vingt membres présentant des particularités structurales distinctes, ainsi qu'un profil d'expression spécifique selon les organes.

### **2.1 Les mucines : une famille hétérogène**

De nombreux articles et revues traitent des mucines dont la famille ne cesse de s'agrandir [40-42]. Les mucines comportent des domaines répétés en tandem un grand nombre de fois, très riches en acides aminés hydroxylés (jusqu'à 50%). La séquence des tandems et le nombre de répétitions varient en fonction des mucines. Les *O*-glycannes étant branchés sur les acides aminés hydroxylés (sérine et thréonine), l'axe protéique, ou apomucine, est densément *O*-glycosylé, de sorte que la masse moléculaire des glycannes représente en général plus de 50% de la masse moléculaire totale [43]. On distingue deux sous-familles de mucines en fonction de propriétés structurales : les mucines sécrétées et les mucines liées à la membrane (Figure 6).

Les mucines sécrétées contiennent typiquement plus de 5000 acides aminés [40,42] et sont de plus grande taille que les mucines associées à la membrane. On retrouve dans ce groupe des domaines riches en cystéines et des domaines D (D1,D2,D3,D4,D') présentant des homologies

avec des domaines du facteur de coagulation von Willebrand, qui favorisent l'oligomérisation des mucines et la formation d'un gel à la surface épithéliale. Ce gel protège les cellules des agressions physiques (pH acide de l'estomac, action des protéases digestives, abrasion mécanique lors du passage du bol alimentaire) et interagit avec la microflore intestinale.

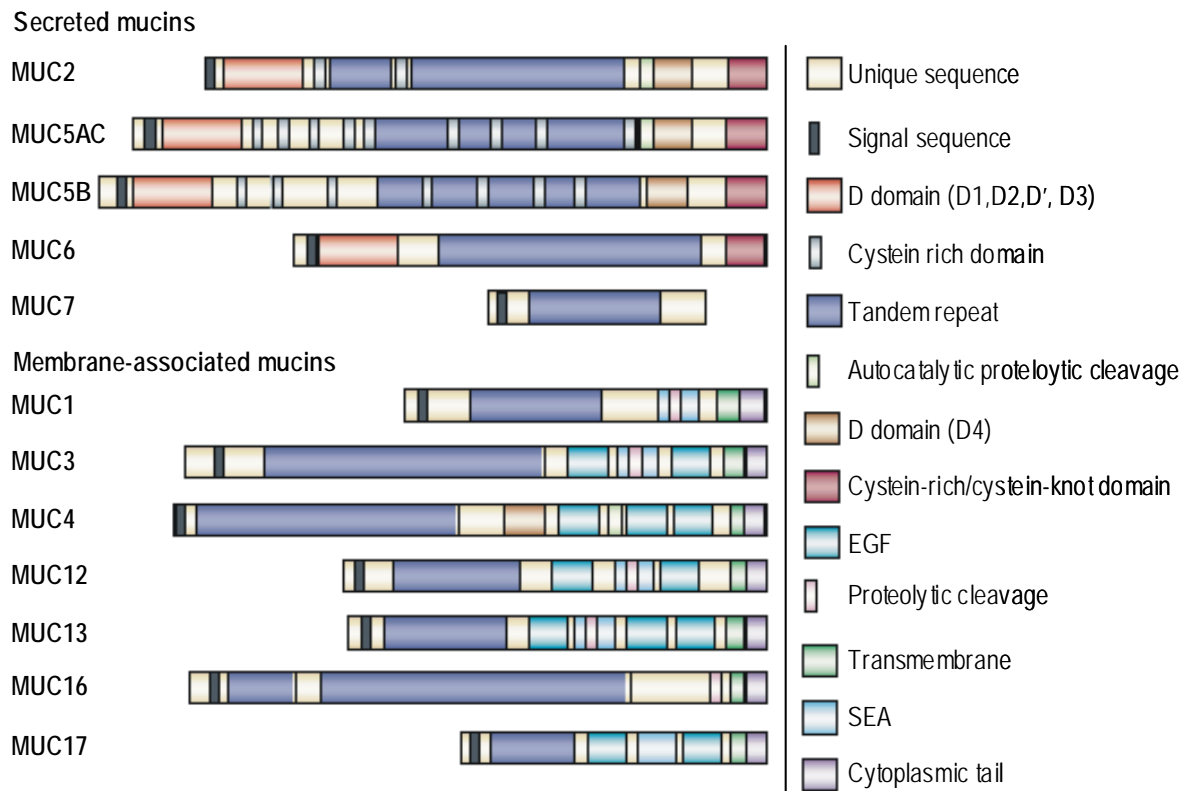


Figure 6 : **Représentation schématique des principales mucines.** D'après Hollingsworth et al. [42].

Les mucines associées à la membrane plasmique possèdent un domaine transmembranaire unique et une courte partie cytosolique qui interagit avec le cytosquelette [44] et qui peut participer à la transduction de signal [45]. On trouve également chez certains membres des domaines de clivages protéolytiques, des domaines SEA "Sperm protein, Enterokinase, Agrin" qui semblent réguler la protéolyse des domaines précédents [46,47], et des domaines homologues à l'EGF dont on pense qu'ils régulent des interactions entre les mucines et les récepteurs de la famille erb-B [48,49]. Les mucines membranaires MUC1 et MUC4 sont



exprimées sous forme d'un complexe hétérodimérique codé par un seul gène. Le précurseur peptidique est clivé dans le réticulum endoplasmique en deux parties inégales : d'une part une courte portion comprenant les domaines cytoplasmique, transmembranaire et quelques dizaines d'acides aminés extracellulaires, d'autre part le reste de la protéine qui contient les séquences répétées en tandem. Bien que ne formant pas de pont disulfure, les deux parties de la molécule forment un complexe stable [50-53].

## **2.2 Mucines exprimées dans les cellules épithéliales mammaires saines et dans le lait**

Les principales mucines exprimées par l'épithélium mammaire normal semblent être des mucines membranaires. L'expression de MUC1 a été étudiée dans la glande mammaire de la souris par Parry *et al.* [54]. MUC1 est exprimée par les cellules canalaire des souris vierges. Cette expression est augmentée dans les cellules alvéolaires des souris gestantes, notamment sous l'effet de la prolactine et de l'hydrocortisone (hormone surrénalienne murine). De plus cette expression se restreint à la surface apicale des cellules polarisées [54,55]. Selon certains auteurs, ce profil d'expression favorise la formation de la lumière des canaux et acini [56], et pourrait aussi protéger la glande développée des intrusions bactériennes.

On retrouve également les mucines à la surface des globules gras du lait (voir 1.1.3 pp 17-18), à savoir MUC1 et MUC-X [57]. MUC-X n'a pas encore été clairement identifiée, mais pourrait correspondre à MUC4 [42,58]. Le rôle de ces mucines dans le lait n'a pas été clairement élucidé, mais il est suggéré qu'elles puissent avoir une fonction protectrice pour le tractus digestif de l'enfant vis-à-vis des bactéries pathogènes. Elles empêchent par exemple les bactéries de se fixer à l'épithélium buccal du nouveau né [59], et pourraient jouer un rôle similaire tout au long du tractus intestinal, puisque ces mucines sont retrouvées intactes dans les selles des enfants nourris au sein [60].

## 2.3 Cancer du sein : comment les mucines participent à la pathologie

Il existe un grand nombre d'études portant sur les anomalies d'expression des mucines et leurs conséquences sur la biologie des cellules cancéreuses de sein. De par leurs propriétés physiques, l'expression des mucines est connue pour avoir un impact sur l'adhésion cellulaire. De plus, on sait aujourd'hui qu'elles interviennent également dans les phénomènes de transduction de signaux et qu'elles modulent les interactions avec les cellules du système immunitaire.

### 2.3.1 Expressions anormales de différentes mucines

Historiquement **MUC1** a été découverte en tant que **marqueur sérique** surexprimé lors des affections malignes. C'est en fait le marqueur CA 15-3, détecté dans le test du même nom par deux anticorps monoclonaux : l'anticorps DF3 généré par immunisation de souris par des cellules métastatiques de cancer du sein [61] et l'anticorps 115D8 généré par immunisation de souris avec des globules gras du lait humain [62]. Les deux anticorps reconnaissent les globules gras du lait ainsi que la quasi totalité des tumeurs du sein [63,64]. L'anticorps DF3 reconnaît un épitope peptidique alors que la spécificité du 115D8 est due à un épitope glycopeptidique sialylé [63]. Il n'y a pas de certitude quant aux mécanismes de libération de MUC1 dans le sérum, mais il a été récemment montré que la protéase extracellulaire ADAM17 peut cliver MUC1 à la surface de cellules utérines [65], suggérant la possibilité d'actions protéolytiques similaires dans les cellules cancéreuses de sein.

L'expression anormale de MUC1 dans le cancer du sein se caractérise à la fois par une **expression élevée** de la protéine et un **profil d'expression cellulaire différent**. L'expression importante d'ARN messager de MUC1 a été observée dans des lignées de cancer du sein et corrélée à l'acquisition de copies surnuméraires du gène [66]. Or, le gain de régions

chromosomiques du bras long du chromosome 1, et notamment la région 1q21 qui contient le gène MUC1, a été observée dans plus de 50% des cas étudiés [67,68]. D'autre part, de nombreuses études immunohistologiques rapportent la détection de MUC1 sur l'ensemble de la membrane plasmique et non plus seulement à la surface apicale de la cellule, comme c'est le cas dans les tissus sains. Cette modification est observée dans 14% des hyperplasies atypiques, 22% des CIC à cellules bien différenciées et 46% des CIC à cellules mal différenciées [69], et est corrélée avec un grade histopronostique des CIC avancé [64]. Cependant, chaque tumeur présente un pourcentage plus ou moins important de cellules marquées, ce pourcentage étant supérieur à 50% dans 6 cancers infiltrants sur 10 [69]. Alors que l'expression de MUC1 semble associée à des pathologies avancées, l'expression détectée sur une proportion importante des cellules d'une tumeur (>75% des cellules) est plutôt corrélée à des cancers infiltrants de faible grade histopronostique, ainsi qu'à la présence des récepteurs hormonaux, témoins d'une bonne différenciation des cellules [69].

**MUC2** est une mucine sécrétée intestinale, détectée dans 28% des CIC de l'étude immunohistologique de Diaz *et al.* [64]. Le marquage était principalement cytosolique (vésicule de sécrétions). Ce même profil de marquage est observé dans 10 à 15% des cancers canaux invasifs et dans 94 à 100% des cancers mucineux observés [70,71]. Les auteurs suggèrent que les mucines sécrétées, formant un gel autour des cellules cancéreuses, empêchent la dissémination des cellules. La différence d'intensité d'expression pourrait alors expliquer les bons pronostics associés aux carcinomes mucineux (voir 1.2.3 pp 24-25) par rapport aux autres cancers infiltrants.

**MUC3**, mucine membranaire intestinale, a également été détecté dans près d'un tiers des CIC étudiés par Diaz et al. [64], sans corrélation avec l'expression de MUC2 ni avec le grade histopronostique des tumeurs.

**MUC4** est probablement la seconde mucine du lait [72]. La forme soluble de MUC4 a été initialement isolée à partir d'un carcinome mammaire de rat particulièrement agressif. Il y aurait **surexpression** dans 30% des cancers du sein [58], en particulier dans les effusions chez des patientes présentant des cancers avancés [73].

**MUC5AC**, mucine sécrétée gastrique et respiratoire, est anormalement détectée 10% des carcinomes de sein infiltrants [71,74].

**MUC6**, mucine sécrétée gastrique, est détectée dans quelques cas d'hyperplasies et de cancers in situ [74,75], dans 15 à 25% des carcinomes mammaires infiltrants [71,75], et dans 71% des carcinomes mucineux [75].

**MUC16** est l'une des dernières mucines dont le gène a été cloné [76]. Elle s'est avérée être un marqueur sérique de cancer, le CA 125, utilisé depuis deux décennies pour le suivi des patientes présentant un cancer de l'ovaire [77,78].

MUC16 est une mucine membranaire (Figure 6) de très haut poids moléculaire (> 500 kDa) [76], dont on ignore encore les mécanismes de libération dans le sérum. Dans une étude immunohistologique [79], MUC16 a été détectée à la surface apicale et dans la lumière canalaire de tous les échantillons d'épithélium mammaire sain. En revanche, seulement 64% des carcinomes se sont avérés positifs avec un marquage cytoplasmique (granules de

sécrétion) et membranaire. Dans cette étude, l'expression de MUC16, cellulaire ou sérique, n'a pas été corrélée avec des paramètres d'agressivité tumorale.

Cependant, plusieurs études ont montré que la détection de taux sériques élevés de MUC16 constitue un bon **marqueur diagnostique** de métastases pleurales [80-82], ainsi qu'un bon **marqueur pronostique** des cancers métastatiques [82,83]. Les raisons biologiques de ces associations restent à déterminer.

### 2.3.2 Modification des propriétés d'adhérence des cellules

Les modifications d'expression de MUC1 reconfigurent les propriétés membranaires des cellules cancéreuses (Figure 7) et on considère que MUC1 agit comme **molécule anti-adhésive** pour les cellules cancéreuses. D'une part, la surexpression de MUC1 peut inhiber les interactions cellule-matrice, en empêchant les interactions des intégrines membranaires avec les composants de la matrice [84]. D'autre part, elle peut inhiber les interactions cellule-cellule en empêchant les interactions homophiliques par la E-Cadherine [85]. On ne connaît pas exactement les mécanismes moléculaires responsables de ces effets mais l'hypothèse la plus souvent formulée reprend l'idée de l'encombrement stérique provoquée par la présence de ces très grandes protéines membranaires richement glycosylées, qui masqueraient les protéines d'adhésion (Figure 7). On pense que ces propriétés anti-adhésives sont de nature à pouvoir favoriser la dissémination des cellules à partir de la tumeur primaire, en diminuant la cohésion de la tumeur.

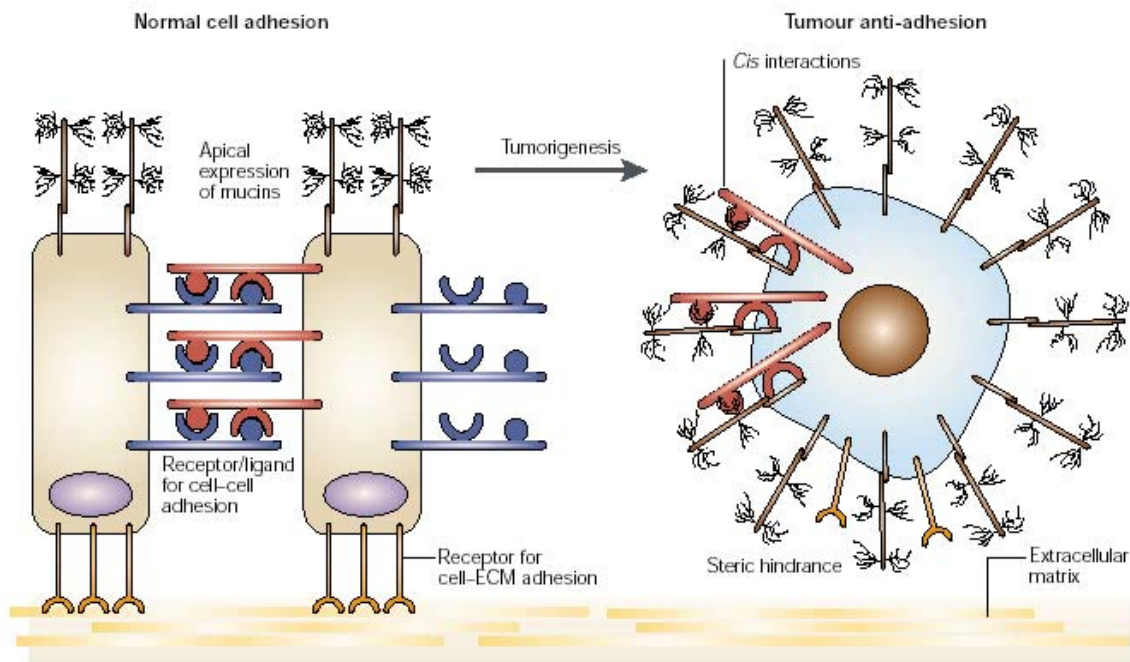


Figure 7 : **Conséquence des modifications d'expression des mucines membranaires sur l'adhérence des cellules.** D'après Hollingsworth et al. [42].

De la même façon, la surexpression de MUC4 dans des modèles de lignées cellulaires (mélanome) provoque des **pertes d'adhésion** aux composants de la matrice extra-cellulaire (laminine, fibronectine, collagène de type IV) [86]. Des études *in vivo* de ces modèles ont montré que MUC4 favorise la **croissance tumorale** et la **formation de métastases** distantes dans des souris immuno-déprimée (souris *nude*) [87,88].

### 2.3.3 Mucines transductrices de signaux : émergence de nouvelles fonctions

Plus récemment, l'intérêt des chercheurs s'est porté sur la **transduction de signal** initiée par les parties cytoplasmiques des mucines membranaires. Deux voies sont actuellement étudiées en ce qui concerne MUC1 (Figure 6) [45]. La première implique la phosphorylation de tyrosines de la queue cytoplasmique de MUC1, qui peut être catalysée par la protéine src [89], ou par le récepteur de l'EGF (erb-B1) [44]. Cette phosphorylation est ensuite impliquée dans l'activation de la voie mitogène des MAP kinases [90,91]. La seconde voie implique l'interaction de la queue cytoplasmique avec la  $\beta$ -caténine, une protéine du cytosquelette.

Cette interaction serait favorisée par la phosphorylation de la queue cytoplasmique de MUC1 [44,89]. On ne connaît pas encore les conséquences exactes de cette interaction, mais on sait que la  $\beta$ -caténine est impliquée dans des processus d'adhésion cellule-cellule (en interagissant avec des cadhérines) [92], et des processus de régulation transcriptionnelle liés à la prolifération et à la différenciation des cellules [93,94].

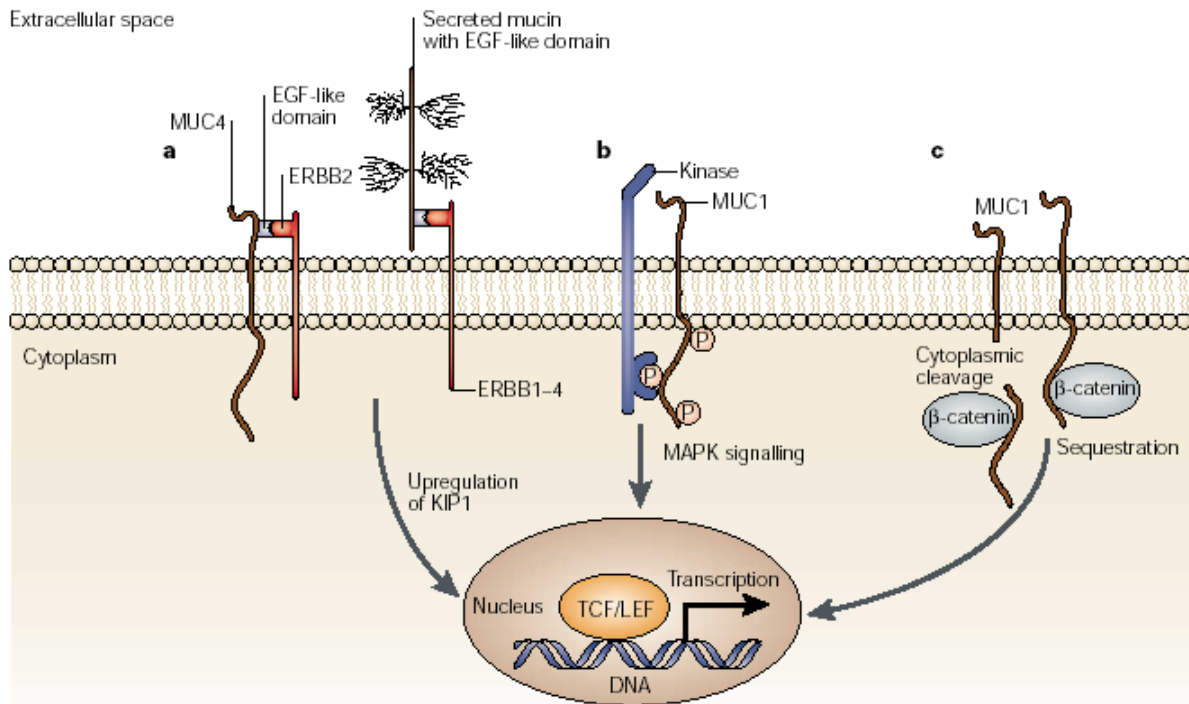


Figure 8 : **Schéma de synthèse des différentes voies de transduction de signal** dans lesquelles les mucines membranaires sont potentiellement impliquées. **a** : voie initiée par des interactions entre les domaines EGF des mucines et les récepteurs de la famille erb-B. **b** : voie initiée par des phosphorylations du domaine cytoplasmique de la mucine. **c** : voie impliquant une interaction entre le domaine cytoplasmique de la mucine et la  $\beta$ -caténine. Ces différentes voies ne sont pas nécessairement exclusives l'une de l'autre et pourraient participer à des mécanismes complexes les impliquant simultanément. D'après Hollingsworth et al. [42].

MUC4 est également capable de réguler la transduction de signaux *via* sa partie cytoplasmique [45]. Il a été montré que MUC4, grâce à ses domaines de type EGF, agit comme ligand membranaire du récepteur erb-B2, induisant des signaux de transduction pro-différenciation et anti-apoptotique impliquant la protéine  $p27^{kip1}$  (Figure 8) [49]. Il a donc été suggéré que l'association MUC4/erb-B2 favoriserait la différenciation et la survie des cellules, plutôt que leur prolifération [95].

Ces observations sont encore trop fragmentaires et contradictoires pour conclure au rôle exact de MUC4 dans le développement du cancer du sein. Nous manquons notamment d'informations cliniques et d'études *in vitro* détaillées de lignées cancéreuses mammaires.

#### 2.3.4 Les mucines vues par le système immunitaire : cibles ou modulateurs ?

Parce que les mucines sont exprimées par les cellules épithéliales, isolées de la circulation sanguine par la lame basale (voir 1.1.2 pp 14-15), on peut les considérer comme des molécules antigéniques inconnues du système immunitaire. De fait, les mucines libérées dans le sérum, telle que MUC1, peuvent induire des **réponses immunitaires de type humoral**. Le dosage de complexes immuns sériques (CIS) MUC1/anticorps anti-MUC1 a révélé que 25% des patientes ayant un cancer du sein avancé développent une telle réponse [96,97]. Les CIS ont été plus fréquemment observés chez des patientes sans atteintes des ganglions (32%) que chez des patientes présentant des métastases ganglionnaires (20%) [97]. D'après les auteurs, la présence des anticorps serait le témoin d'un contrôle immunitaire du développement du cancer. De tels complexes immuns ont également été mis en évidence chez des femmes non atteintes de cancer mais qui ont connu au moins une grossesse (voir 1.1.1 p 11), et dont on sait par ailleurs qu'elles présentent moins de risque de développer un cancer du sein [98]. L'immunogénicité de MUC1 a été largement étudiée et plusieurs sites antigéniques peptidiques ont été identifiés [99]. La reconnaissance de MUC1 par des anticorps est toutefois modulée par la glycosylation de la protéine [99]. Par ailleurs, le rôle protecteur des anticorps anti-MUC1, vérifié sur des modèles animaux, a initié le développement de vaccin anti-cancéreux utilisant des fragments peptidiques de MUC1 comme immunogènes [99].

Il peut exister une **réponse immunitaire de type cellulaire** à l'encontre de MUC1 [100,101]. Cette réponse est d'efficacité variable selon les patientes en fonction du niveau d'expression



et/ou de modulations d'antigénicité [102]. En particulier, le haut degré de glycosylation de MUC1 réduit l'efficacité de présentation des déterminants antigéniques par les cellules dendritiques [103], et par conséquent limite la réponse cellulaire cytotoxique. Par ailleurs, la surexpression de MUC4 est associée à une inhibition de la cytotoxicité de lymphocytes T activés [80]. Les auteurs suggèrent que cette inhibition serait due au masquage de sites antigéniques de la surface cellulaire, et à l'inhibition des interactions cellulaires provoquées par l'encombrement stérique des mucines.

MUC1 étant également exprimée par les lymphocytes T activés [104] et les cellules dendritiques [105], ne constituerait donc pas un marqueur réellement spécifique des cellules épithéliales cancéreuses. La fonction de MUC1 chez les lymphocytes est encore mal connue, mais on sait que la régulation de la *O*-glycosylation de la protéine module les processus d'extravasation capillaire nécessaire à l'infiltration tissulaire des cellules immunitaires sur les sites d'inflammation [106]. De plus, MUC1 peut aussi être le ligand d'une protéine membranaire exprimée par les cellules endothéliales : ICAM1 (intercellular adhesion molecule) [107]. L'interaction MUC1/ICAM1 favorise également l'extravasation des lymphocytes. Or, la présence de MUC1 soluble dans un milieu de culture empêche l'interaction de cellules exprimant MUC1 sur leur membrane avec la protéine ICAM1 [107]. De façon similaire, la présence de MUC1 dans la circulation sanguine pourrait empêcher l'infiltration des lymphocytes cytotoxiques sur le site tumoral et ainsi **moduler la réponse immunitaire**.

Il a été également suggéré que MUC1 puisse jouer un rôle dans la régulation de la réponse immunitaire en inhibant la prolifération des lymphocytes T [108]. Cette inhibition a été observée *in vitro* [104,109,110] et associée à une action pro-apoptotique de MUC1 sur les cellules T [109]. Cependant, Paul *et al.* nuancent ces observations en comparant l'effet de

plusieurs lignées de cancer du sein : MUC1 produite par la lignée T47-D inhibe la prolifération des lymphocytes, celle produite par la lignée MCF-7 est sans effet [111]. L'effet immuno-modulateur de MUC1 semble donc soumis à une variabilité dont l'origine est à préciser (présence de co-activateurs, modulation de la *O*-glycosylation...).

La diversité des anomalies liées aux mucines illustre bien la diversité biologique des cancers du sein. Même si beaucoup de données reposent actuellement sur les études centrées sur MUC1, on voit émerger d'autres mucines (MUC4, MUC16) dont l'incidence sur le développement cancéreux devrait être précisée dans les années à venir. De plus, la variété des phénomènes dans lesquels MUC1 ou MUC4 sont impliquées, les contradictions apparentes de diverses observations ou la persistance de certaines zones d'ombre, trahissent l'existence d'un niveau de complexité supérieur. Cette complexité pourrait être due, au moins en partie, à la *O*-glycosylation des mucines.

### **3 la *O*-glycosylation, modification post-traductionnelle importante des mucines**

Bien que pouvant porter des *N*-glycannes, présents aux extrémités peptidiques des mucines sécrétées ou dans les zones juxta-membranaires des mucines cellulaires, la grande majorité de la glycosylation des mucines est composée de *O*-glycannes, liés au niveau des séquences répétées en tandem et comptant pour 50 à 80% de la masse moléculaire de la glycoprotéine [40,42]. Cette densité confère aux mucines une grande résistance aux protéases ainsi qu'une certaine rigidité, due à l'encombrement stérique des chaînes glycaniques et à des phénomènes de répulsion de charges négatives inter-chaînes, qui forcent la protéine à se maintenir sous forme linéaire. Les monosaccharides habituellement retrouvés dans ces glycannes sont la *N*-acetylgalactosamine (GalNAc), le galactose (Gal), la *N*-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc), et les acides sialiques principalement représentés chez l'Homme par l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac). Cependant, la structure des *O*-glycannes est très variable en fonction de leur taille, de leur composition en monosaccharides, de la séquence des monosaccharides, des anoméries de liaison et des éventuels branchements observés. Tous ces paramètres sont gouvernés par l'expression et l'activité de multiples enzymes golgiennes, les glycosyltransférases.

#### **3.1 Structure et composition des *O*-glycannes**

On peut distinguer trois parties structurales dans les glycannes liés aux protéines (Figure 9) : une région noyau ou "core", proche de l'axe peptidique ; une région squelette plus ou moins étendue ; une région périphérique terminale. Les régions squelette et périphérique sont communes aux *N*- et *O*-glycannes, leur biosynthèse pouvant être assurée par les mêmes enzymes. La spécificité des uns par rapport aux autres réside donc essentiellement dans les régions noyaux.

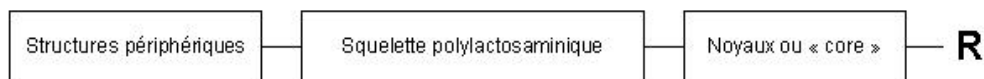


Figure 9 : **Représentation schématique des glycanes de la surface cellulaire.** Le noyau peut être lié à un radical (R) protéique (par une liaison *N*- ou *O*-glycosidique) ou lipidique. Le corps du glycanne est constitué d'une ou plusieurs chaînes N-acétyllactosaminiques, ramifiées ou non. Les structures périphériques sont souvent des antigènes de groupe sanguin ou des structures apparentées. *D'après Dabelsteen [112].*

### 3.1.1 Biosynthèse et enzymes impliquées

La biosynthèse des *O*-glycanes est un mécanisme **post-traductionnel** qui se déroule dans l'appareil de Golgi. Les **glycosyltransférases**, enzymes membranaires, catalysent le transfert de monosaccharides à partir de glycosyl-nucléotides (UDP-GalNAc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc, GDP-Fuc, CMP-Neu5Ac), sur les résidus hydroxylés des acides aminés de la chaîne peptidique de protéines en transit, ou sur des structures mono- ou oligosaccharidiques préexistantes. Chaque glycosyltransférase est spécifique du monosaccharide transféré et de l'anométrie de liaison formée, et n'est spécifiquement active que sur une ou quelques structures acceptrices. Ce mécanisme est **séquentiel** et commence toujours par le transfert d'une GalNAc sur un résidu de sérine ou de thréonine.

La famille des **peptidyl-GalNAc-transférases** catalyse ce transfert. Cette famille compte actuellement 12 membres clonés chez l'homme, qui présentent des profils d'expression tissulaires et temporels distincts, mais qui sont aussi souvent co-exprimés dans un même type cellulaire [113]. Plusieurs de ces enzymes semblent en effet nécessaires pour assurer la glycosylation "normale" d'une mucine dans une cellule saine, sans que l'on connaisse encore précisément le rôle de chacune ni les mécanismes qui régulent leur activité [113]. En absence d'élongation, le résidu de GalNAc lié à l'axe peptidique peut être reconnu par des anticorps et porte le nom d'**antigène Tn** (Thomsen-nouveau). L'antigène Tn peut être sialylé par la sialyltransférase **ST6GalNAc I** qui transfère un acide sialique en  $\alpha$ 2-6 sur la GalNAc formant

alors l'**antigène sialyl-Tn** [114]. Cette sialylation empêche toute autre substitution et stoppe prématurément la synthèse du *O*-glycane.

A l'inverse, l'addition de résidus Gal et/ou GlcNAc, par des galactosyltransférases ou des N-acétylgalactosaminyltransférases, va aboutir à la formation de noyaux ou "**core**" di- ou trisaccharidiques (Figure 10). Les noyaux 1, 2, 3 et 4 sont communs à de nombreuses glycoprotéines [115-117], les autres semblent avoir des profils d'expression tissulaires plus restreints [115,118]. Au sein d'une cellule, c'est le profil d'expression des glycosyltransférases ainsi que leur niveau d'activité relatif qui va définir la nature des noyaux formés ainsi que leur proportion. Par exemple, la GalNAc initiale peut être sialylée en position 6 après formation du noyau 1 ou 3 ce qui empêche la formation des noyaux 2 ou 4, or c'est à partir des noyaux 2 et 4 que peut s'effectuer l'élongation du *O*-glycane par l'élaboration de la région squelette.

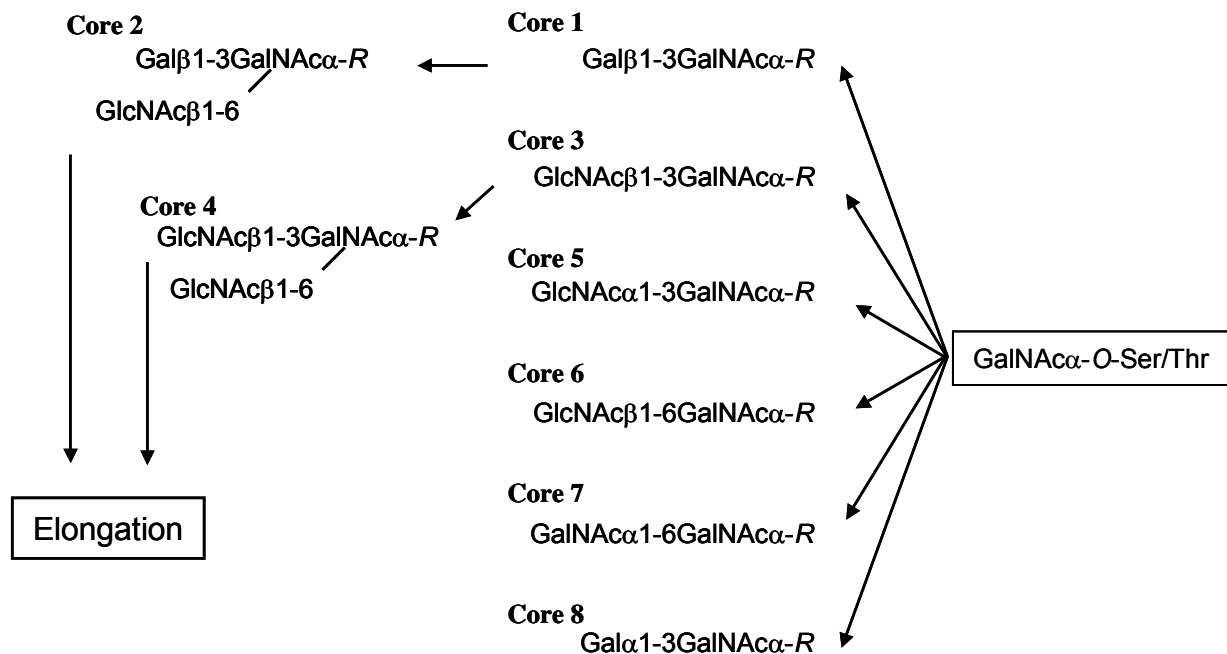


Figure 10 : Les différents noyaux ou "cores" des *O*-glycannes de types muciniques. R : résidu de sérine ou de thréonine.



On retrouve en **périphérie** des structures variées, résultant de la sialylation ou de la fucosylation du dernier maillon disaccharidique du squelette sur lequel peuvent être également transféré du galactose ou de la *N*-acétylgalactosamine liés par des liaisons  $\alpha$ . Les structures formées sont porteuses d'une antigénicité liée au groupes sanguins (A, B, H, Lewis) (Figure 12).

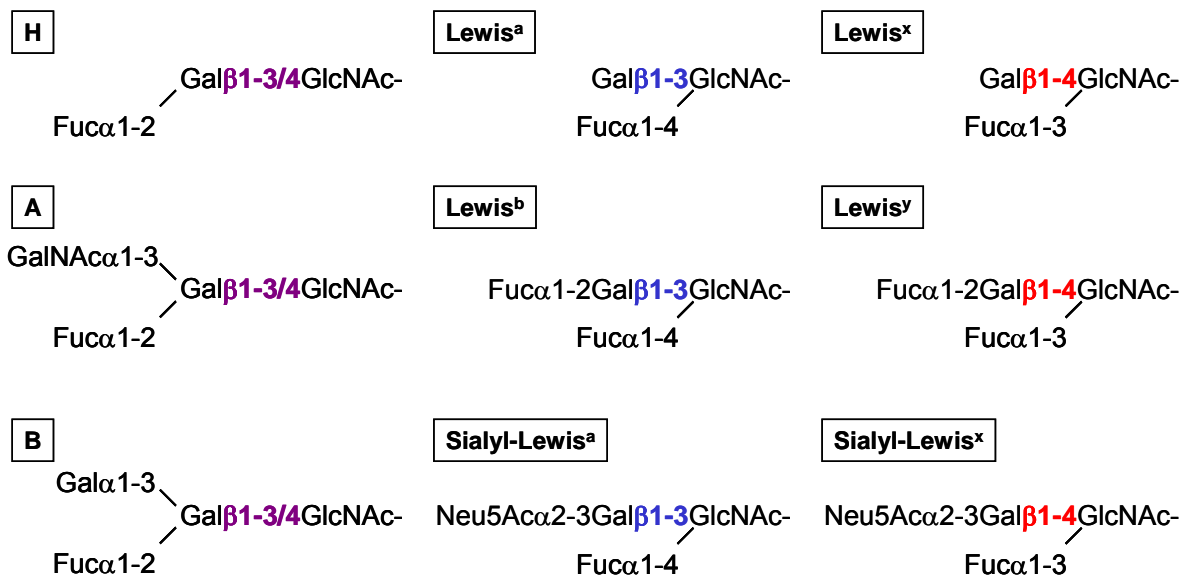


Figure 12 : **Exemples de structures périphériques que l'on peut retrouver sur les O-glycannes.** Ces structures sont responsables des antigénités liées aux groupes sanguins qui peuvent également être observées sur des N-glycannes.

Enfin, les O-glycannes muciniques peuvent être sulfatés, principalement en position 3 sur le galactose ou en position 6 sur la glucosamine [119]. Ces sulfates apportent des charges négatives et peuvent modifier les antigènes périphériques (ex : sulfo-lewis<sup>x</sup> [119]), ou empêcher l'élongation des glycannes (ex : sulfatation du core 1 [120]).

### 3.1.2 O-glycosylation dans les cellules de sein normales

Il existe relativement peu de données concernant la glycosylation des mucines de l'épithélium mammaire sain. Celle-ci a d'ailleurs été étudiée de façon indirecte par l'analyse des glycannes des mucines du lait ou des mucines produites par des lignées de cellules mammaires normales, isolées du lait et immortalisées (lignée MTSV1-7) [121]. Les informations dont nous disposons ont été obtenues selon trois approches complémentaires : la détection de structures par l'utilisation d'anticorps ou de lectines, la prédiction des structures synthétisées par l'analyse de l'expression et des activités relatives des glycosyltransférases, et l'analyse en spectrométrie de masse des *O*-glycannes portés par les cellules (approche globale) ou par une protéine isolée.

Müller *et al.* ont montré que 45% des résidus de sérine et de thréonine des séquences répétées en tandem de MUC1 portent des *O*-glycannes [122]. Ceux-ci sont majoritairement construits sur la base du **core 2** et possèdent des chaînes polylactosaminiques de longueur variable (légèrement plus longues sur les mucines de lait que sur les mucines d'origine cellulaire), sialylées en  $\alpha$ 2-3 sur les résidus de Gal terminaux [118,123-127].

### 3.1.3 Perturbations de la O-glycosylation dans le cancer du sein : les masques O-glycanniques des cellules tumorales

Les données sont ici plus fournies d'abord parce qu'il existe de nombreuses lignées cancéreuses de sein en culture, ensuite parce que les chercheurs disposent également de matériel provenant des biopsies opérées sur les patientes. Les modifications observées sont, une fois de plus, variables en fonction des modèles et peuvent être de plusieurs natures : variation du degré de *O*-glycosylation de la mucine en terme d'occupation des sites, biosynthèse incomplète des noyaux empêchant l'élongation normale du glycanne, diminution



de la longueur des chaînes lactosaminiques, modification des structures périphériques avec, notamment, une augmentation de leur sialylation.

Dans les lignées cellulaires cancéreuses étudiées (MDA-MB-231, T47-D, MCF-7 et ZR-75-1), il a été observé une **augmentation du taux de O-glycannes** portés par l'apomucine qui peut atteindre 90% des sites substituables [128,129]. Cette augmentation pourrait s'expliquer par une augmentation des niveaux d'activité des peptidyl-GalNAc-transférases, mais la seule étude effectuée à ce jour a montré que ces niveaux d'activité étaient similaires voire inférieurs dans les lignées cancéreuses comparée à une lignée de cellules normales [125]. Une autre hypothèse souligne l'influence du raccourcissement des O-glycannes, voire du ralentissement de la dynamique de synthèse, qui permettrait une meilleure accessibilité de l'apomucine aux peptidyl-GalNAc-transférases [129-132]. Cette vision d'un ralentissement de la vitesse de synthèse peut être appuyée par le fait que les mucines sont souvent surexprimées dans les cancers, ce qui pourrait saturer la machinerie golgienne de la O-glycosylation.

En accord avec cette hypothèse, la détection anormale de l'**antigène Tn** dans le cancer du sein témoigne du défaut de formation du core 1. L'antigène Tn, détecté par des lectines (HPA ou VVA-B4) ou des anticorps monoclonaux, a été mis en évidence au niveau de lésions bénignes de l'épithélium mammaire (hyperplasie) [133], ainsi que dans près de 90% des tumeurs primaires [134-137]. Cette expression dans les tumeurs est liée à l'agressivité tumorale [136-138], et notamment associée à un stade TNM élevé [137], à l'invasion des ganglions lymphatiques et à une diminution du temps de survie [137,138]. L'expression de l'antigène Tn dans les lignées cellulaires en culture semble plus controversée. Il n'est pas immuno-détecté dans des lignées normales immortalisées telles que AG11132 [139] ou HBL100 [140]. A l'inverse, il est détecté à l'aide d'anticorps ou de lectines à la surface de lignées cancéreuses telles que HTB24, ZR75-30, MCF-7, MDA-MB-231 et T47-D [127,139-141].

Paradoxalement, les études des *O*-glycannes par spectrométrie de masse ne mettent pas en évidence la présence de l'antigène Tn dans les lignées de cancer du sein MDA-MB-231, T47-D, MCF-7 et ZR-75-1 [129]. Cette apparente incohérence est peut-être due à leur faible représentation, Lloyd *et al.* rapportant que seulement 8% des *O*-glycannes produit par la lignée T47-D correspondent à la structure monosaccharidique [126].

Une autre des anomalies des "cores" *O*-glycanniques associée au cancer est le **défaut de synthèse du core 2**. L'absence de cette structure trisaccharidique empêche l'elongation normale du glycanne (Figure 10). Ce défaut peut survenir de multiples façons comme il l'a été démontré ou suggéré. D'abord la perte ou la diminution de l'activité  $\beta$ 1,6-GlcNAc transférase nécessaire à sa synthèse a été observée dans les lignées T47-D et BT-20 [126]. Cette activité semble due à l'enzyme C2GnT1, qui est peu ou pas exprimée dans ces lignées [142].

D'autre part, des compétitions enzymatiques pourraient empêcher la C2GnT1 d'agir sur son accepteur. La sialyltransférase ST3Gal I, surexprimée dans les cancers du sein [143], semble capable d'exercer une telle compétition. La surexpression de cette enzyme transfectée dans des cellules mammaires normales a induit l'apparition d'antigène T sialylé en  $\alpha$ 2-3 sur le galactose (Figure 13) et une diminution des structures étendues sur la base du noyau de type core 2 [142]. De plus, la proportion de structures étendues a été directement reliée au rapport des activités respectives de ST3Gal I et de la C2GnT1 dans des cellules cancéreuses transfectées [144]. De la même façon, l'action d'une sulfosyltransférase, ajoutant un groupement phosphate en position 3 du galactose du core 1, empêche la C2GnT1 d'agir subséquemment [120]. Ce type d'activité sulfotransférase a été détecté de façon élevée dans des tumeurs de sein [145] et retrouvée dans des lignées cancéreuses mammaires [146]. Enfin, la surexpression de la sialyltransférase ST6GalNAc II, dans des cellules cancéreuses

gastriques, conduit à la sialylation en  $\alpha 2-6$  de la GalNAc initiale, empêchant la C2GnT1 de brancher une GlcNAc sur cette même position (Figure 13) [147]. Cependant le niveau d'expression de cette enzyme n'a pas été étudié dans le cancer du sein.

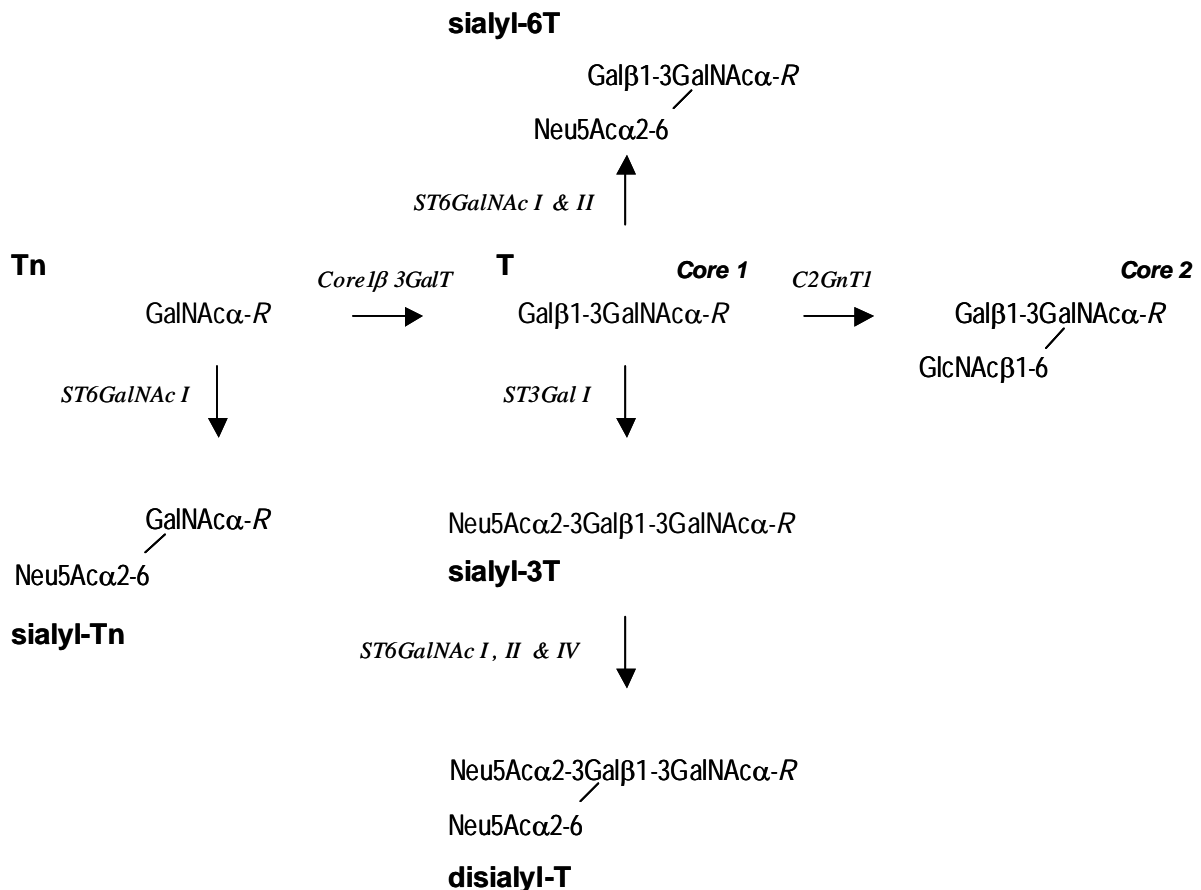


Figure 13 : **Schéma de biosynthèse des antigènes de Thomsen-Friedenreich.** Les antigènes T ou TF (Thomsen-Friedenreich), Tn (Thomsen-nouveau) et leurs dérivés sialylés constituent ce groupe d'antigènes O-glycanniques, proches de l'axe peptidique au contraire des antigènes périphériques. Les noms des antigènes sont indiqués en gras. Les enzymes responsables des synthèses sont indiquées en italiques à côté des flèches. R : résidu de sérine ou de thréonine.

Un point commun entre toutes les lignées cancéreuses étudiées est la **réduction de la taille des glycannes**. Alors que l'on peut observer des structures allant jusqu'à 16 résidus monosaccharidiques sur les mucines normales, les O-glycannes des mucines cancéreuses observés ne contiennent jamais plus de 9 résidus [129]. Ceci démontre que même lorsque le

core 2 est synthétisé, la taille des chaînes lactosaminiques est réduite dans les cellules cancéreuses.

Enfin, les glycoprotéines des cellules cancéreuses sont anormalement **hypersialylées**. Des taux sériques élevés d'activité sialyltransférase ont été mis en évidence chez des patientes présentant un cancer du sein [148,149]. De même, le niveau d'activité des sialyltransférases est plus élevé dans les tissus cancéreux que dans les tissus sains, et corrélé avec le volume de la tumeur [150]. La quantité d'acide sialique présente dans les tissus tumoraux est également plus élevée [151]. Tout ces éléments témoignent d'une augmentation de la sialylation lors la cancérogenèse, cependant les niveaux d'expression de sialyltransférases spécifiques dans les cancers du sein ont été assez peu étudiés en détail [143,152].

Les conséquences de cette hypersialylation sont d'une part l'inhibition de l'élongation normale des *O*-glycannes comme vu précédemment, et d'autre part, lorsque les chaînes lactosaminiques ont été préservées, l'apparition ou la surexpression de structures périphériques sialylées, tels que les antigènes sialyl-Lewis<sup>x</sup> et sialyl-Lewis<sup>a</sup> (Figure 12). Ces structures, que l'on peut retrouver aussi bien sur des *N*-glycannes que sur des *O*-glycannes, sont plus souvent présentes que leurs formes non sialylées dans les cancers du sein [153]. Elles peuvent être portées par des mucines produites par des cellules cancéreuses, notamment par MUC1 [154,155].

L'antigène **sialyl-Lewis<sup>x</sup>** n'est pas exprimé dans les tissus sains [156], alors qu'il est détecté dans 32,2 à 68,3% des tumeurs primaires [153,156,157], la fréquence augmentant pour les cancers métastatiques [156]. Cette expression est associée à l'invasion des ganglions lymphatiques et à une diminution de survie. [157,158].

L'antigène **sialyl-Lewis<sup>a</sup>** (qui est également le marqueur sérique CA 19.9) est peu ou pas exprimé dans les tissus sains [156,159]. Il est détecté dans 22,6 à 62% des tumeurs primaires,

en association avec une faible différenciation des cellules et avec l'invasion des ganglions lymphatiques [153,156,157,159,160]. De façon cohérente, la forte expression de la sialyltransférase ST3GalIII, impliquée dans la biosynthèse de l'antigène sialyl-Lewis<sup>a</sup>, a été corrélée avec l'invasion des ganglions et une diminution du temps de survie moyen des patientes [152].

#### 3.1.4 Influences des *O*-glycannes sur le développement cancéreux

Les modifications de *O*-glycosylation qui peuvent survenir sont donc variées et complexes. Mais la fréquence d'observation de ces modifications dans les cancers semble indiquer qu'elles favorisent le développement tumoral. Ceci se vérifie pour un certain nombre d'entre elles qui sont associées directement à l'agressivité tumorale (expression des antigènes Tn, sialyl-Lewis<sup>x</sup> et sialyl-Lewis<sup>a</sup>). Bien que l'on sache encore peu de choses sur les mécanismes responsables de cette agressivité, des données fragmentaires permettent d'étayer quelques hypothèses.

##### *Incidence sur les propriétés anti-adhésives des mucines*

La *O*-glycosylation des mucines leur confère des propriétés physiques particulières. On peut donc penser que la modification de la *O*-glycosylation va moduler ces propriétés. Toutefois, il est difficile de prédire l'effet combiné d'une augmentation de la densité des *O*-glycannes, de leur raccourcissement et de leur hypersialylation, comme c'est le cas chez plusieurs lignées étudiées [129].

Cependant, des analyses de Résonance Magnétique Nucléaire ont montré que l'existence de *O*-glycannes rapprochés favorise le maintien de l'axe peptidique sous une forme étendue et rigide [161,162]. Le taux d'occupation élevé des sites de *O*-glycosylation des mucines cancéreuses pourrait avoir les mêmes conséquences, en faveur d'une augmentation des effets anti-adhésifs reconnus des mucines membranaires. De plus, l'influence positive des acides

sialiques sur les propriétés anti-adhésives de MUC1 a également été mis en évidence [72,163]. Cette influence pourrait s'exercer par des effets de répulsion de charges négatives apportées par les groupements acides de ces monosaccharides. Ces deux facteurs ne sont pas incompatibles et leur combinaison pourrait avoir des effets plus marqués encore.

#### *Interaction avec l'endothélium*

Comme exposé dans les paragraphes précédents, l'expression des antigènes périphériques sialyl-Lewis<sup>x</sup> et sialyl-Lewis<sup>a</sup> est associée à l'apparition de métastases distantes. Or, ces antigènes sont les ligands de la E-sélectine, une protéine membranaire exprimée par les cellules endothéliales, possédant un site de reconnaissance de type lectinique. L'interaction sialyl-Lewis<sup>x/a</sup> / E-sélectine est impliquée dans les phénomènes de recrutement des leucocytes circulants, qui expriment les antigènes, sur les sites d'inflammation. Elle modulerait le processus d'extravasation des cellules immunitaires [164,165]. Les cellules cancéreuses circulantes exprimant ces antigènes, pourraient aussi utiliser cette interaction avec les cellules endothéliales lors du processus de formation de métastases distantes par voie sanguine. En accord avec cette hypothèse, Renkonen *et al.* ont mis en évidence une expression accrue de E-sélectine endothéliale sur les sites de métastases du cancer du sein [156].

De plus, les cellules cancéreuses peuvent également adhérer aux cellules endothéliales *via* l'interaction MUC1/ICAM1 [107]. La double reconnaissance de MUC1 et de déterminants antigéniques potentiellement portés par elle par deux récepteurs endothéliaux ICAM1 et E-selectine pourraient accroître l'affinité des cellules cancéreuses pour les cellules endothéliales, et participer d'un même phénomène d'extravasation.

### *Interaction avec les Siglecs.*

Il existe une famille de protéines membranaires qui reconnaissent spécifiquement les acides sialiques : les "Sialic acid binding immunoglobulin-like lectins" ou Siglecs, qui appartiennent à la super-famille des immunoglobulines. Cette famille compte onze membres connus qui ont en commun un domaine Ig de type V N-terminal, liant l'acide sialique, et un nombre variable de domaine Ig de type C2 le tout constituant la partie extracellulaire de la protéine [166,167]. Toutes les siglecs sont exprimées par des cellules du système immunitaire selon un profil d'expression spécifique à chacune des lignées [166]. De plus, la spécificité de reconnaissance des siglecs dépend de l'anométrie de liaison et de la structure glycanique sur laquelle l'acide sialique est greffée. Par exemple, la structure Neu5Ac $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ -R, qui peut correspondre au core 1 sialylé en  $\alpha$ 2-3 (antigène sialyl-3T), est particulièrement bien reconnue par la siglec 1, reconnue avec une moindre affinité par les siglecs 3 et 4 et pas du tout reconnue par la siglec 2 qui reconnaît de préférence des structures sialylées en  $\alpha$ 2-6 [166]. La fonction physiologique de ces siglecs est encore l'objet de nombreuses hypothèses, dont la régulation négative de l'activation lymphocytaire ou l'inhibition de la cytotoxicité des cellules de l'immunité innée [167].

L'expression de la siglec 3, aussi appelé CD33, est restreinte aux macrophages. On la retrouve notamment sur les macrophages infiltrant les tumeurs. Nath *et al.* ont montré que cette siglec reconnaissait des structures sialylées à la surface des cellules de cancer du sein MCF-7, T47-D et BT-20, ces structures étant portées par la protéine MUC1 dans les cellules MCF-7 [168]. Cette interaction pourrait favoriser l'infiltration tumorale des macrophages, tout en prévenant leur cytotoxicité à l'égard des cellules cancéreuses. Or, l'infiltration des macrophages dans les tumeurs de sein est associée avec une angiogenèse importante et une diminution du temps de survie moyen [169].

La *O*-glycosylation est un processus d'apparence simple mais qui s'avère particulièrement complexe dans sa régulation. La fonction "triviale" de la *O*-glycosylation des mucines est sans doute de leur conférer les propriétés physiques nécessaires à la constitution du gel muqueux qui protège les cellules épithéliales, en agissant notamment sur la conformation du squelette protéique. Mais il semble que la régulation d'expression de motifs *O*-glycanniques sur les mucines membranaires jouent également un rôle dans la modulation des interactions cellulaires utiles au fonctionnement du système immunitaire. Les modifications de *O*-glycosylation observées lors des cancers du sein, associées aux modifications d'expression des mucines membranaires, favorisent indéniablement le développement tumoral, probablement en tirant profit de mécanismes physiologiques existants. Parmi ces modifications, l'expression anormale de l'antigène sialyl-Tn a été largement étudiée dans les cancers épithéliaux dont les cancers du sein.



### 3.2 l'antigène sialyl-Tn

Les années 80 sont marquées par la recherche de nouveaux marqueurs cancéreux utiles pour le diagnostic et le suivi d'évolution des cancers. L'anticorps B72.3 est obtenu par immunisation de souris par des fractions de membrane de cellules de cancer du sein métastatiques [170]. L'épitope reconnu par cet anticorps, une glycoprotéine de haut poids moléculaire (200-400 kDa), est appelée TAG-72 (Tumour Associated Glycoprotein). Quelques années plus tard, Gold *et al.* démontrent que la spécificité de l'anticorps dépend d'une structure sialylée simple, Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr, correspondant à la sialylation de la structure Tn et donc appelée antigène sialyl-Tn (STn) [171]. Il apparaît très vite que l'expression de cet antigène est particulièrement marquée dans les pathologies cancéreuses alors qu'elle ne se retrouve que de façon très restreinte au niveau des tissus sains. L'antigène STn est alors considéré comme un bon marqueur cancéreux et il inspire de nombreuses études cliniques visant à déterminer son intérêt diagnostique et pronostique.

Au cours de la préparation de cette thèse, la compilation des résultats de ces études cliniques a donné lieu à la rédaction d'une revue générale, dressant un bilan des recherches dans les différents types de cancers et l'avancement des développements thérapeutiques liés au STn. Cette revue intitulée "Sialyl-Tn antigen in Cancer : from Diagnosis to Therapy", est insérée dans ce chapitre en tant que paragraphe (3.2.2). Dans les autres paragraphes, les données importantes dans le cadre restreint des cancers du sein seront simplement soulignées, avant de présenter l'utilité et les enjeux de la poursuite des recherches sur l'antigène STn.

### 3.2.1 Biosynthèse

L'antigène STn résulte de la sialylation en  $\alpha$ 2-6 de la GalNAc initiale des *O*-glycannes avant tout autre transfert de monosaccharides. La structure synthétisée (Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr) est le *O*-glycane sialylé le plus simple qui puisse exister. L'enzyme qui catalyse ce transfert est une sialyltransférase (ST) qui doit être spécifique de la GalNAc et doit former une liaison  $\alpha$ 2-6 ; il s'agit donc d'une ST6GalNAc. Six ST6GalNAc ont été clonées chez l'Homme [172]. Deux d'entre elles, ST6GalNAc I et ST6GalNAc II, partagent à peu près la même spécificité de substrat accepteur et sont capables d'agir sur le core 1 ou le core 1 sialylé en  $\alpha$ 2-3 (sialyl-3T) pour former respectivement l'antigène sialyl-6T et l'antigène di-sialyl-T (Figure 11). Cependant, bien que ST6GalNAc II soit capable de transférer de l'acide sialique sur la structure GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr dans des tests *in vitro* [173], ST6GalNAc I est beaucoup plus efficace pour réaliser ce transfert [114,173,174]. De plus, l'expression de l'antigène STn dans des cellules cancéreuses de côlon de rat est corrélée à l'expression de ST6GalNAc I [175], alors que ST6GalNAc II, exprimée de façon endogène dans des lignées cancéreuses de sein (MDA-MB-231, MCF-7, T47-D) [174], n'induit pas l'expression de l'antigène [129]. L'ensemble de ces observations indique que ST6GalNAc I est probablement l'enzyme responsable de l'expression de l'antigène STn *in vivo*.

Enfin, Ikehara *et al.* ont montré que l'expression de l'antigène STn, induite par la transfection de l'ADNc de ST6GalNAc I dans des cellules cancéreuses gastriques, s'accompagne d'une diminution d'expression de l'antigène sialyl-Lewis<sup>x</sup> à la surface de ces cellules. L'antigène sialyl-Lewis<sup>x</sup> étant un antigène périphérique, son expression requiert la synthèse préalable des cores 1 puis 2 et/ou 3 puis 4 (Figure 8). Or, le défaut de ces structures, conduit conséquemment au défaut d'expression des structures périphériques. C'est pourquoi il a été suggéré que ST6GalNAc I entre directement en compétition avec les core-synthétases pour l'utilisation de la structure GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr comme substrat accepteur.

## Sialyl-Tn antigen in Cancer : from Diagnosis to Therapy

Sylvain Julien and Philippe Delannoy.

*Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS n°8576, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

RUNNING TITLE : Sialyl-Tn in cancer.

### ABSTRACT

Sialyl-Tn antigen (STn) is a short *O*-glycan containing a sialic acid residue  $\alpha$ 2,6-linked to GalNAc $\alpha$ -*O*-Ser/Thr. This disaccharide is thought to be biosynthesised by a specific CMP-Neu5Ac: GalNAc  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase termed ST6GalNAc I. ST6GalNAc I compete with *O*-glycans elongating glycosyltransferases and prevent cancer cells to exhibit longer *O*-glycans. Several monoclonal antibodies have been raised to detect STn in tissues. While foetal and normal adult tissues weakly express STn, the antigen is over-expressed in a wide range of epithelial cancers and is considered as a good maker of tumour. However, its pattern of expression varies according to the cells morphology and differentiation, which depend on the cancer type. STn seems to be related to invasive behaviour and metastatic potential of the cancer cells, while the involved mechanisms remain unclear. The prognostic value of STn expression has been widely studied, especially in gastric, colorectal, ovarian and breast cancers. For all the cases, the antigen detection is correlated to a decreased survival of the patients. Because of this pan-carcinoma expression associated with an adverse outcome, an anti-cancer vaccine has been designed towards the STn epitope. One thousand of patients with metastatic breast cancers were enrolled in a phase III clinical trial, which has been achieved in mid 2003. The moderated results of this trial enlighten the present limits of the anti-cancer immunotherapy approaches.

### INTRODUCTION

The modification of cellular glycosylation is a common phenotypic change observed in ma-

lignancy and the over-expression of antigenic sialylated structures at the surface of cancer cells have been widely reported [1,2]. For example, sialyl Lewis<sup>a</sup> and sialyl Lewis<sup>x</sup> were abnormally found on glycoproteins and glycolipids in lung, colon, stomach and breast cancers [3]. This aberrant sialylation has been already reported to change the behaviour of the cells. For example, sialyl Lewis<sup>x</sup> serve as a ligand for selectins improving adhesion of human breast cancer cells to vascular endothelium, enhancing the metastatic capacities of cancer cells [4]. Sialylated glycans are also specifically recognised by Siglecs (Sialic acid-binding Ig-like lectins) [5], these kinds of interactions may also contribute to cancer development by modulating cell-cell interactions. The sialyl-Tn (STn) antigen is a short *O*-glycan structure, which is also aberrantly expressed in several cancer types and related to the disease aggressiveness. To date, very little is known about the origin of STn emergence in cancer cells, the biological function of this structure or the mechanisms by which this antigen could reinforce the cancer aggressiveness. STn antigen is considered as a good tumour marker for most of the epithelial cancers and it has been used for the elaboration of a cancer vaccine.

### 1. STn antigen structure and biosynthesis

The Thomsen-Freidenreich related antigens, including sialyl-Tn (Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ -*O*-Ser/Thr), constitute a group of important carbohydrate epitopes found on *O*-glycosylproteins. The Tn hapten corresponds to the first GalNAc residue  $\alpha$ -linked to a serine or a threonine of the peptide backbone that initiates

### 3.2.3 Sialyl-Tn et cancers du sein : confirmations et incertitudes

Les études cliniques portant sur l'antigène STn dans le sein et dans le cancer du sein se sont focalisées sur son expression tissulaire. Les résultats sont souvent assez contradictoires d'une étude à l'autre, mais l'utilisation d'anticorps monoclonaux différents, dont on connaît les variations de spécificité, sont sans doute l'un des facteurs de cette hétérogénéité.

Pour certains auteurs, l'antigène STn n'est pas exprimé par les cellules épithéliales mammaires saines [170,176]. Pour d'autres, l'antigène STn est légèrement exprimé au niveaux de granules cytoplasmiques ou à la surface membranaire apicale des cellules saines [177-180]. Les cellules d'hyperplasies surexpriment l'antigène STn dans 30 à 96% des cas [179,181], de même que les cellules de cancer du sein dans 22 à 84% des cas [170,176,178,180,182-186]. Toutefois, la proportion de cellules marquées dans une tumeur peut être extrêmement variable. Les cancers d'origine canalaire semblent plus fréquemment concernés par cette expression anormale (45% des cas contre 20% pour les cancers lobulaires) [187]. De plus, les CIC de type comédo sont plus souvent STn positifs que les autres (massif, cribriforme, papillaire voir 1.2.3 pp 24-25). [178,180]. Enfin, Schmitt *et al.* ont observé une diminution de l'expression de l'antigène STn dans les cancers infiltrants, par rapport aux cancers *in situ* [180], et Reed *et al.* ont constaté que les métastases distantes étaient moins fréquemment marquées que les tumeurs primaires [179].

La valeur pronostique de l'antigène sialyl-Tn dans le cancer du sein est très controversée. Dans la majorité des études il n'y a pas de corrélation entre son expression et l'âge des patientes, le statut ménopausique, la taille de la tumeur, le grade histologique ou le stade cancéreux [176,178,180,184,187-189]. L'association significative avec l'apparition de métastases ganglionnaires est vérifiée par certains auteurs [180,189], mais infirmée par d'autres [184,187,188]. Cependant, les auteurs rapportent une association avec une diminution du temps de survie moyen des patientes [188], parfois restreinte au groupe de patientes

présentant des métastases ganglionnaires [184], ou des cancers d'origine lobulaire [187]. Enfin, Miles *et al.* on constaté que le traitement chimiothérapique adjuvant (cyclophosphamide, methotrexate, fluoro-uracile voir 1.2.4 pp 30-31) bénéfique aux patientes STn négatives, reste sans effet sur les patientes STn positives.

Pour finir, l'expression de l'antigène STn semble corrélée à deux autres marqueurs cancéreux : l'oncogène erb-B2 (voir 1.2.4 p 32) [189], et la cyclo-oxygénase 2, un médiateur de transduction de signaux, lui même associé à l'angiogenèse et l'invasion des ganglions lymphatiques [190].

L'ensemble de ces observations témoigne de l'association entre l'expression de l'antigène STn et l'agressivité tumorale, bien que l'antigène ne soit que rarement associé aux marqueurs d'agressivité usuels. Pour certains auteurs, cela en fait un marqueur de mauvais pronostic indépendant, une hypothèse qui peut être appuyée par les études réalisées dans les autres cancers. La rareté de l'expression de l'antigène STn dans les tissus sains et les fréquences combinées de son expression dans les cancers du sein, et des cancers du sein dans la population ont motivé la mise au point et les essais cliniques d'un vaccin anticancéreux dirigé contre cet antigène.

#### 3.2.4 Application thérapeutique : les résultats mitigés du Thératope®

Le Thératope® est un vaccin anticancéreux dont l'immunogène est une molécule combinée comprenant une protéine porteuse KLH (Keyhole Limet Hemocyanine) sur laquelle sont greffées environ 3000 molécules Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr. De nombreux tests préliminaires (essais cliniques de phase 0, I et II) ont montré que l'injection de cette molécule peut induire des réponses immunitaires humorales et cellulaires dirigées contre le STn, et qu'un titre d'anticorps élevé augmente le temps de survie moyen des patientes. Ces résultats encourageant ont motivé l'organisation en d'un essai clinique de phase III sur une cohorte de

1030 patientes présentant un cancer du sein métastatique, réparties sur 120 sites dans dix pays. Ces patientes ont été vaccinées par le Thératope®, après un traitement de chimiothérapie de première ligne, suivi ou non d'une hormonothérapie. Malheureusement, les résultats annoncés en juin 2003 montrent que la vaccination n'a pas suffisamment d'effet sur la progression tumorale ni sur l'augmentation du temps de survie des patientes. Toutefois, un sous-groupe de patientes placées sous hormonothérapie semble montrer une tendance favorable à l'augmentation du temps de survie. Les raisons de cette efficacité restreinte sont encore à l'étude.

Il est difficile de savoir exactement à quoi sont dues les limites de l'efficacité du Thératope®, mais plusieurs facteurs ont pu exercer leur influence :

- le stade avancé des cancers ne correspondant pas nécessairement à l'épisode pathologique durant lequel l'expression de l'antigène STn est la plus délétère ;
- la faible proportion de cellules STn positives dans les tumeurs ;
- la toxicité de la chimio-thérapie sur les cellules du système immunitaire ;
- la régulation négative de la réponse immunitaire dirigée contre un antigène parfois exprimé sur les cellules immunitaires elles mêmes (lymphocytes B, lymphocytes T CD4 + [191]) ;
- la variabilité inter-patientes de l'immunogénicité de la structure glycanique simple.

L'utilité de traitements ciblés, tels que le Thératope®, pour soigner les cancers demeure une évidence, et le développement de stratégies d'immunothérapies actives répond certainement aux besoins actuels. Les résultats mitigés obtenus lors de ce premier grand essai clinique d'un vaccin anti-cancéreux montre que l'application de cette stratégie nécessite de nouvelles mises au point. Une meilleure connaissance du rôle de l'antigène STn dans le développement

tumoral, ainsi que du contexte protéique de son expression dans les cellules de cancer du sein pourraient apporter les connaissances nécessaires à l'amélioration des traitements le ciblant.

### 3.2.5 Modèles cellulaires d'étude : faible représentation des lignées sialyl-Tn positives

Curieusement, malgré la fréquence d'observation de l'antigène STn dans les cancers, il existe relativement peu de lignées cellulaires cancéreuses qui l'expriment en culture. Il se peut que l'expression de cette structure soit incompatible avec les conditions de culture et que les lignées établies l'aient été à partir de cellules initialement STn négatives. Les conditions de culture pourraient également moduler l'expression de l'antigène. Friedman *et al.* ont ainsi observé que des cellules cancéreuses de colon s'extrayant d'explants tumoraux STn positifs perdaient l'expression de l'antigène [192]. Par ailleurs, Horan Hand *et al.* ont constaté que la lignée cancéreuse colique LS-174T surexprime le STn lorsqu'elle est cultivée en suspension, dans des systèmes de culture en trois dimensions (gels), ou injectée dans des souris athymiques [193]. Cette augmentation d'expression en contexte tri-dimensionnel a également été observée pour la lignée cancéreuse de vessie MGH-U3 [194].

Quoi qu'il en soit, les modèles cellulaires humains STn positif demeurent rares, les mieux décrits étant : LS-174T [193,195,196], LS-180 [197], Caco-2 [198-200], et HT-29 [199,200] pour le cancer du colon ; Panc-1 et S2-103 [199] pour le cancer du pancreas ; et Kato III [198] pour le cancer de l'estomac. En ce qui concerne les lignées cancéreuses de sein, Horan Hand *et al.* rapportent n'avoir détecté l'antigène STn que dans une lignée (un variant MCF-7) sur vingt cinq testées. Ohuchi *et al.* décrivent par ailleurs la lignée HMA-1, STn positive [201], qu'ils ont eux mêmes établie [202], mais qui n'a été que peu étudiée à ce jour. Enfin, les lignées de cancer du sein les plus couramment utilisées n'expriment ni l'antigène sialyl-Tn (MDA-MB-231, T47-D, MCF-7, ZR-75-1) [126,129] ni l'activité sialyltransférase  $\alpha$ 2-6 spécifique nécessaire à sa biosynthèse (BT-20, T47-D, MCF-7) [125].

Bien que l'antigène sialyl-Tn soit la structure *O*-glycannique sialylée la plus simple possible, les mécanismes qui régulent sa biosynthèse sont assez mal connus. Son apparition sur les cellules cancéreuses est associée à un mauvais pronostic pour les patientes, mais les mécanismes directs ou indirects par lesquels l'antigène permet le renforcement de l'agressivité tumorale ne sont pas déterminés. Pour enrichir les connaissances sur l'impact de l'antigène STn sur le développement des cancers du sein, et contribuer à l'amélioration d'approches thérapeutiques le ciblant, il apparaît donc nécessaire de générer de nouveaux modèles appropriés. La modification de lignées existantes dans le but d'obtenir l'expression de cet antigène est l'une des alternatives les plus attrayantes dans la mesure où elle permet d'obtenir à la fois le modèle voulu et son contrôle, déjà riche d'une expérimentation approfondie disponible dans la littérature scientifique.



# Résultats

L'expression de l'antigène STn est un facteur de mauvais pronostic pour les patientes atteintes d'un cancer du sein. Pour mieux comprendre l'impact de cette expression sur l'agressivité tumorale, nous avons décidé d'étudier les caractéristiques biologiques de cellules de cancer du sein en culture exprimant l'antigène sialyl-Tn. Or, il s'avère qu'aucune des lignées cellulaires de cancer du sein communément étudiées n'expriment l'antigène STn [142-144], ni l'activité enzymatique nécessaire à sa synthèse [125]. Pour réaliser notre étude biologique, nous avons donc besoin de créer un ou des modèles cellulaires STn positifs.

Le premier chapitre de cette partie "résultats" est présenté sous la forme d'un article publié dans la revue *Glycoconjugate Journal* en 2001. Nous démontrons dans cet article que l'expression de ST6GalNAc I dans des lignées cancéreuses de sein est suffisante pour induire l'expression de l'antigène STn. De plus nous décrivons la sélection de clones MDA-MB-231 qui expriment de façon stable l'enzyme et son produit.

Le deuxième chapitre décrit la sélection et la caractérisation biologique de clones STn positifs obtenus à partir de la lignée T47-D. Une première section de ce chapitre reprend un article accepté pour publication dans le journal *Breast Cancer Research and Treatment* (2004). Une deuxième section présente des résultats non publiés qui complètent l'étude de la O-glycosylation de ces clones.

Une étude plus approfondie des caractères glycobiochimiques et cellulaires de clones MDA-MB-231 STn positifs est proposée dans le chapitre 3. Ces résultats sont présentés sous forme d'un article de recherche récemment soumis au journal *Cancer Research*.

Enfin, le dernier chapitre comprend quelques résultats préliminaires concernant l'identification des glycoprotéines porteuses de l'antigène STn.

L'ensemble est donc rédigé en anglais. La numérotation des figures et des références bibliographiques internes aux articles a été laissée telle quelle, en revanche dans les parties complémentaires la numérotation fait suite à celle des généralités.

## **1 : Expression of Sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc $\alpha$ 2,6-Sialyltransferase (ST6GalNAc I) cDNA.**

Nous démontrons dans l'article qui suit que la sialyltransférase ST6GalNAc I, suspectée d'être responsable de la biosynthèse de l'antigène STn, n'est pas exprimée dans les principales lignées cancéreuses de sein utilisées en laboratoire (MDA-MB-231, BT-20, MCF-7, T47-D). Afin de déterminer si cette expression peut être induite dans ces cellules, nous avons construit un vecteur d'expression contenant l'ADN complémentaire complet de ST6GalNAc I que nous avons utilisé pour réaliser des transfections transitoires. L'antigène STn a été détecté à la surface des cellules transfectées par ce vecteur (MDA-MB-231, MCF-7 et T47-D). Nous avons donc entrepris la sélection de clones STn positifs stables, à partir de la lignée MDA-MB-231. Ceux-ci, nous ont permis d'étudier de façon préliminaire les phénomènes de compétitions enzymatiques responsables de l'apparition de l'antigène STn, ainsi que la croissance et la migration des cellules.



# Expression of Sialyl-Tn antigen in breast cancer cells transfected with the human CMP-Neu5Ac: GalNAc $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I) cDNA

Sylvain Julien<sup>1</sup>, Marie-Ange Krzewinski-Recchi<sup>1</sup>, Anne Harduin-Lepers<sup>1</sup>, Valérie Gouyer<sup>2</sup>, Guillemette Huet<sup>2</sup>, Xuefen Le Bourhis<sup>3</sup> and Philippe Delannoy<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS n° 8576, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France, <sup>2</sup>Unité INSERM 560, Place de Verdun, 59045 Lille cedex, France, <sup>3</sup>Laboratoire de Biologie du Développement, UPRES EA 1033, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

Sialyl-Tn antigen (STn) is a cancer associated carbohydrate antigen over-expressed in several cancers including breast cancer, and currently associated with more aggressive diseases and poor prognosis. However, the commonly used breast cancer cell lines (MDA-MB-231, T47-D and MCF7) do not express STn antigen. The key step in the biosynthesis of STn is the transfer of a sialic acid residue in  $\alpha$ 2,6-linkage to GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr. This reaction is mainly catalyzed by a CMP-Neu5Ac GalNAc  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase: ST6GalNAc I. In order to generate STn-positive breast cancer cells, we have cloned a cDNA encoding the full-length human ST6GalNAc I from HT-29-MTX cells. The stable transfection of MDA-MB-231 with an expression vector encoding ST6GalNAc I induces the expression of STn antigen at the cell surface. The expression of STn short cuts the initial O-glycosylation pattern of these cell lines, by competing with the Core-1  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase, the first enzyme involved in the elongation of O-glycan chains. Moreover, we show that STn expression is associated with morphological changes, decreased growth and increased migration of MDA-MB-231 cells.

**Keywords:** breast cancer, Sialyl-Tn, ST6GalNAc I, O-glycosylation

**Abbreviations:** T antigen, Thomsen-Friedenreich antigen; Tn antigen, Thomsen-nouveau antigen; Neu5Ac, 5 N-Acetylneuraminic acid; ST6GalNAc I, CMP-Neu5Ac: R-GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (EC 2.4.99.3); ST6GalNAc II, CMP-Neu5Ac: (Neu5Ac $\alpha$ 2-3)Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (EC 2.4.99.-); Core1 $\beta$ 3GalT, UDP-Gal: GalNAc  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase (EC 2.4.1.122); GAPDH, Glyceraldehyde phosphate deshydrogenase; PNA, *Arachis hypogaea* agglutinin.

## Introduction

The modification of cellular glycosylation is a common phenotypic change observed in malignancy and the over-expression of antigenic sialylated structures at the surface of cancer cells have been widely reported [1,2].

Relevant to cancer is the abnormal expression of structures related to the Thomsen-Friedenreich antigens family such as Tn antigen (GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr) and STn (STn) antigen

(Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr). STn antigen is usually carried by membrane-bounded mucins such as MUC1 [3] but has been also characterized on a CD44 splicing variant [4]. The premature sialylation of core carbohydrate structures stops further elongation of the oligosaccharide chains, leading to the appearance of short truncated and sialylated O-glycans. STn expression has been observed in normal secretory tissues such as salivary glands, gastric, intestinal and uterine mucosae, but STn is absent from most of other tissues such as normal colon, pancreas or breast tissues [5].

Over-expression of STn has been reported for cancers of pancreas, stomach and ovary with varying frequencies [6]. This expression is a strong, independent indicator of poor prognosis [7], and was associated with other poor prognosis markers such as high histologic grades, survival decrease and lymphoid

\*To whom correspondence should be addressed: Philippe Delannoy, Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS n°8576, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel.: +33 3 20 43 69 23; Fax: +33 3 20 43 65 55; E-mail: Philippe.Delannoy@univ-lille1.fr

## **2 : Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration**

Ce second chapitre traite d'un deuxième modèle cellulaire obtenu par la transfection stable de cellules de la lignée T47-D, en utilisant le même vecteur d'expression que pour la lignée MDA-MB-231. La première section, présentée sous forme d'un article, récemment accepté dans *Breast Cancer Research and Treatment*, décrit la réalisation d'une étude du comportement des cellules T47-D STn positives en culture. Nous montrons que ces cellules présentent une diminution de l'adhérence cellulaire ainsi qu'une augmentation de leur mobilité. Dans une seconde section, reprenant des résultats non publiés, nous confirmons les phénomènes de compétitions enzymatiques entre ST6GalNAc I et la galactosyltransférase Core1 $\beta$ GalT, démontrant que ceux-ci sont indépendants du modèle d'étude.

## **Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration**

**Sylvain Julien<sup>1</sup>, Chann Lagadec<sup>2</sup>, Marie-Ange Krzewinski-Recchi<sup>1</sup>, Gilles Courtand<sup>3</sup>, Xuefen Le Bourhis<sup>2</sup> and Philippe Delannoy<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS n°8576, GDR CNRS n°2590, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

<sup>2</sup> *Laboratoire de Biologie du Développement, INSERM ESPRI, UPRES EA 1033, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

<sup>3</sup> *Centre Commun de Mesures Imagerie Cellulaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

Correspondence Address:

Philippe Delannoy : Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS n°8576, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.

Tel +33 3 20 43 69 23

Fax +33 3 20 43 65 55

e-mail: [Philippe.Delannoy@univ-lille1.fr](mailto:Philippe.Delannoy@univ-lille1.fr)

### **3 : Sialyl-Tn expression in MDA-MB-231 breast cancer cells promotes tumor development in SCID mice**

L'article proposé en tant que troisième chapitre constitue une étude approfondie des clones MDA-MB-231 STn positifs. On y trouvera la caractérisation des *O*-glycannes portées par les séquences répétées en tandem de MUC 1. Celle-ci permet de mieux appréhender les profondes modifications de la *O*-glycosylation induites par l'expression de ST6GalNAc I dans ces cellules. D'autre part, l'étude des caractères biologiques des cellules en culture est accompagnée d'un test de croissance tumorale effectué dans un modèle animal (souris SCID). Les résultats obtenus suggèrent l'importance de l'expression de l'antigène sialyl-Tn sur les interactions des cellules cancéreuses avec les cellules de l'organisme hôte.

## **Sialyl-Tn expression in MDA-MB-231 breast cancer cells promotes tumor development in SCID mice<sup>1</sup>**

**Sylvain Julien<sup>\*</sup>, Eric Adriaenssens<sup>†</sup>, Kirsten Ottenberg<sup>‡</sup>, Alessandro Furlan<sup>†</sup>, Gilles Courtand<sup>§</sup>, Anne-Sophie Vercouter Edouart<sup>\*</sup>, Franz-Georg Hanisch<sup>‡</sup>, Philippe Delannoy<sup>\*2</sup> and Xuefen Le Bourhis<sup>†</sup>.**

*<sup>\*</sup> Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS n°8576, GDR CNRS n°2590, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

*<sup>†</sup> Laboratoire de Biologie du Développement, ESPRI INSERM, UPRES EA 1033, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

*<sup>‡</sup> Center for Biochemistry, Medical Faculty, University of Cologne, Joseph-Stelzmann-Str. 52, D-50931 Cologne*

*<sup>§</sup> Centre Commun de Mesures Imagerie Cellulaire, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

**Running title:** Impact of the STn expression on MDA-MB-231 cells.

**Key words:** Breast cancer, sialyl-Tn, ST6GalNAc I, *O*-glycosylation, tumor growth.

---

<sup>1</sup> Supported by the University of Sciences and Technologies of Lille, and the Association pour la Recherche sur le Cancer (Grant n° 5469). Sylvain Julien has a fellowship of the Génopole de Lille.

<sup>2</sup> to whom correspondence should be addressed, at Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle, UMR CNRS n°8576, Laboratoire de Chimie Biologique, Université des Sciences et Technologies de Lille, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France. Tel +33 3 20 43 69 23; Fax +33 3 20 43 65 55; E-mail: Philippe.Delannoy@univ-lille1.fr



## **4 Identification of STn positive glycoproteins.**

Pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels l'antigène STn modifie les caractères cellulaires des lignées, il apparaît nécessaire de connaître les glycoprotéines affectées par les modifications de *O*-glycosylation. Ce dernier chapitre est donc consacré aux résultats préliminaires concernant l'identification des protéines qui portent l'antigène sialyl-Tn dans les deux modèles que nous avons étudiés.

**Discussion**

**et**

**perspectives**

### *La création des modèles cellulaires*

L'expression de l'antigène STn est considérée comme un facteur de mauvais pronostic dans plusieurs cancers épithéliaux. Les patientes atteintes de cancer du sein, dont les tumeurs sont STn positives, ont une espérance de vie statistiquement plus courte que les autres patientes. Il paraît donc important d'étudier les mécanismes par lesquels l'antigène STn renforce l'agressivité tumorale, ceci afin d'adapter les traitements de ces patientes ou d'en créer de nouveaux, permettant de cibler les cellules STn positives.

L'étude de l'agressivité tumorale passe par l'utilisation de modèles cellulaires appropriés. Or, à ce jour, une seule lignée cancéreuse de sein est connue comme étant STn positive. Il s'agit de la lignée HMA-1, établie par *Ohuchi et al.* [202], mais qui semble n'avoir jamais été étudiée de façon approfondie. Aucune des lignées de cancer du sein les plus étudiées en laboratoire (MDA-MB-231, BT-20, T47-D, MCF-7 ou ZR-75-1) n'exprime l'antigène STn. Cette absence d'expression est intrigante lorsque l'on sait que 40 % des cancers du sein diagnostiqués sont STn positifs. On peut cependant émettre plusieurs hypothèses pour tenter de l'expliquer. D'abord, il n'est pas du tout acquis que ces cellules dérivent de tumeurs STn positives. De plus, les lignées cellulaires en culture sont connues pour posséder des caryotypes hautement anormaux comprenant de nombreuses délétions chromosomiques ; il n'est pas impossible que le gène de ST6GalNAc I soit inactivé dans ces cellules. Enfin, les conditions de cultures ne sont peut-être pas appropriées pour permettre l'expression l'antigène STn comme il l'a été suggéré pour des cellules de cancer du côlon [195].

Quoi qu'il en soit, pour pallier à l'absence de modèle, nous avons décidé d'en générer en induisant l'expression de l'antigène STn dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein. La sialyltransférase ST6GalNAc I est considérée comme l'enzyme responsable de la biosynthèse de l'antigène STn. Comme nous l'avons montré, cette enzyme n'est pas exprimée

par les lignées cancéreuses de sein. L'ADN complémentaire complet de ST6GalNAc I a été cloné dans notre laboratoire, puis inséré dans un vecteur d'expression eucaryote. Nous nous sommes servi de ce vecteur pour réaliser des transfections transitoires dans les lignées MDA-MB-231, T47-D et MCF-7. Ces lignées ont été choisies pour plusieurs raisons. D'abord, bien qu'étant toutes issues d'effusion pleurale, certaines différences biologiques (expression des récepteurs aux oestrogènes, expression de la E-Cadhérine, tumorigénicité) en font des modèles cellulaires pour des cancers plus ou moins agressifs. Ensuite, le profil de *O*-glycosylation de ces lignées s'avère être très différent [129], constituant autant de contextes variables dans lesquels vérifier la possibilité d'expression de l'antigène STn. Enfin, l'expression des *O*-glycannes nécessite la présence de protéines acceptrices, dont nous ignorions *a priori* si elles étaient exprimées dans nos lignées. Multiplier les modèles transfectés augmentaient ainsi nos chances d'obtention d'au moins un modèle approprié pour notre expérimentation.

L'antigène STn a été détecté par immunocyto-fluorescence, sur la surface membranaire des cellules des trois lignées transfectées. Nous avons donc conclu que **l'ARN messager de l'enzyme était correctement produit, puis transcrit en une protéine dont la conformation et la localisation intracellulaire étaient compatibles avec son activité**, qui elle-même conduit à l'expression de l'antigène STn.

Nous avons alors entrepris de sélectionner des cultures exprimant de façon stable l'antigène STn. Après sélection des cellules transfectées, par la Généticine (G418), nous avons obtenu des cultures mixtes STn<sup>+</sup>/STn<sup>-</sup> dont le ratio variait selon la lignée considérée. Il semble qu'au cours du temps de culture, les cellules STn positives étaient défavorisées par rapport aux cellules STn négatives. Ceci s'est particulièrement observé pour la lignée MCF-7 pour laquelle la proportion de cellules STn positives est restée faible (moins de 30%). C'est peut-être la raison pour laquelle nous n'avons pas réussi à maintenir les cellules MCF-7 STn

positives en culture. Pour les deux autres lignées, nous avons isolé des clones STn positifs, à partir des lignées MDA-MB-231 et T47-D, en appliquant la stratégie des dilutions limites aux cultures. Cette méthode nous a permis d'obtenir plusieurs clones STn positifs, exprimant constitutivement l'antigène à des degrés variables.

L'intérêt de ces modèles est qu'ils peuvent être comparés à la lignée d'origine, transfectée par le vecteur d'expression vide, qui ne diffère donc que par l'absence de l'expression de ST6GalNAc I.

Cependant, on se doit d'évoquer le fait que la sélection des clones sur la base de leur résistance à la G418 et de leur expression d'antigène STn a également pu profiter à la sélection d'autres caractères de façon indépendante. Cela a d'ailleurs été le cas parmi les clones T47-D puisque nous avons constaté qu'un clone exprime l'enzyme Core1 $\beta$ GalT à un niveau plus élevé que les autres (voir résultats chapitre 2 p 117) ou qu'un autre exprime la E-Cadherine à un niveau moins élevé (données non publiées).

Néanmoins, ces modèles sont à l'heure actuelle les seules lignées cellulaires cancéreuses de sein bien caractérisées et exprimant l'antigène STn. Nous les avons utilisés, comparativement aux lignées d'origine, pour étudier les conséquences de l'expression de ST6GalNAc I sur la O-glycosylation des cellules, pour rechercher les protéines porteuses de cet antigène et pour définir l'incidence de l'expression de l'antigène sur le comportement des cellules en culture et dans un modèle animal (souris SCID).

#### *Le comportement des cellules STn positives en culture*

De façon générale, nous avons observé que les cellules STn positives étaient plus difficiles à cultiver que les cellules STn négatives. Nous avons notamment dû augmenter les concentrations de sérum de veau dans les milieux de culture (10% au lieu de 5%) pour

maintenir les cellules dans un état physiologique correct. La fragilité accrue de ces cellules se reflète peut-être dans les diminutions de croissance observées en culture en trois dimensions (agar mou, gel de collagène).

Parallèlement, nous avons mesuré une perte d'adhérence sur différents composants de la matrice extracellulaire. Le protocole que nous avons mis au point pour étudier l'adhérence des cellules permet principalement d'évaluer la force d'adhérence des cellules. En effet, la cinétique d'adhésion des cellules semble n'être que peu modifiée comme l'ont montré des enregistrements vidéos de cultures (données non montrées). Ceci montre que les cellules adhèrent au substrat dans un premier temps, mais que seules les plus adhérentes subsistent après les rinçages effectués préalablement à la mesure. Il est à noter que cette diminution de force d'adhérence peut également être impliquée dans la diminution de la croissance des cellules en culture.

La mobilité des cellules est également augmentée lorsque l'antigène STn est exprimé. Pour les cellules MDA-MB-231, les analyses vidéos montrent qu'il s'agit d'une augmentation des capacités de migration active. En revanche, pour les cellules T47-D, il semble que l'accroissement de la mobilité soit principalement dû à un défaut d'adhérence au support, les cellules "roulant" sur la matrice en essayant d'y adhérer. De plus, ces mouvements perturbent les interactions cellule-cellule, sans doute de façon indirecte, puisque les tests d'agrégation (voir résultats chapitre 2 p 106) ne montrent pas d'incidence directe de l'expression de l'antigène STn sur ce paramètre. Les deux lignées ont également un comportement invasif différent. En gel de collagène, les cellules MDA-MB-231 se déplacent individuellement à l'intérieur du gel, alors que les cellules T47-D forment des agrégats émettant des protubérances cellulaires dans le gel (observations non montrées). La présence du STn ne semble pas affecter de façon significative ces comportements.

Que ce soit par l'augmentation de capacités migratoires ou par conséquence de la diminution de l'adhérence, l'expression de l'antigène STn pourrait être impliqué dans les **phénomènes de dissémination des cellules cancéreuses à partir de la tumeur primaire**, ceci indépendamment des caractéristiques biologiques initiales des cellules.

*Quel est le rôle des protéines porteuses de l'antigène STn dans ces phénomènes?*

Compte tenu de la diversité des protéines *O*-glycosylées modifiées par l'expression de ST6GalNAc I, il apparaît difficile de proposer des mécanismes moléculaires précis pouvant expliquer les changements de phénotype observés. On sait que la *O*-glycosylation participe aux propriétés anti-adhésives des protéines de type mucinique. L'augmentation de la densité des charges négatives, ainsi que leur rapprochement de l'axe protéique (raccourcissement des *O*-glycannes), pourraient renforcer la rigidité des mucines membranaires, augmentant ainsi leur effet anti-adhésif. **Il s'agirait d'un phénomène global s'exerçant à travers les différentes mucines membranaires** (MUC1 et potentiellement MUC4 ou MUC16).

En revanche on ne sait rien de l'impact des modifications de la glycosylation des mucines sur les fonctions de transduction de signaux récemment mises en évidence pour MUC1 et MUC4 notamment. Ceci pourrait d'ailleurs constituer un nouvel axe de recherche concernant l'implication de la *O*-glycosylation dans le développement du cancer.

Les modifications de *O*-glycosylation peuvent également affecter d'autres protéines membranaires qui possèdent des domaines de type mucine. Par exemple, CD44 est une protéine impliquée dans des mécanismes complexes (adhésion, migration, digestion de la matrice extracellulaire, signalisation intracellulaire) et qui porte l'antigène STn dans les cellules MDA-MB-231. On peut se demander si les propriétés spécifiques de cette protéine sont modulées par les changements de sa *O*-glycosylation, et si oui comment?

Enfin, plusieurs *O*-glycoprotéines capables de porter l'antigène sialyl-Tn restent encore non identifiées. Leur identification apporterait de nouveaux éléments, ou conforterait les hypothèses actuelles concernant les mécanismes par lesquels l'antigène STn modifie les propriétés biologiques des cellules de cancer du sein.

*Nature des modifications de la O-glycosylation : qu'est ce que l'antigène STn?*

Une autre façon d'aborder l'étude de l'impact de l'antigène STn sur les propriétés des protéines porteuses est de s'interroger quant à la nature précise des modifications de la *O*-glycosylation. Quel est l'impact de l'expression de ST6GalNAc I sur le profil d'expression des *O*-glycannes sur une protéine donnée en terme de proportion des différents types de *O*-glycannes (core1, core2) ou de leur localisation sur l'axe peptidique? Cet impact est-il le même d'une protéine à l'autre? Y a-t-il des glycoprotéines plus affectées que d'autres? En d'autres termes, existe-t-il une spécificité des structures acceptrices reconnues par ST6GalNAc I? Si oui, comment doit-on alors définir l'antigène STn?

L'appellation "sialyl-Tn" désigne une structure antigénique dont la reconnaissance est due à la présence d'au moins un *O*-glycane de structure Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr, alors désigné parfois abusivement comme "sialyl-Tn" à part entière. Si la présence de l'acide sialique est essentielle à la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps, il ne faut pas oublier que le *O*-glycane seul n'est pas suffisant pour être immunogène. Il est d'ailleurs systématiquement conjugué à des molécules porteuses dans tous les tests d'immunisation. Il conviendrait de parler d'antigénicité de type STn, puisqu'en réalité de nombreux épitopes peuvent répondre à cette définition. En conséquence, **les anticorps anti-STn peuvent être de spécificité et de sensibilité très variables**, ce qui peut expliquer en partie les grandes divergences en terme de détection, observées dans les études cliniques (voir Figure 3 p 66).



Quels sont les différents paramètres qui définissent l'antigénicité de type STn ?

En premier lieu le **squelette peptidique** soutenant les glycanes est un élément déterminant. Il semble être absolument nécessaire à la reconnaissance de l'antigène par l'anticorps comme cela a été démontré pour l'anticorps B72.3 [203]. Toutefois, on ne sait pas si les acides aminés flanquant les résidus de sérine ou de thréonines substituées peuvent intervenir dans la définition de l'épitope (Figure 17). Nous avons démontré que l'antigène STn était détecté sur plusieurs glycoprotéines de la membrane cellulaire, dont MUC1 et CD44. Existe-t-il, dans ces protéines, des séquences peptidiques "consensus" sur lesquelles se retrouvent systématiquement l'antigène sialyl-Tn ? Répondre à ces questions nécessite dans un premier temps de compléter l'identification des protéines porteuses et, dans un second temps, d'étudier de façon très précise les structures glycopeptidiques reconnues par les anticorps anti-STn.

Un second paramètre, connu pour moduler la reconnaissance de l'antigène STn, est la présence en **groupe ou cluster du disaccharide sialylé**. Les séquences des régions répétées en tandem des mucines sont très riches en acides aminés hydroxylés (jusqu'à 50%) qui constituent autant de sites potentiels de *O*-glycosylation. La substitution effective de ses sites par des résidus de GalNAc est le produit des activités combinées des peptidyl-GalNAc-transférases présentes dans la cellule. On sait encore peu de chose sur les spécificités peptidiques de ces différentes enzymes et aucun site consensus commun n'a été mis en évidence [113]. Cependant, il a été montré que les acides aminés hydroxylés des mucines produites par les cellules cancéreuses de sein présentent un degré de substitution plus élevé que ceux observés dans les cellules saines [128,129], bien que les peptidyl-GalNAc-transférases impliquées n'aient pas été identifiées. Ceci favorise la formation de clusters de *O*-glycanes sur l'axe peptidique et est sans doute à l'origine des clusters de sialyl-Tn reconnus préférentiellement par certains anticorps (B72.3, CC49).

Enfin, tous les sites de *O*-glycosylation d'un glycopeptide ne sont pas nécessairement substitués par le disaccharide Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-*O*-R lorsque la cellule exprime ST6GalNAc I. C'est ce qui a été observé avec l'un de nos clone MDA-MB-231 STn positif, dans lequel cette structure représente environ 20% des *O*-glycannes présents sur MUC 1, ce qui correspond statistiquement à un site sur les cinq présents dans la séquence répétée en tandem. Si nous connaissons aujourd'hui la nature et les proportions des *O*-glycannes portés par cette mucine, nous ignorons s'ils sont répartis de façon homogène le long de l'axe protéique, ou même au sein de la séquence répétée en tandem. Si tel est le cas, on peut s'interroger d'une part sur la position précise de la structure responsable de l'antigénicité STn le long de la séquence peptidique, et d'autre part sur la nature des *O*-glycannes l'entourant. Compte tenu de la densité importante *O*-glycosylation des mucines, on peut légitimement penser que **la présence des *O*-glycannes voisins du disaccharide sialylé peut moduler la reconnaissance antigénique**. Par exemple, l'anticorps monoclonal SM3 reconnaît un épitope peptidique dans la région répétée en tandem de MUC1 ; cette reconnaissance est abolie lorsque la mucine porte des chaînes *O*-glycanniques longues (core2) alors qu'elle est permise lorsque les *O*-glycannes sont plus courts (core1) [204]. Ainsi, des glycannes étendus pourraient éventuellement empêcher la fixation d'un anticorps anti-STn et masquer l'antigène par leur encombrement stérique. A l'inverse, des glycannes courts pourraient faire partie intégrante de l'épitope reconnu par les anticorps anti-STn, comme c'est peut-être le cas pour l'antigène sialyl-6T avec l'anticorps CC49 [205]. Cette possibilité décuple les combinaisons de structures glycopeptidiques répondant à la définition de l'antigénicité de type STn.

Par conséquent, on comprend bien que le ciblage de l'antigène STn utilisé dans des essais de thérapies vaccinales est beaucoup plus complexe qu'il n'y paraît. L'utilisation du seul *O*-glycanne comme immunogène n'est pas suffisante, compte tenu de la grande diversité du

contexte de son expression (protéines porteuses, densité et nature de la *O*-glycosylation). **Une meilleure connaissance de ce contexte dans les cellules cancéreuses pourrait aider à définir des immunogènes plus complexes et plus spécifiques permettant d'améliorer l'efficacité de ce type de traitement.** Nos clones STn positifs, issus de deux lignées distinctes, pourraient être tout à fait exploitables pour ce type d'entreprise.

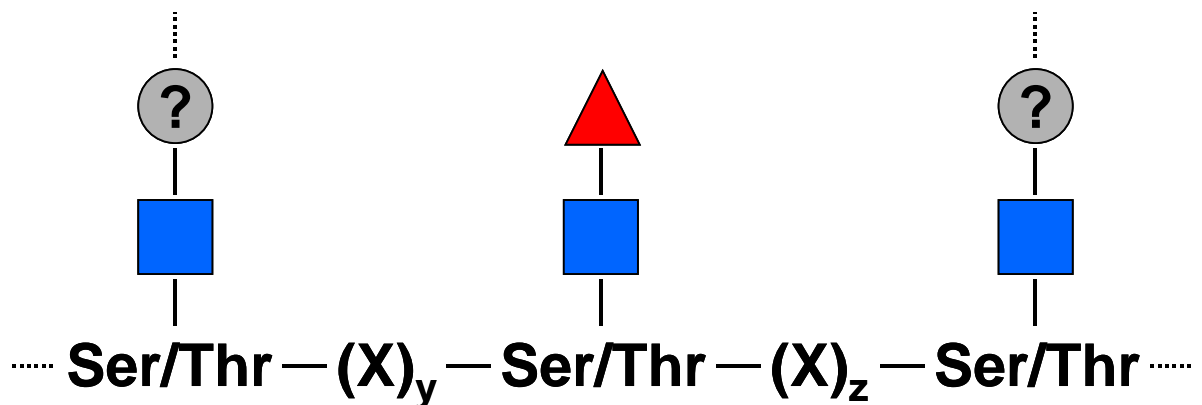


Figure 19 : Diagramme représentant la paramètres responsables de la variabilité de l'antigénicité de type sialyl-Tn. Ser : sérine. Thr : thréonine. X : acide aminé. Y et Z : nombre entier variable. Barre horizontale : liaison peptidique. Carré bleu : GalNAc. Triangle rouge : acide sialique. Rond gris : monosaccharide. Barre verticale : liaison glycosidique. Pointillés : extensions possibles.

Nous avons clairement démontré que l'expression de l'antigène STn dans les cellules se fait aux dépends de l'élongation des *O*-glycannes, par un phénomène de compétition enzymatique entre ST6GalNAc I et Core1 $\beta$ GalT, pour l'utilisation du même substrat accepteur. De plus, il apparaît que l'expression de ST6GalNAc I augmente également la proportion d'antigène sialyl-6T (Gal $\beta$ 1-3[Neu5Ac $\alpha$ 2-6]GalNAc $\alpha$ 1-*O*-Ser/Thr), qui peut aussi participer au défaut d'élongation des *O*-glycannes. La détection de l'antigène STn dans des cellules tumorales ne signifie donc pas seulement qu'un nouveau marqueur est apparu, mais aussi que la *O*-glycosylation a subi un remaniement profond. C'est la résultante de l'ensemble de ces modifications, sur l'ensemble des protéines affectées qui aboutit aux modifications de phénotypes observées dans nos modèles. On appréhende bien, par conséquent, toute la

difficulté de définir les mécanismes moléculaires précis par lesquels l'expression de l'antigène STn module le comportement des cellules en culture.

#### *Le comportement des cellules MDA-MB-231 STn positives dans un modèle animal*

Les différentes modifications des propriétés biologiques des cellules STn positives, bien que significatives, sont toutefois d'assez faible amplitude : croissance en trois dimensions diminuée de 50%, diminution de l'adhérence des cellules de 20%, ou augmentation de la mobilité cellulaire de 50 à 100%. Il semble donc que dans des conditions de culture relativement favorables (10% de sérum dans les milieux), les cellules ne soient qu'assez subtilement affectées par les modifications de leur *O*-glycosylation. **Toutefois, il n'est pas exclu que l'ensemble de ces modifications puisse avoir une influence plus marquée sur le développement de tumeurs dans un système complexe, tel que le modèle animal.**

Nous avons réalisé un test de tumorigénicité *in vivo*, en utilisant les cellules MDA-MB-231. De façon surprenante, nous avons observé que les **cellules STn positives ont tendance à former plus facilement des tumeurs qui par la suite croissent de façon plus rapide** que les tumeurs STn négatives. Cette observation semble aller à l'encontre des résultats obtenus par les mesure de croissance réalisées *in vitro*. On peut dès lors supposer que ce sont les interactions avec les tissus de l'organisme hôte (ici des souris SCID) qui vont apporter un ou plusieurs éléments favorisant la croissance des tumeurs STn positives. L'implication de l'antigène STn dans ces phénomènes pourrait être confirmée en mettant en évidence une corrélation entre le niveau d'expression de ST6GalNAc I et la taille des tumeurs.

Etant donné la diminution d'adhérence et l'augmentation de mobilité des cellules observées en culture, on peut s'interroger quant à l'incidence des modifications de la glycosylation sur la fréquence d'apparition de métastases. En effet, certains auteurs ont relevé une association

entre l'expression de l'antigène STn et la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques chez des patientes atteintes de cancer du sein (voir 3.2.3 p 75). Malheureusement, l'expérience que nous avons menée n'a pas permis de mettre en évidence la présence de métastases dans le foie ou les poumons des animaux. Néanmoins les conditions dans lesquelles nous avons travaillé n'étaient pas optimales pour pouvoir effectuer cette observation. Le sujet mériterait donc la conduite d'une nouvelle expérience au protocole adapté à l'étude de la dissémination des cellules et de l'apparition des métastases.

Comment les modifications de la *O*-glycosylation favorisent-elles la croissance des tumeurs *in vivo*? Aux modifications observées *in vitro*, peuvent s'ajouter des phénomènes liés plus spécifiquement à l'expression du disaccharide sialylé propre à l'antigène STn. En effet, plusieurs molécules sont connues pour se lier de façon spécifique à l'antigène STn, *via* une interaction de type lectinique. Il s'agit de l'interleukine 7 (IL-7) [206] et des siglecs 2, 3, 5 et 6 [207].

L'IL-7 est connu pour avoir un effet anti-apoptotique et pour stimuler la maturation et la croissance des lymphocytes T. Elle agit notamment par la voie de signalisation JAK1/JAK3-Stat 5. Les cellules de cancer du sein expriment le récepteur spécifiques de l'IL-7 [208]. Il a également été démontré que l'IL-7 stimule la croissance des lignées MDA-MB-231 et MCF-7 en culture [209]. On peut imaginer que pour ces cellules, la présence d'antigène STn sur les mucines membranaires puisse agir comme récepteur secondaire de l'IL-7, à l'image des glycosaminoglycanes (héparanes sulfate) pour le facteur de croissance des fibroblastes (FGF).

A l'instar des anticorps, les siglecs 2, 3, 5 et 6 (voir 3.1.4 p58) peuvent reconnaître l'antigène STn de façon plus ou moins spécifique en fonction de la densité des *O*-glycannes sur l'axe peptidique (clusters) [207]. Il est intéressant de noter que ces quatre siglecs possèdent toutes

des domaines cytoplasmiques susceptibles d'induire ou de réprimer des signaux intracellulaires [207]. Par conséquent, l'expression de l'antigène STn par les cellules de cancer du sein pourrait leur permettre de réguler les activités des cellules immunitaires exprimant ces siglecs, et d'influer ainsi sur le développement de la pathologie. On sait par exemple que la cytotoxicité de cellules Natural Killer (NK) peut être inhibée en présence de mucines portant l'antigène sialyl-Tn [210]. L'implication des siglecs pourrait être l'élément permettant d'expliquer cette observation.

**En conclusion**, la production de nouveaux modèles cellulaires de cancer du sein, ayant pour particularité d'exprimer l'antigène STn, a ouvert la voie à de nombreuses possibilités d'investigation.

D'une part ces modèles permettent de compléter l'étude de protéines porteuses de l'antigène et de définir ainsi de nouvelles cibles moléculaires, utilisables dans le cadre de thérapies vaccinales. Ce type de thérapie, basé sur un ciblage précis des cellules cancéreuses, est à mon sens l'un des éléments essentiels à l'évolution des traitements du cancer.

D'autre part, ils ont servi à mener l'étude des caractéristiques biologiques de cellules STn positives, nécessaire à une meilleure compréhension de l'influence de l'antigène sur le développement du cancer du sein. Les résultats obtenus suggèrent que les cellules STn positives ont plus de facilité à se disséminer dans l'organisme à partir de la tumeur primaire. Ces observations, sans être anodines, ne sont pourtant pas très spectaculaires. D'un autre côté, et de façon plus marquée, l'expérimentation *in vivo* montre que l'expression de l'antigène STn favorise l'implantation et la croissance des tumeurs.

Au terme de mes travaux de thèse, je suis convaincu que bien que modifiant de façon significative les propriétés intrinsèques des cellules de cancer du sein, l'impact majeur de l'antigène STn se porte probablement sur les interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules de l'organisme hôte. L'étude de ces interactions, en particulier avec les cellules immunitaires, constitue par conséquent un axe de recherche crucial qui devrait permettre d'approfondir la connaissance des mécanismes par lesquels l'antigène STn renforce l'agressivité des cancers du sein.

# Références bibliographiques



- [1] Espié M, Gorins A. Le sein : du normal au pathologique : état de l'art. Editions ESKA, Paris, (2001)
- [2] Silberstein GB, Van Horn K, Shyamala G, Daniel CW. Essential role of endogenous estrogen in directly stimulating mammary growth demonstrated by implants containing pure antiestrogens. *Endocrinology*. (1994) **134**:84-90.
- [3] Sapino A, Macri L, Gugliotta P, Pacchioni D, Liu YJ, Medina D, Bussolati G. Immunophenotypic properties and estrogen dependency of budding cell structures in the developing mouse mammary gland. *Differentiation*. (1993) **55**:13-8.
- [4] Humphreys RC, Lydon J, O'Malley BW, Rosen JM. Mammary gland development is mediated by both stromal and epithelial progesterone receptors. *Mol Endocrinol*. (1997) **11**:801-11.
- [5] Lange CA, Richer JK, Horwitz KB. Hypothesis: Progesterone primes breast cancer cells for cross-talk with proliferative or antiproliferative signals. *Mol Endocrinol*. (1999) **13**:829-36.
- [6] Brisken C, Kaur S, Chavarria TE, Binart N, Sutherland RL, Weinberg RA, Kelly PA, Ormandy CJ. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol*. (1999) **210**:96-106.
- [7] Humphreys RC, Hennighausen L. Signal transducer and activator of transcription 5a influences mammary epithelial cell survival and tumorigenesis. *Cell Growth Differ*. (1999) **10**:685-94.
- [8] Deugnier MA, Moiseyeva EP, Thiery JP, Glukhova M. Myoepithelial cell differentiation in the developing mammary gland: progressive acquisition of smooth muscle phenotype. *Dev Dyn*. (1995) **204**:107-17.
- [9] Ferguson JE, Schor AM, Howell A, Ferguson MW. Changes in the extracellular matrix of the normal human breast during the menstrual cycle. *Cell Tissue Res*. (1992) **268**:167-77.
- [10] Daniel CW, Berger JJ, Strickland P, Garcia R. Similar growth pattern of mouse mammary epithelium cultivated in collagen matrix in vivo and in vitro. *Dev Biol*. (1984) **104**:57-64.
- [11] Zangani D, Darcy KM, Shoemaker S, Ip MM. Adipocyte-epithelial interactions regulate the in vitro development of normal mammary epithelial cells. *Exp Cell Res*. (1999) **247**:399-409.
- [12] Kon SK, Cowie T. Milk : the mammary Gland and its secretion. Academic Press, New York and London, (1961).
- [13] McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. (2000) **321**:624-8.
- [14] Hill C, Doyon F. Frequency of cancer in France: 2004 update *Bull Cancer*. (2004) **91**:9-14.
- [15] Vorherr H, Messer RH. Breast cancer: potentially predisposing and protecting factors. Role of pregnancy, lactation, and endocrine status. *Am J Obstet Gynecol*. (1978) **130**:335-58.
- [16] Stanford JL, Herrinton LJ, Schwartz SM, Weiss NS. Breast cancer incidence in Asian migrants to the United States and their descendants. *Epidemiology*. (1995) **6**:181-3.

- [17] Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, West DW, Wu-Williams AH, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, et al. Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *J Natl Cancer Inst.* (1993) **85**:1819-27.
- [18] Key TJ, Pike MC. The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol.* (1988) **24**:29-43.
- [19] Byers T, Graham S, Rzepka T, Marshall J. Lactation and breast cancer. Evidence for a negative association in premenopausal women. *Am J Epidemiol.* (1985) **121**:664-74.
- [20] Henderson BE, Paganini-Hill A, Ross RK. Decreased mortality in users of estrogen replacement therapy. *Arch Intern Med.* (1991) **151**:75-8.
- [21] Romieu I, Hernandez-Avila M, Lazcano E, Lopez L, Romero-Jaime R. Breast cancer and lactation history in Mexican women. *Am J Epidemiol.* (1996) **143**:543-52.
- [22] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science.* (1994) **266**:66-71.
- [23] Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature.* (1995) **378**:789-92.
- [24] Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D, Cochran C, Harshman K, Tavtigian S, Bennett LM, Haugen-Strano A, Swensen J, Miki Y, et al. BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science.* (1994) **266**:120-2.
- [25] Lancaster JM, Wooster R, Mangion J, Phelan CM, Cochran C, Gumbs C, Seal S, Barfoot R, Collins N, Bignell G, Patel S, Hamoudi R, Larsson C, Wiseman RW, Berchuck A, Iglehart JD, Marks JR, Ashworth A, Stratton MR, Futreal PA. BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nat Genet.* (1996) **13**:238-40.
- [26] Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* (1957) **11**:359-77.
- [27] Mignot L, Morvan F, Espié M. Cancer du sein. Doin éditeurs, Rueil-Malmaison, (2002)
- [28] Kamby C, Rose C, Ejlertsen B, Andersen J, Birkler NE, Rytter L, Andersen KW, Zedeler K. *Eur J Cancer Clin Oncol.* (1987) **23**:1925-34.
- [29] Tubiana M, Koscielny S. Natural history of human cancer and prognostic factors. The example of breast cancer. *Bull Cancer.* (1987) **74**:43-57.
- [30] Cocconi G. The natural history of operable breast cancer after primary treatment. *Ann Oncol.* (1995) **6 Suppl 2**:11-21.
- [31] Walker MJ, Osborne MD, Young DC, Schneebaum S, La Valle GJ, Farrar WB. The natural history of breast cancer with more than 10 positive nodes. *Am J Surg.* (1995) **169**:575-9.
- [32] Halsted WS. The results of operations for the cure of cancer of the breast performed at the John Hopkins Hospital from June 1889 to January 1894. *Ann. Surg.* **20**:497-555.
- [33] Recht A, Bartelink H, Fourquet A, Fowble B, Haffty BG, Harris JR, Kurtz J, McCormick B, Olivetto IA, Rutqvist L, Solin LJ, Yarnold J. Postmastectomy radiotherapy: questions for the twenty-first century. *J Clin Oncol.* (1998) **16**:2886-9.

- [34] Osborne CK, Fuqua SA. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Breast Cancer Res Treat.* (1994) **32**:49-55.
- [35] Shou J, Massarweh S, Osborne CK, Wakeling AE, Ali S, Weiss H, Schiff R. Mechanisms of tamoxifen resistance: increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* (2004) **96**:926-35
- [36] Michalides R, Griekspoor A, Balkenende A, Verwoerd D, Janssen L, Jalink K, Floore A, Velds A, van't Veer L, Neefjes J. Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. *Cancer Cell.* (2004) **5**:597-605.
- [37] Nagy P, Jenei A, Damjanovich S, Jovin TM, Szolosi J. Complexity of signal transduction mediated by ErbB2: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. *Pathol Oncol Res.* (1999) **5**:255-71.
- [38] Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Pusztai L, Bloom KJ. The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy. *Oncologist.* (2003) **8**:307-25.
- [39] Horton J. Trastuzumab use in breast cancer: clinical issues. *Cancer Control.* (2002) **9**:499-507.
- [40] Dekker J, Rossen JW, Buller HA, Einerhand AW. The MUC family: an obituary. *Trends Biochem Sci.* (2002) **27**:126-31.
- [41] Brayman M, Thathiah A, Carson DD. MUC1: A multifunctional cell surface component of reproductive tissue epithelia. *Reprod Biol Endocrinol.* (2004) **2**:4.
- [42] Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer.* (2004) **4**:45-60.
- [43] Van Klinken BJ, Einerhand AW, Buller HA, Dekker J. Strategic biochemical analysis of mucins. *Anal Biochem.* (1998) **265**:103-16.
- [44] Li Y, Ren J, Yu W, Li Q, Kuwahara H, Yin L, Carraway KL 3rd, Kufe D. The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. *J Biol Chem.* (2001) **276**:35239-42.
- [45] Carraway KL, Ramsauer VP, Haq B, Carothers Carraway CA. Cell signaling through membrane mucins. *Bioessays.* (2003) **25**:66-71.
- [46] Bork P, Patthy L. The SEA module: a new extracellular domain associated with O-glycosylation. *Protein Sci.* (1995) **4**:1421-5.
- [47] Wreschner DH, McGuckin MA, Williams SJ, Baruch A, Yoeli M, Ziv R, Okun L, Zaretsky J, Smorodinsky N, Keydar I, Neophytou P, Stacey M, Lin HH, Gordon S. Generation of ligand-receptor alliances by "SEA" module-mediated cleavage of membrane-associated mucin proteins. *Protein Sci.* (2002) **11**:698-706.
- [48] Carraway KL, Price-Schiavi SA, Komatsu M, Idris N, Perez A, Li P, Jepson S, Zhu X, Carvajal ME, Carraway CA. Multiple facets of sialomucin complex/MUC4, a membrane mucin and erbb2 ligand, in tumors and tissues (Y2K update). *Front Biosci.* (2000) **5**:D95-D107.
- [49] Jepson S, Komatsu M, Haq B, Arango ME, Huang D, Carraway CA, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, induces specific phosphorylation of ErbB2 and enhances expression of p27(kip), but does not activate mitogen-activated kinase or protein kinaseB/Akt pathways. *Oncogene.* (2002) **21**:7524-32.

- [50] Hilkens J, Ligtenberg MJ, Vos HL, Litvinov SV. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem Sci.* (1992) **17**:359-63.
- [51] Hilkens J, Buijs F. Biosynthesis of MAM-6, an epithelial sialomucin. Evidence for involvement of a rare proteolytic cleavage step in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* (1988) **263**:4215-22.
- [52] Ligtenberg MJ, Kruijshaar L, Buijs F, van Meijer M, Litvinov SV, Hilkens J. Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor. *J Biol Chem.* (1992) **267**:6171-7.
- [53] Hull SR, Sugarman ED, Spielman J, Carraway KL. Biosynthetic maturation of an ascites tumor cell surface sialomucin. Evidence for O-glycosylation of cell surface glycoprotein by the addition of new oligosaccharides during recycling. *J Biol Chem.* (1991) **266**:13580-6.
- [54] Parry G, Li J, Stubbs J, Bissell MJ, Schmidhauser C, Spicer AP, Gendler SJ. Studies of Muc-1 mucin expression and polarity in the mouse mammary gland demonstrate developmental regulation of Muc-1 glycosylation and establish the hormonal basis for mRNA expression. *J Cell Sci.* (1992) **101**:191-9.
- [55] Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.* (1993) **53**:641-51.
- [56] Braga VM, Pemberton LF, Duhig T, Gendler SJ. Spatial and temporal expression of an epithelial mucin, Muc-1, during mouse development. *Development.* (1992) **115**:427-37.
- [57] Patton S. MUC1 and MUC-X, epithelial mucins of breast and milk. *Adv Exp Med Biol.* (2001) **501**:35-45.
- [58] Carraway KL, Price-Schiavi SA, Komatsu M, Jepson S, Perez A, Carraway CA. Muc4/sialomucin complex in the mammary gland and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* (2001) **6**:323-37.
- [59] Peterson JA, Scallan CD, Ceriani RL, Hamosh M. Structural and functional aspects of three major glycoproteins of the human milk fat globule membrane. *Adv Exp Med Biol.* (2001) **501**:179-87.
- [60] Patton S. Detection of large fragments of the human milk mucin MUC-1 in feces of breast-fed infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* (1994) **18**:225-30.
- [61] Kufe D, Inghirami G, Abe M, Hayes D, Justi-Wheeler H, Schlom J. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma.* (1984) **3**:223-32.
- [62] Hilkens J, Kroezen V, Bonfrer JM, De Jong-Bakker M, Bruning PF. MAM-6 antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring. *Cancer Res.* (1986) **46**:2582-7.
- [63] Hilkens J. CA 15-3 Assay for the Detection of Episialin in Serological Cancer Markers, Sell S. ed. The Humane Press, Totowa NJ, (1992).
- [64] Diaz LK, Wiley EL, Morrow M. Expression of epithelial mucins Muc1, Muc2, and Muc3 in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast J.* (2001) **7**:40-5.
- [65] Thathiah A, Blobel CP, Carson DD. Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding. *J Biol Chem.* (2003) **278**:3386-94.

- [66] Bieche I, Lidereau R. A gene dosage effect is responsible for high overexpression of the MUC1 gene observed in human breast tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* (1997) **98**:75-80.
- [67] Muleris M, Almeida A, Gerbault-Seureau M, Malfoy B, Dutrillaux B. Detection of DNA amplification in 17 primary breast carcinomas with homogeneously staining regions by a modified comparative genomic hybridization technique. *Genes Chromosomes Cancer.* (1994) **10**:160-70.
- [68] Borg A, Zhang QX, Olsson H, Wenngren E. Chromosome 1 alterations in breast cancer: allelic loss on 1p and 1q is related to lymphogenic metastases and poor prognosis. *Genes Chromosomes Cancer.* (1992) **5**:311-20.
- [69] Mommers EC, Leonhart AM, von Mensdorff-Pouilly S, Schol DJ, Hilgers J, Meijer CJ, Baak JP, van Diest PJ. Aberrant expression of MUC1 mucin in ductal hyperplasia and ductal carcinoma In situ of the breast. *Int J Cancer.* (1999) **84**:466-9.
- [70] Chu JS, Chang KJ. Mucin expression in mucinous carcinoma and other invasive carcinomas of the breast. *Cancer Lett.* (1999) **142**:121-7.
- [71] Matsukita S, Nomoto M, Kitajima S, Tanaka S, Goto M, Irimura T, Kim YS, Sato E, Yonezawa S. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma. *Histopathology.* (2003) **42**:26-36.
- [72] Rossi EA, McNeer RR, Price-Schiavi SA, Van den Brande JM, Komatsu M, Thompson JF, Carraway CA, Fregien NL, Carraway KL. Sialomucin complex, a heterodimeric glycoprotein complex. Expression as a soluble, secretable form in lactating mammary gland and colon. *J Biol Chem.* (1996) **271**:33476-85.
- [73] Komatsu M, Yee L, Carraway KL. Overexpression of sialomucin complex, a rat homologue of MUC4, inhibits tumor killing by lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res.* (1999) **59**:2229-36.
- [74] Pereira MB, Dias AJ, Reis CA, Schmitt FC. Immunohistochemical study of the expression of MUC5AC and MUC6 in breast carcinomas and adjacent breast tissues. *J Clin Pathol.* (2001) **54**:210-3.
- [75] de Bolos C, Guma M, Barranco C, Garrido M, Kim YS, Real FX. MUC6 expression in breast tissues and cultured cells: abnormal expression in tumors and regulation by steroid hormones. *Int J Cancer.* (1998) **77**:193-9.
- [76] Yin BW, Dnistrian A, Lloyd KO. Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int J Cancer.* (2002) **98**:737-40.
- [77] Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest.* (1981) **68**:1331-7.
- [78] Nustad K, Bast RC Jr, Brien TJ, Nilsson O, Seguin P, Suresh MR, Saga T, Nozawa S, Bormer OP, de Bruijn HW, Nap M, Vitali A, Gadnell M, Clark J, Shigemasa K, Karlsson B, Kreutz FT, Jette D, Sakahara H, Endo K, Paus E, Warren D, Hammarstrom S, Kenemans P, Hilgers J. Specificity and affinity of 26 monoclonal antibodies against the CA 125 antigen: first report from the ISOBM TD-1 workshop. International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine. *Tumour Biol.* (1996) **17**:196-219.
- [79] Ogmundsdottir HM, Gudlaugsdottir S, Bjornsson J, Jonasdottir S. Altered expression of CA-125 in breast carcinomas. *APMIS.* (1996) **104**:47-53.

- [80] Jager W, Kissling A, Cilaci S, Melsheimer R, Lang N. Is an increase in CA 125 in breast cancer patients an indicator of pleural metastases? *Br J Cancer*. (1994) **70**:493-5.
- [81] Kramer S, Jager W, Lang N. CA 125 is an indicator for pleural metastases in breast cancer. *Anticancer Res*. (1997) **17**:2967-70.
- [82] Norum LF, Erikstein B, Nustad K. Elevated CA125 in breast cancer--A sign of advanced disease. *Tumour Biol*. (2001) **22**:223-8.
- [83] Berruti A, Tampellini M, Torta M, Buniva T, Gorzegno G, Dogliotti L. Prognostic value in predicting overall survival of two mucinous markers: CA 15-3 and CA 125 in breast cancer patients at first relapse of disease. *Eur J Cancer*. (1994) **30A**:2082-4.
- [84] Wesseling J, van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A, Hilkens J. Episialin (MUC1) overexpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components. *J Cell Biol*. (1995) **129**:255-65.
- [85] Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol Biol Cell*. (1996) **7**:565-77.
- [86] Komatsu M, Carraway CA, Fregien NL, Carraway KL. Reversible disruption of cell-matrix and cell-cell interactions by overexpression of sialomucin complex. *J Biol Chem*. (1997) **272**:33245-54.
- [87] Komatsu M, Jepson S, Arango ME, Carothers Carraway CA, Carraway KL. Muc4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/Neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor. *Oncogene*. (2001) **20**:461-70.
- [88] Komatsu M, Tatum L, Altman NH, Carothers Carraway CA, Carraway KL. Potentiation of metastasis by cell surface sialomucin complex (rat MUC4), a multifunctional anti-adhesive glycoprotein. *Int J Cancer*. (2000) **87**:480-6.
- [89] Li Y, Kuwahara H, Ren J, Wen G, Kufe D. The c-Src tyrosine kinase regulates signaling of the human DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen with GSK3 beta and beta-catenin. *J Biol Chem*. (2001) **276**:6061-4.
- [90] Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ. Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem*. (2001) **276**:13057-64.
- [91] Meerzaman D, Shapiro PS, Kim KC. Involvement of the MAP kinase ERK2 in MUC1 mucin signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. (2001) **281**:L86-91.
- [92] Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Ben-Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest*. (2002) **109**:987-91.
- [93] Smalley MJ, Dale TC. Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. (2001) **6**:37-52.
- [94] Hatsell S, Rowlands T, Hiremath M, Cowin P. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. (2003) **8**:145-58.
- [95] Carraway KL, Perez A, Idris N, Jepson S, Arango M, Komatsu M, Haq B, Price-Schiavi SA, Zhang J, Carraway CA. Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, in cancer and epithelia: to protect and to survive. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. (2002) **71**:149-85.

- [96] Gourevitch MM, von Mensdorff-Pouilly S, Litvinov SV, Kenemans P, van Kamp GJ, Verstraeten AA, Hilgers J. Polymorphic epithelial mucin (MUC-1)-containing circulating immune complexes in carcinoma patients. *Br J Cancer*. (1995) **72**:934-8.
- [97] von Mensdorff-Pouilly S, Gourevitch MM, Kenemans P, Verstraeten AA, Litvinov SV, van Kamp GJ, Meijer S, Vermorken J, Hilgers J. Humoral immune response to polymorphic epithelial mucin (MUC-1) in patients with benign and malignant breast tumours. *Eur J Cancer*. (1996) **32A**:1325-31.
- [98] Croce MV, Isla-Larrain MT, Capafons A, Price MR, Segal-Eiras A. Humoral immune response induced by the protein core of MUC1 mucin in pregnant and healthy women. *Breast Cancer Res Treat*. (2001) **69**:1-11.
- [99] von Mensdorff-Pouilly S, Snijdwint FG, Verstraeten AA, Verheijen RH, Kenemans P. Human MUC1 mucin: a multifaceted glycoprotein. *Int J Biol Markers*. (2000) **15**:343-56.
- [100] Jerome KR, Barnd DL, Bendt KM, Boyer CM, Taylor-Papadimitriou J, McKenzie IF, Bast RC Jr, Finn OJ. Cytotoxic T-lymphocytes derived from patients with breast adenocarcinoma recognize an epitope present on the protein core of a mucin molecule preferentially expressed by malignant cells. *Cancer Res*. (1991) **51**:2908-16.
- [101] Jerome KR, Domenech N, Finn OJ. Tumor-specific cytotoxic T cell clones from patients with breast and pancreatic adenocarcinoma recognize EBV-immortalized B cells transfected with polymorphic epithelial mucin complementary DNA. *J Immunol*. (1993) **151**:1654-62.
- [102] Kontani K, Taguchi O, Narita T, Izawa M, Hiraiwa N, Zenita K, Takeuchi T, Murai H, Miura S, Kannagi R. Modulation of MUC1 mucin as an escape mechanism of breast cancer cells from autologous cytotoxic T-lymphocytes. *Br J Cancer*. (2001) **84**:1258-64.
- [103] Hiltbold EM, Alter MD, Ciborowski P, Finn OJ. Presentation of MUC1 tumor antigen by class I MHC and CTL function correlate with the glycosylation state of the protein taken up by dendritic cells. *Cell Immunol*. (1999) **194**:143-9.
- [104] Agrawal B, Krantz MJ, Parker J, Longenecker BM. Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation. *Cancer Res*. (1998) **58**:4079-81.
- [105] Wykes M, MacDonald KP, Tran M, Quin RJ, Xing PX, Gendler SJ, Hart DN, McGuckin MA. MUC1 epithelial mucin (CD227) is expressed by activated dendritic cells. *J Leukoc Biol*. (2002) **72**:692-701.
- [106] Fukuda M. Roles of mucin-type O-glycans in cell adhesion. *Biochim Biophys Acta*. (2002) **1573**:394-405.
- [107] Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC. The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer. *Cancer Res*. (1996) **56**:4244-9.
- [108] Agrawal B, Gendler SJ, Longenecker BM. The biological role of mucins in cellular interactions and immune regulation: prospects for cancer immunotherapy. *Mol Med Today*. (1998) **4**:397-403.
- [109] Gimmi CD, Morrison BW, Mainprice BA, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Park SY, Watanabe M, Gong J, Hayes DF, Kufe DW, Nadler LM. Breast cancer-associated antigen, DF3/MUC1, induces apoptosis of activated human T cells. *Nat Med*. (1996) **2**:1367-70.

- [110] Chan AK, Lockhart DC, von Bernstorff W, Spanjaard RA, Joo HG, Eberlein TJ, Goedegebuure PS. Soluble MUC1 secreted by human epithelial cancer cells mediates immune suppression by blocking T-cell activation. *Int J Cancer*. (1999) **82**:721-6.
- [111] Paul S, Bizouarne N, Paul A, Price MR, Hansson GC, Kieny MP, Acres RB. Lack of evidence for an immunosuppressive role for MUC1. *Cancer Immunol Immunother*. (1999) **48**:22-8.
- [112] Dabelsteen E. Cell surface carbohydrates as prognostic markers in human carcinomas. *J Pathol*. (1996) **179**:358-69.
- [113] Ten Hagen KG, Fritz TA, Tabak LA. All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology*. (2003) **13**:1R-16R.
- [114] Ikehara Y, Kojima N, Kurosawa N, Kudo T, Kono M, Nishihara S, Issiki S, Morozumi K, Itzkowitz S, Tsuda T, Nishimura SI, Tsuji S, Narimatsu H. Cloning and expression of a human gene encoding an N-acetylgalactosamine- $\alpha$ 2,6-sialyltransferase (ST6GalNAc I): a candidate for synthesis of cancer-associated sialyl-Tn antigens. *Glycobiology*. (1999) **9**:1213-24.
- [115] Hounsell EF, Davies MJ, Renouf DV. O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconj J*. (1996) **13**:19-26.
- [116] Hounsell EF, Feizi T. Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease. *Med Biol*. (1982) **60**:227-36.
- [117] Hounsell EF, Fukuda M, Powell ME, Feizi T, Hakomori S. A new O-glycosidically linked tri-hexosamine core structure in sheep gastric mucin: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun*. (1980) **92**:1143-50.
- [118] Brockhausen I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. (1999) **1473**:67-95.
- [119] Degroote S, Ducourouble MP, Roussel P, Lamblin G. Sequential biosynthesis of sulfated and/or sialylated Lewis x determinants by transferases of the human bronchial mucosa. *Glycobiology*. (1999) **9**:1199-211.
- [120] Kuhns W, Jain RK, Matta KL, Paulsen H, Baker MA, Geyer R, Brockhausen I. Characterization of a novel mucin sulphotransferase activity synthesizing sulphated O-glycan core 1,3-sulphate-Gal beta 1-3GalNAc alpha-R. *Glycobiology*. (1995) **5**:689-97.
- [121] Bartek J, Bartkova J, Kyprianou N, Lalani EN, Staskova Z, Shearer M, Chang S, Taylor-Papadimitriou J. Efficient immortalization of luminal epithelial cells from human mammary gland by introduction of simian virus 40 large tumor antigen with a recombinant retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1991) **88**:3520-4.
- [122] Muller S, Goletz S, Packer N, Gooley A, Lawson AM, Hanisch FG. Localization of O-glycosylation sites on glycopeptide fragments from lactation-associated MUC1. All putative sites within the tandem repeat are glycosylation targets in vivo. *J Biol Chem*. (1997) **272**:24780-93.
- [123] Hanisch FG, Uhlenbruck G, Peter-Katalinic J, Egge H, Dabrowski J, Dabrowski U. Structures of neutral O-linked poly-lactosaminoglycans on human skim milk mucins. A novel type of linearly extended poly-N-acetyllactosamine backbones with Gal beta(1-4)GlcNAc beta(1-6) repeating units. *J Biol Chem*. (1989) **264**:872-83.



- [124] Hanisch FG, Peter-Katalinic J, Egge H, Dabrowski U, Uhlenbruck G. Structures of acidic O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins. *Glycoconj J.* (1990) **7**:525-43.
- [125] Brockhausen I, Yang JM, Burchell J, Whitehouse C, Taylor-Papadimitriou J. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem.* (1995) **233**:607-17.
- [126] Lloyd KO, Burchell J, Kudryashov V, Yin BW, Taylor-Papadimitriou J. Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells. *J Biol Chem.* (1996) **271**:33325-34.
- [127] Hanisch FG, Stadie TR, Deutzmann F, Peter-Katalinic J. MUC1 glycoforms in breast cancer--cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. *Eur J Biochem.* (1996) **236**:318-27.
- [128] Muller S, Alving K, Peter-Katalinic J, Zachara N, Gooley AA, Hanisch FG. High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D breast cancer cells. *J Biol Chem.* (1999) **274**:18165-72.
- [129] Muller S, Hanisch FG. Recombinant MUC1 probe authentically reflects cell-specific O-glycosylation profiles of endogenous breast cancer mucin. High density and prevalent core 2-based glycosylation. *J Biol Chem.* (2002) **277**:26103-12.
- [130] Hanisch FG, Muller S, Hassan H, Clausen H, Zachara N, Gooley AA, Paulsen H, Alving K, Peter-Katalinic J. Dynamic epigenetic regulation of initial O-glycosylation by UDP-N-Acetylgalactosamine:Peptide N-acetylgalactosaminyltransferases. site-specific glycosylation of MUC1 repeat peptide influences the substrate qualities at adjacent or distant Ser/Thr positions. *J Biol Chem.* (1999) **274**:9946-54.
- [131] Hanisch FG, Reis CA, Clausen H, Paulsen H. Evidence for glycosylation-dependent activities of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases rGalNAc-T2 and -T4 on mucin glycopeptides. *Glycobiology.* (2001) **11**:731-40.
- [132] Gerken TA, Zhang J, Levine J, Elhammer A. Mucin core O-glycosylation is modulated by neighboring residue glycosylation status. Kinetic modeling of the site-specific glycosylation of the apo-porcine submaxillary mucin tandem repeat by UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases T1 and T2. *J Biol Chem.* (2002) **277**:49850-62.
- [133] Kanska G, Guillot J, De Latour M, Fonck Y. Expression of Tn antigen and N-acetyllactosamine residues in malignant and benign human breast tumors detected by lectins and monoclonal antibody 83D4. *Int J Oncol.* (1998) **12**(2):361-7.
- [134] Fenlon S, Ellis IO, Bell J, Todd JH, Elston CW, Blamey RW. Helix pomatia and Ulex europeus lectin binding in human breast carcinoma. *J Pathol.* (1987) **152**:169-76.
- [135] Leathem AJ, Brooks SA. Predictive value of lectin binding on breast-cancer recurrence and survival. *Lancet.* (1987) **1**:1054-6.
- [136] Springer GF. Tn epitope (N-acetyl-D-galactosamine alpha-O-serine/threonine) density in primary breast carcinoma: a functional predictor of aggressiveness. *Mol Immunol.* (1989) **26**:1-5.
- [137] Wang BL, Springer GF, Carlstedt SC. Quantitative computerized image analysis of Tn and T (Thomsen-Friedenreich) epitopes in prognostication of human breast carcinoma. *J Histochem Cytochem.* (1997) **45**:1393-400.

- [138] Brooks SA, Leathem AJ. Prediction of lymph node involvement in breast cancer by detection of altered glycosylation in the primary tumour. *Lancet*. (1991) **338**:71-4.
- [139] Wang BL, Springer GF, Harwick LC. T (Thomsen-Friedenreich) and Tn epitope location and their spatial relations to adhesion plaques on human breast carcinoma cells: immunogold-silver staining studies at scanning electron microscopic level. *J Submicrosc Cytol Pathol*. (1998) **30**:503-9.
- [140] Kishikawa T, Ghazizadeh M, Sasaki Y, Springer GF. Specific role of T and Tn tumor-associated antigens in adhesion between a human breast carcinoma cell line and a normal human breast epithelial cell line. *Jpn J Cancer Res*. (1999) **90**:326-32.
- [141] Konska G, Vissac C, Zagla K, Chezet F, Vasson MP, Bernard-Gallon D, Guillot J. Ultrastructural localization of binding sites for PNA and VVA-B(4) lectins in human breast cancer cell lines detected by confocal fluorescence microscopy. *Int J Oncol*. (2002) **21**:1009-14.
- [142] Whitehouse C, Burchell J, Gschmeissner S, Brockhausen I, Lloyd KO, Taylor-Papadimitriou J. A transfected sialyltransferase that is elevated in breast cancer and localizes to the medial/trans-Golgi apparatus inhibits the development of core-2-based O-glycans. *J Cell Biol*. (1997) **137**:1229-41.
- [143] Burchell J, Poulsom R, Hanby A, Whitehouse C, Cooper L, Clausen H, Miles D, Taylor-Papadimitriou J. An alpha2,3 sialyltransferase (ST3Gal I) is elevated in primary breast carcinomas. *Glycobiology*. (1999) **9**:1307-11.
- [144] Dalziel M, Whitehouse C, McFarlane I, Brockhausen I, Gschmeissner S, Schwientek T, Clausen H, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J. The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1. *J Biol Chem*. (2001) **276**:11007-15.
- [145] Chandrasekaran EV, Jain RK, Vig R, Matta KL. The enzymatic sulfation of glycoprotein carbohydrate units: blood group T-hapten specific and two other distinct Gal:3-O-sulfotransferases as evident from specificities and kinetics and the influence of sulfate and fucose residues occurring in the carbohydrate chain on C-3 sulfation of terminal Gal. *Glycobiology*. (1997) **7**:753-68.
- [146] Chandrasekaran EV, Jain RK, Rhodes JM, Chawda R, Piskorz C, Matta KL. Characterization of distinct Gal:3-O-sulfotransferase activities in human tumor epithelial cell lines and of calf lymph node GlcNAc : 6-O-sulfotransferase activity. *Glycoconj J*. (1999) **16**:523-36.
- [147] Schneider F, Kemmner W, Haensch W, Franke G, Gretschel S, Karsten U, Schlag PM. Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid:Galbeta1,3GalNAc-R alpha6-Sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinomas. *Cancer Res*. (2001) **61**:4605-11.
- [148] Coombes RC, Powles TJ, Gazet JC, Ford HT, Sloane JP, Laurence DJ, Neville AM. Biochemical markers in human breast cancer. *Lancet*. (1977) **1**:132-4.
- [149] Lee YT, Tokes ZA, Csipke CP. Plasma sialyltransferase in patients with breast cancer. *J Surg Oncol*. (1980) **14**:159-65.
- [150] Abecassis J, Collard R, Eber M, Pusel J, Fricker JP, Methlin G. Proteinases and sialyltransferase in human breast tumors. *Int J Cancer*. (1984) **33**:821-4.
- [151] Suer S, Baloglu H, Gungor Z, Sonmez H, Kokoglu E. The distribution of tissue fibronectin and sialic acid in human breast cancer. *Cancer Biochem Biophys*. (1998) **16**:63-70.

- [152] Recchi MA, Hebbar M, Hornez L, Harduin-Lepers A, Peyrat JP, Delannoy P. Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer. *Cancer Res.* (1998) **58**:4066-70.
- [153] Nakagoe T, Fukushima K, Hirota M, Kusano H, Kawahara K, Ayabe H, Tomita M, Kamihira S. Immunohistochemical expression of blood group substances and related carbohydrate antigens in breast carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* (1991) **82**:559-68.
- [154] Ho JJ, Siddiki B, Kim YS. Association of sialyl-Lewis(a) and sialyl-Lewis(x) with MUC-1 apomucin in a pancreatic cancer cell line. *Cancer Res.* (1995) **55**:3659-63.
- [155] Hanski C, Hanski ML, Zimmer T, Ogorek D, Devine P, Riecken EO. Characterization of the major sialyl-Lex-positive mucins present in colon, colon carcinoma, and sera of patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* (1995) **55**:928-33.
- [156] Renkonen J, Paavonen T, Renkonen R. Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis(x) and sialyl Lewis(a) in lesions of breast carcinoma. *Int J Cancer.* (1997) **74**:296-300.
- [157] Nakagoe T, Fukushima K, Itoyanagi N, Ikuta Y, Oka T, Nagayasu T, Ayabe H, Hara S, Ishikawa H, Minami H. Expression of ABH/Lewis-related antigens as prognostic factors in patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* (2002) **128**:257-64.
- [158] Narita T, Funahashi H, Satoh Y, Watanabe T, Sakamoto J, Takagi H. Association of expression of blood group-related carbohydrate antigens with prognosis in breast cancer. *Cancer.* (1993) **71**:3044-53.
- [159] Walker RA, Day SJ. Expression of the antigen detected by the monoclonal antibody Ca 19.9 in human breast tissues. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* (1986) **409**:375-83.
- [160] Steplewska-Mazur K, Gabriel A, Zajecki W, Wylezol M, Gluck M. Breast cancer progression and expression of blood group-related tumor-associated antigens. *Hybridoma.* (2000) **19**:129-33.
- [161] Schuster O, Klich G, Sinnwell V, Kranz H, Paulsen H, Meyer B. 'Wave-type' structure of a synthetic hexaglycosylated decapeptide: a part of the extracellular domain of human glycophorin A. *J Biomol NMR.* (1999) **14**:33-45.
- [162] Schuman J, Qiu D, Koganty RR, Longenecker BM, Campbell AP. Glycosylations versus conformational preferences of cancer associated mucin core. *Glycoconj J.* (2000) **17**:835-48.
- [163] Ligtenberg MJ, Buijs F, Vos HL, Hilkens J. Suppression of cellular aggregation by high levels of episialin. *Cancer Res.* (1992) **52**:2318-24.
- [164] Kannagi R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J.* (1997) **14**:577-84.
- [165] McEver RP. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj J.* (1997) **14**:585-91.
- [166] Crocker PR, Varki A. Siglecs, sialic acids and innate immunity. *Trends Immunol.* (2001) **22**:337-42.
- [167] Crocker PR. Siglecs: sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins in cell-cell interactions and signalling. *Curr Opin Struct Biol.* (2002) **12**:609-15.
- [168] Nath D, Hartnell A, Happerfield L, Miles DW, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Crocker PR. Macrophage-tumour cell interactions: identification of MUC1 on breast cancer

- cells as a potential counter-receptor for the macrophage-restricted receptor, sialoadhesin. *Immunology*. (1999) **98**:213-9.
- [169] Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*. (1996) **56**:4625-9.
- [170] Nuti M, Teramoto YA, Mariani-Costantini R, Hand PH, Colcher D, Schlom J. A monoclonal antibody (B72.3) defines patterns of distribution of a novel tumor-associated antigen in human mammary carcinoma cell populations. *Int J Cancer*. (1982) **29**:539-45.
- [171] Gold DV, Mattes MJ. Monoclonal antibody B72.3 reacts with a core region structure of O-linked carbohydrates. *Tumour Biol*. (1988) **9**:137-44.
- [172] Harduin-Lepers A, Krzewinski-Recchi MA, Hebbar M, Samyn-Petit B, Vallejo-Ruiz V, Julien S, Peyrat JP, Delannoy P. Sialyltransferases and breast cancer. In: *Recent Res. Devel. Cancer*. Vol 3 pp 111-26. Trivandrum: Transworld Research Network, (2001)
- [173] Kono M, Tsuda T, Ogata S, Takashima S, Liu H, Hamamoto T, Itzkowitz SH, Nishimura S, Tsuji S. Redefined substrate specificity of ST6GalNAc II: a second candidate sialyl-Tn synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. (2000) **272**:94-7.
- [174] Samyn-Petit B, Krzewinski-Recchi MA, Steelant WF, Delannoy P, Harduin-Lepers A. Molecular cloning and functional expression of human ST6GalNAc II. Molecular expression in various human cultured cells. *Biochim Biophys Acta*. (2000) **1474**:201-11.
- [175] Brockhausen I, Yang J, Lehotay M, Ogata S, Itzkowitz S. Pathways of mucin O-glycosylation in normal and malignant rat colonic epithelial cells reveal a mechanism for cancer-associated Sialyl-Tn antigen expression. *Biol Chem*. (2001) **382**:219-32.
- [176] Imai J, Ghazizadeh M, Naito Z, Asano G. Immunohistochemical expression of T, Tn and sialyl-Tn antigens and clinical outcome in human breast carcinoma. *Anticancer Res*. (2001) **21**:1327-34.
- [177] Cao Y, Stosiek P, Springer GF, Karsten U. Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study. *Histochem Cell Biol*. (1996) **106**:197-207.
- [178] Cho SH, Sahin A, Hortobagyi GN, Hittelman WN, Dhingra K. Sialyl-Tn antigen expression occurs early during human mammary carcinogenesis and is associated with high nuclear grade and aneuploidy. *Cancer Res*. (1994) **54**:6302-5.
- [179] Reed W, Bryne M, Clausen H, Dabelsteen E, Nesland JM. Simple mucins (T, sialosyl-T, Tn and sialosyl-Tn) are not diagnostic for malignant breast lesions. *Anticancer Res*. (1994) **14**:609-15.
- [180] Schmitt FC, Figueiredo P, Lacerda M. Simple mucin-type carbohydrate antigens (T, sialosyl-T, Tn and sialosyl-Tn) in breast carcinogenesis. *Virchows Arch*. (1995) **427**:251-8.
- [181] Castagna M, Nuti M, Squartini F. Mammary cancer antigen recognized by monoclonal antibody B72.3 in apocrine metaplasia of the human breast. *Cancer Res*. (1987) **47**:902-6.
- [182] Lottich SC, Johnston WW, Szpak CA, DeLong ER, Thor A, Schlom J. Tumor-associated antigen TAG-72: correlation of expression in primary and metastatic breast carcinoma lesions. *Breast Cancer Res Treat*. (1985) **6**:49-56.
- [183] Thor A, Ohuchi N, Szpak CA, Johnston WW, Schlom J. Distribution of oncofetal antigen tumor-associated glycoprotein-72 defined by monoclonal antibody B72.3. *Cancer Res*. (1986) **46**:3118-24.

- [184] Miles DW, Happerfield LC, Smith P, Gillibrand R, Bobrow LG, Gregory WM, Rubens RD. Expression of sialyl-Tn predicts the effect of adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer. *Br J Cancer*. (1994) **70**:1272-5.
- [185] Schmitt FC, Marinho A, Amendoeira I. Expression of sialyl-Tn in fine-needle aspirates from mammographically detected breast lesions: a marker of malignancy? *Diagn Cytopathol*. (1998) **18**:325-9.
- [186] Contegiacomo A, Alimandi M, Muraro R, Pizzi C, Calderopoli R, De Marchis L, Sgambato A, Pettinato G, Petrella G, De Filippo MR, et al. Expression of epitopes of the tumour-associated glycoprotein 72 and clinicopathological correlations in mammary carcinomas. *Eur J Cancer*. (1994) **30A**:813-20.
- [187] Leivonen M, Nordling S, Lundin J, von Boguslawski K, Haglund C. STn and prognosis in breast cancer. *Oncology*. (2001) **61**:299-305.
- [188] Kinney AY, Sahin A, Vernon SW, Frankowski RF, Annegers JF, Hortobagyi GN, Buzdar AU, Frye DK, Dhingra K. The prognostic significance of sialyl-Tn antigen in women treated with breast carcinoma treated with adjuvant chemotherapy. *Cancer*. (1997) **80**:2240-9.
- [189] Soares R, Marinho A, Schmitt F. Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters. *Pathol Res Pract*. (1996) **192**:1181-6.
- [190] Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitao D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclooxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol*. (2002) **55**:429-34.
- [191] Muroi K, Suda T, Nakamura M, Okada S, Nojiri H, Amemiya Y, Miura Y, Hakomori S. Expression of sialosyl-Tn in colony-forming unit-erythroid, erythroblasts, B cells, and a subset of CD4+ cells. *Blood*. (1994) **83**:84-91.
- [192] Friedman E, Thor A, Hand PH, Schlom J. Surface expression of tumor-associated antigens in primary cultured human colonic epithelial cells from carcinomas, benign tumors, and normal tissues. *Cancer Res*. (1985) **45**:5648-55.
- [193] Horan Hand P, Colcher D, Salomon D, Ridge J, Noguchi P, Schlom J. Influence of spatial configuration of carcinoma cell populations on the expression of a tumor-associated glycoprotein. *Cancer Res*. (1985) **45**:833-40.
- [194] LaRue H, Parent-Vaugeois C, Bergeron A, Champetier S, Fradet Y. Influence of spatial configuration on the expression of carcinoembryonic antigen and mucin antigens in human bladder cancer. *Int J Cancer*. (1997) **71**:986-92.
- [195] Brockhausen I, Yang J, Dickinson N, Ogata S, Itzkowitz SH. Enzymatic basis for sialyl-Tn expression in human colon cancer cells. *Glycoconj J*. (1998) **15**:595-603.
- [196] Bresalier RS, Byrd JC, Brodt P, Ogata S, Itzkowitz SH, Yunker CK. Liver metastasis and adhesion to the sinusoidal endothelium by human colon cancer cells is related to mucin carbohydrate chain length. *Int J Cancer*. (1998) **76**:556-62.
- [197] Nakada H, Inoue M, Tanaka N, Yamashina I. Coexpression of cancer-associated carbohydrate antigens, Tn and sialyl Tn. *Glycoconj J*. (1994) **11**:262-5.
- [198] Byrd JC, Dahiya R, Huang J, Kim YS. Inhibition of mucin synthesis by benzyl-alpha-GalNAc in KATO III gastric cancer and Caco-2 colon cancer cells. *Eur J Cancer*. (1995) **31A**:1498-505.

- [199] Burdick MD, Harris A, Reid CJ, Iwamura T, Hollingsworth MA. Oligosaccharides expressed on MUC1 produced by pancreatic and colon tumor cell lines. *J Biol Chem.* (1997) **272**:24198-202.
- [200] Singh R, Campbell BJ, Yu LG, Fernig DG, Milton JD, Goodlad RA, FitzGerald AJ, Rhodes JM. Cell surface-expressed Thomsen-Friedenreich antigen in colon cancer is predominantly carried on high molecular weight splice variants of CD44. *Glycobiology.* (2001) **11**:587-92.
- [201] Ohuchi N, Harada Y, Masuko T, Matano S, Mori S. Characterization of cell surface antigens expressed in the HMA-1 breast cancer cell line. *Surg Today.* (1995) **25**:244-50.
- [202] Matano S, Ohuchi N, Hirakawa H, Nishihira T, Abe M, Mori S, Akimoto M. Establishment of an estrogen receptor-positive cell line (HMA-1) derived from human breast carcinoma. *Tohoku J Exp Med.* (1991) **164**:169-82.
- [203] Reddish MA, Jackson L, Koganty RR, Qiu D, Hong W, Longenecker BM. Specificities of anti-sialyl-Tn and anti-Tn monoclonal antibodies generated using novel clustered synthetic glycopeptide epitopes. *Glycoconj J.* (1997) **14**:549-60.
- [204] Burchell J, Taylor-Papadimitriou J. Effect of modification of carbohydrate side chains on the reactivity of antibodies with core-protein epitopes of the MUC1 gene product. *Epithelial Cell Biol.* (1993) **2**:155-62.
- [205] Hanisch FG, Uhlenbruck G, Egge H, Peter-Katalinic J. A B72.3 second-generation-monoclonal antibody (CC49) defines the mucin-carried carbohydrate epitope Gal beta(1-3)[NeuAc alpha(2-6)]GalNAc. *Biol Chem Hoppe Seyler.* (1989) **370**:21-6.
- [206] Cebo C, Dambrouck T, Maes E, Laden C, Strecker G, Michalski JC, Zanetta JP. Recombinant human interleukins IL-1alpha, IL-1beta, IL-4, IL-6, and IL-7 show different and specific calcium-independent carbohydrate-binding properties. *J Biol Chem.* (2001) **276**:5685-91.
- [207] Brinkman-Van der Linden EC, Varki A. New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins. *J Biol Chem.* (2000) **275**:8625-32.
- [208] Al-Rawi MA, Rmali K, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Aberrant expression of interleukin-7 (IL-7) and its signalling complex in human breast cancer. *Eur J Cancer.* (2004) **40**:494-502.
- [209] Al-Rawi MA, Rmali K, Mansel RE, Jiang WG. Interleukin 7 induces the growth of breast cancer cells through a wortmannin-sensitive pathway. *Br J Surg.* (2004) **91**:61-8.
- [210] Ogata S, Maimonis PJ, Itzkowitz SH. Mucins bearing the cancer-associated sialosyl-Tn antigen mediate inhibition of natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res.* (1992) **52**:4741-6.

**Résumé :**

Le cancer du sein est le premier cancer féminin en France, en termes de fréquence et de mortalité. L'antigène sialyl-Tn, une structure *O*-glycannique détectée chez 40% des patientes, est associé à une diminution du taux de survie. Pour élucider les mécanismes responsables de ce mauvais pronostic, nous avons généré des modèles de cellules de cancer du sein sialyl-Tn positifs, en induisant l'expression de l'enzyme ST6GalNAc I dans des lignées cellulaires. L'étude de ces modèles a montré que les modifications de *O*-glycosylation diminuent l'adhérence et augmentent la migration des cellules cancéreuses. De plus, l'expérimentation en modèle animal a montré que les tumeurs sialyl-Tn positives ont une croissance plus rapide que les tumeurs sialyl-Tn négatives. Ceci suggère que l'expression de l'antigène Sialyl-Tn puisse influencer sur les interactions des cellules cancéreuses avec les tissus de l'organisme hôte.

**Mots Clés :**

Cancer du sein, sialyl-Tn, *O*-glycosylation, ST6GalNAc I, mucines, croissance tumorale.

---

**Sialyl-Tn antigen in breast cancer : Study of the *O*-glycosylation and its impact on the growth of sialyl-Tn positive breast cancer cell-lines.****Abstract:**

Breast cancer is the most frequent women's cancer in France, and present a high incidence of mortality. Sialyl-Tn antigen is an *O*-glycan detected in 40% of the breast cancers and associated with a decreased survival. For a better understanding of the mechanisms by which this antigen enhances the cancer aggressiveness, we have generated cellular models which constitutively express sialyl-Tn antigen, by transfecting the ST6GalNAc I cDNA in breast cancer cell lines. Here we show, that the modifications of *O*-glycosylation pattern induces a decreased adhesion and an increased migration of the cancer cells. Moreover, *in vivo* experiment shows that sialyl-Tn positive tumours grow faster than sialyl-Tn negative ones in SCID mice. This suggests that sialyl-Tn expression could modulate the cell-cell interaction between the cancer cells and the host cells.

**Keywords:**

Breast cancer, sialyl-Tn, *O*-glycosylation, ST6GalNAc I, mucins, cell growth