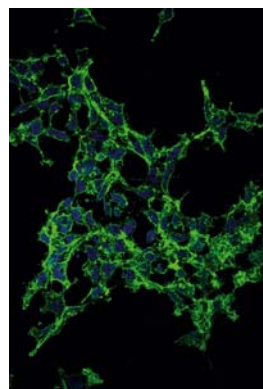


Les mécanismes de régulation de la glycosylation

Exemples d'altérations des chaînes glycaniques dans les cancers

Sophie Groux-Degroote, François Foulquier, Sumeyye Cavdarli, Philippe Delannoy

> La glycosylation est l'une des modifications essentielles des protéines et des lipides. Elle s'effectue principalement dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi et fait appel à une machinerie moléculaire spécifique, associant plusieurs centaines de glycosyltransférases, de glycosidases, de transporteurs et de protéines régulatrices. Des modifications de la glycosylation sont retrouvées dans certaines maladies, notamment dans les cancers. Ces altérations peuvent affecter toutes les formes de glycosylation réticulaires et/ou golgiennes, et conduire à des dysfonctionnements du métabolisme cellulaire. Dans cette revue, nous présentons l'état actuel des connaissances des mécanismes de la glycosylation. Nous illustrerons, au travers d'exemples représentatifs, comment l'altération de certains de ces mécanismes de régulation peut affecter les différentes formes de glycosylation des protéines et des lipides et participer au développement des cancers. <



Univ. Lille, CNRS, UMR 8576 - UGSF - Unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle, Avenue Mendeleïev, 59655 Villeneuve-d'Ascq, France. sophie.groux-degroote@univ-lille.fr

Ignoramus. Un système complexe qui commence seulement à être déchiffré

Toutes les formes de vie cellulaires, bactéries, archées, virus et eucaryotes, ont un point commun : la surface de leur membrane est recouverte d'une surface sucrée appelée « glycocalyx » [1]. Une mosaïque de glycanes, c'est-à-dire de chaînes oligosaccharidiques constituées de monosaccharides différents, attachées ou non à des protéines ou à des lipides, constituent cette enveloppe, à la fois protectrice et fonctionnelle. Ces structures glycaniques, où chaque monosaccharide peut lui-même avoir plusieurs types de liaisons avec d'autres monosaccharides, peuvent être linéaires ou ramifiées. Cet enchevêtrement de structures génère une diversité structurale complexe et dynamique,

retrouvée à l'interface des cellules avec leur environnement biotique et abiotique. Cette réaction, qui consiste à lier un monosaccharide ou une structure glycanique à une protéine et/ou un lipide, est connue sous le nom de glycosylation [2]. Il s'agit d'une modification structurale des protéines et des lipides, fondamentale. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, physiologiques et pathologiques, tels que la reproduction, le développement et l'immunité [3]. Chez les mammifères, plusieurs types de glycosylation existent, principalement la N- et la O-glycosylation des protéines, plus rarement la S- et la C-glycosylation. Ces glycosylations se distinguent selon la nature chimique de la liaison entre l'acide aminé de la protéine et la structure glycanique qui lui est attachée¹. En fonction de la modification apportée à la protéine, on parlera de N-glycoprotéine ou de O-glycoprotéine.

La glycosylation offre aux eucaryotes supérieurs une combinatoire à l'origine d'une grande diversité de structures glycaniques qui seront associées à la charpente protéique, sans nécessité de modifications préalables du génome [4]. La régulation de ce vaste glycoprotéome apparaît donc essentielle et atteint un niveau de complexité que nous essaierons de synthétiser ici.

¹ La O-glycosylation correspond à la liaison entre la N-acétylgalactosamine (GalNAc) et l'oxygène (O) du groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine de la protéine. Dans la N-glycosylation, la N-acétylglucosamine est liée à l'azote (N) du groupement amide d'une asparagine (dans le motif Asn-X-[Ser/Thr]) de la protéine. La C-glycosylation consiste en la liaison d'un résidu mannose au carbone du noyau indole d'un tryptophane de la protéine. La S-glycosylation fait intervenir le groupement thiol d'une cystéine de la protéine.

Vignette (Photo © Marine Houdou).

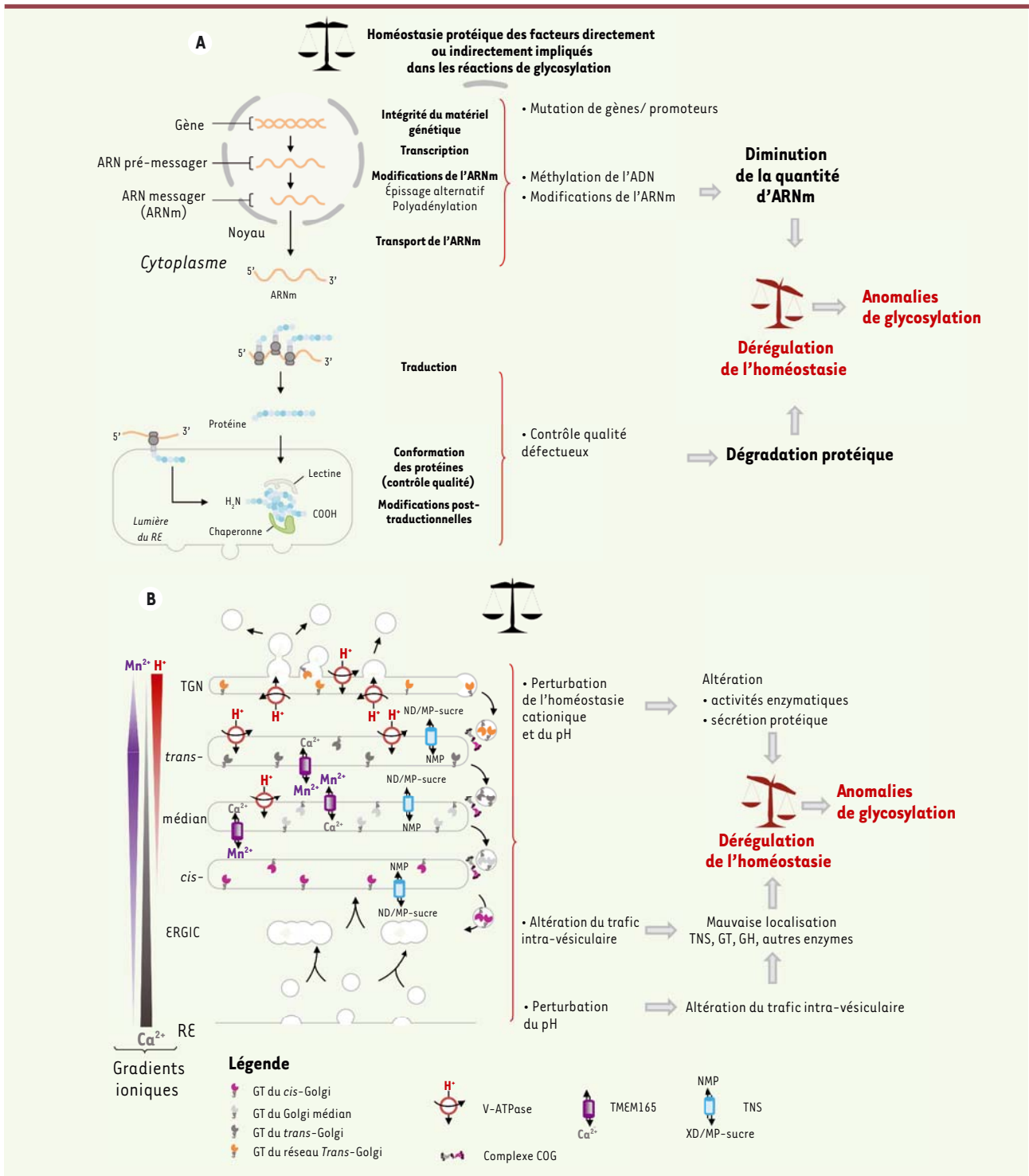


Figure 1. Origine des anomalies de glycosylation. A. Causes principales de la dérégulation de l'homéostasie protéique des acteurs directs et/ou indirects de la glycosylation. **B.** Facteurs altérant l'homéostasie de l'appareil de Golgi (pH, trafic intra-vésiculaire, gradient ionique), conduisant à des anomalies de glycosylation.

Un premier élément important à considérer est qu'il n'existe évidemment pas, *per se*, de gènes codant ces structures glycaniques, contrairement aux protéines. On estime cependant qu'environ 2 % du génome codant des mammifères correspond à des gènes dont le produit participe à la synthèse

de ces structures [5]. Ces gènes codent un arsenal d'enzymes prodigieux. Ce dernier comprend : des glycosyltransférases (environ 200), qui transfèrent les monosaccharides et donc permettent la synthèse des chaînes glycaniques ;

des glycosidases (76), qui remodelent les structures élaborées en retirant certains monosaccharides des chaînes glycaniques déjà formées ; des enzymes impliquées dans le métabolisme et le transport des monosaccharides (environ une centaine) ; des enzymes intervenant dans le processus de sulfatation des résidus, qui formeront les glycosaminoglycanes (environ 54) ; enfin, environ 30 enzymes régulant les voies de biosynthèse des lipides et des ancres GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol), qui permettent l'ancrage des protéines ne possédant pas de région transmembranaire dans les membranes cellulaires² [6, 7]. Un paramètre important est donc l'expression de cet échafaudage de protéines nécessaire au processus de glycosylation. Il dépend lui-même de nombreux paramètres cellulaires, tels que la régulation transcriptionnelle (expression différentielle de facteurs de transcription, régulation épigénétique), post-transcriptionnelle (présence de micro-ARN), traductionnelle (vitesse de synthèse des protéines) et post-traductionnelle (mise en place de la structure tridimensionnelle, modifications d'acides aminés, interactions avec d'autres protéines) (Figure 1A). La structure des glycannes utilisés, en particulier pour la N-glycosylation, est un facteur important de la régulation de l'abondance de certaines glycoprotéines. En effet, pour les N-glycoprotéines, et uniquement pour ces dernières, un véritable contrôle qualité, fondé sur la structure même de la chaîne glycanique, s'effectue dans le réticulum endoplasmique (RE). Ce contrôle qualité va non seulement aider au repliement des glycoprotéines, mais il discriminer également celles mal repliées, destinées à être dégradées, de celles correctement repliées. À noter que la plupart des protéines membranaires ou sécrétées sont des N-glycoprotéines. Le mécanisme réticulaire de contrôle « décide » donc, en quelque sorte, du droit de vie ou de mort de la glycoprotéine qui a été produite [8, 9].

Pour agir, la plupart des enzymes ont besoin de substrats. Pour les glycosyltransférases, il s'agira de monosaccharides. Les précurseurs monosaccharidiques, activés par leur liaison à un nucléotide (glycosyl-nucléotides), sont les blocs de construction élémentaires de la glycosylation. Ils sont soit importés dans la cellule, soit créés par la transformation enzymatique du glucose circulant, soit récupérés à partir de glycannes préexistants qui sont dégradés. La quantité de monosaccharides disponible pour les réactions de glycosylation dépend donc de très nombreux facteurs. L'organisation spatio-temporelle des différents acteurs de la glycosylation est également cruciale [10, 11] (Figure 1B). Il est donc aisé de comprendre la nécessité d'une même localisation subcellulaire de l'enzyme, de son substrat accepteur (protéines et/ou lipides) et de son substrat donneur (glycosyl-nucléotides).

Les mécanismes moléculaires qui président à cette localisation subcellulaire précise sont loin d'être compris et identifiés. Néanmoins, l'importance du trafic intravésiculaire golgien dans la régulation de la glycosylation a été mise en évidence, il y a une dizaine d'années, grâce à l'identification de mutations affectant les gènes codant les composants du complexe COG (*conserved oligomeric Golgi*) [12-14],

un complexe multiprotéique impliqué dans l'adressage et la fusion de vésicules golgiennes contenant préférentiellement des enzymes participant au processus de glycosylation. L'altération de ce processus affecte la localisation ainsi que la stabilité des acteurs primaires de la glycosylation (glycosyltransférases, transporteurs), et conduit à des anomalies de structure des chaînes glycaniques [15, 16].

La localisation subcellulaire de certaines enzymes de glycosylation peut également être contrôlée par certaines voies de signalisation. C'est le cas, en particulier, des peptidyl-GalNAc-transférases (ppGalNAcT), dont 20 isoformes ont été décrites chez l'homme, qui catalysent la première étape de la O-glycosylation en transférant les résidus de N-acétylgalactosamine (GalNAc) sur la protéine acceptrice. En effet, un processus piloté par la kinase Src (une tyrosine kinase associée à la membrane et activée par de multiples récepteurs) et régulé négativement par ERK8 (*extracellular signal-regulated kinase 8*) permet la relocalisation des ppGalNAcT de l'appareil de Golgi vers le RE afin que ces dernières soient efficaces [17]. Dans certains cancers (poumon, sein), l'expression d'ERK8 est réduite, diminuant les capacités de relocalisation des enzymes, ce qui affecte directement la quantité de structures O-glycaniques produites [18].

Outre la localisation subcellulaire des enzymes, celle de certains substrats n'en est pas moins essentielle. La réaction de N-glycosylation nécessite le *flip-flop* (passage d'un feuillet membranaire à l'autre) du précurseur glycanique de la face cytoplasmique de la membrane du RE vers sa face luminale. De ce processus dépendra l'efficacité de la N-glycosylation. Ce mécanisme de *flip-flop* est également essentiel à la synthèse des glycolipides avec le transfert du glucosylcéramide (GlcCer), dont la synthèse, commencée du côté cytoplasmique, se poursuit sur la face luminale de l'appareil de Golgi [19].

Ces quelques exemples illustrent l'importance d'un maintien de la localisation subcellulaire et de la topographie de certains acteurs dans le processus de glycosylation. La structure de l'appareil de Golgi, ainsi que la composition lipidique de ses membranes, est un élément important du processus de glycosylation. Les membranes des saccules cis et médian sont principalement composées de lipides insaturés, électriquement neutres. Celles des saccules trans et du réseau trans-Golgi sont riches en lipides saturés, chargés négativement [20]. Le gradient de charges qui s'établit entre saccules permettrait une partition des enzymes de glycosylation dans chacun d'entre eux, selon un ratio spécifique en glycérophospholipides et en sphingolipides [21].

² Les glyco-phosphatidyl-inositol (GPI) correspondent à l'association d'une phospho-éthanol-amine à des sucres, eux-mêmes ancrés sur un phosphatidyl-inositol. Les protéines à ancre GPI sont présentes sur la face extracellulaire de la membrane.

Un niveau supplémentaire de complexité est constitué par la régulation de certains éléments qui vont activer ou inhiber l'activité des glycosyltransférases ou de certains transporteurs. La glycosylation étant une suite de réactions enzymatiques, l'environnement ionique de chaque saccule est en effet un élément clé pour l'élaboration d'une structure glycanne correcte. Chaque enzyme agit à un pH optimal qui est régulé au niveau des différents saccules par l'action de pompes et de transporteurs [22]. La plupart des enzymes de glycosylation nécessitent également un cofacteur enzymatique ionique, le plus souvent Ca^{2+} et Mn^{2+} . La modulation et le maintien de ces gradients ioniques dans la voie de sécrétion golgienne sont donc primordiaux pour la glycosylation [23] (Figure 1B). La compréhension des mécanismes impliqués dans la production de ces gradients et permettant leur maintien reste très fragmentaire.

Glycosylation et maladies

Des altérations de glycosylation sont associées et impliquées dans le développement de multiples maladies humaines. Ces anomalies peuvent concerner tous les types de glycosylation, en particulier la biosynthèse des O- et des N-glycoprotéines, mais aussi le métabolisme des glycolipides ou des protéoglycannes, la O-GlcNAcylation et la O-mannosylation. Nous nous intéresserons ici particulièrement aux altérations de glycosylation associées aux cancers. Nous examinerons les modifications, décrites dans de nombreux types de cancers, de la O-glycosylation des mucines, leurs origines et leurs conséquences sur la biologie des cellules cancéreuses. Nous présenterons enfin les connaissances actuelles sur l'expression et les rôles des gangliosides, des sphingoglycolipides sialylés, dans les cancers d'origine neuroectodermique.

Les O-glycannes tronqués dans les cancers

Les mécanismes responsables de la surexpression de O-glycannes tronqués (ou immatures), impliqués dans le développement des cancers, sont multiples et relativement bien décrits. Ils illustrent les différents niveaux de régulation de la glycosylation golgienne et réticulaire.

Dans les cellules cancéreuses, l'activation de voies de glycosylation aberrantes est à l'origine d'une surexpression de O-glycannes tronqués, tels que les antigènes onco-fœtaux de Thomsen-Freidenreich, antigènes Tn (GalNAc- α -O-Ser/Thr) et sialyl-Tn (STn), au détriment de structures plus complexes dérivées des Cores 1 et 2 des mucines³ (Figure 2). Le STn est constitué d'un résidu d'acide sialique lié en $\alpha 2,6$ à la structure GalNAc- α -O-Ser/Thr de l'antigène Tn. Cet acide sialique empêche l'action des glycosyltransférases responsables de la synthèse des Cores 1 et 2 classiquement associés aux mucines, limitant leur assemblage. Depuis plus de trente ans, les O-glycannes Tn et STn sont considérés comme des antigènes glucidiques associés aux tumeurs (ou AGAT, présents dans de nombreux types de cancers d'origine épithéliale, tels que les cancers de l'estomac, du côlon, du sein, du poumon, de la prostate, du pancréas ou

de l'endomètre (voir la revue de Jennifer Munkley [24]). *In vitro*, l'expression de l'antigène STn par les cellules de plusieurs lignées cellulaires cancéreuses diminue leur adhérence et augmente leur capacité de migration [25]. Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), la délétion du gène codant une ppGalNAcT dans l'aile de l'insecte induit, lors de son développement, une perte d'adhérence entre les feuillettes épithéliales, ce qui souligne l'importance des O-glycannes dans les interactions intercellulaires [26]. Les modifications d'adhérence entre cellules, et entre cellules et matrice extracellulaire, induites par l'augmentation de l'expression des antigènes Tn et STn pourraient faciliter la migration des cellules et la formation de métastases *in vivo*. Cela pourrait expliquer le mauvais pronostic souvent associé, chez les patients atteints de cancers, à des niveaux élevés d'expression de O-glycannes tronqués par les cellules [27].

La biosynthèse des antigènes Tn et STn et leur surexpression dans les cellules cancéreuses sont contrôlées à plusieurs niveaux. Leur synthèse est tout d'abord liée à la régulation de l'expression de glycosyltransférases, notamment les ppGalNAcT et l' $\alpha 2,6$ -sialyltransférase ST6GalNAc-I qui ajoute l'acide sialique à l'antigène Tn. Leur surexpression est également associée à des mutations du gène *COSMC* qui code une protéine chaperone (*C1GALT1-specific chaperone 1* aussi appelée *Core 1 beta3-galactosyltransferase-specific molecular chaperone*) nécessaire à l'activité de la Core 1 synthétase [28]. La surexpression des antigènes Tn et STn peut également être induite par l'activation d'une voie spécifique aux ppGalNAcT, appelée voie GALA (*GALNT activation*), à l'origine d'une relocalisation de ces transférases, normalement présentes dans l'appareil de Golgi, vers le RE, modifiant ainsi leur activité et donc la biosynthèse des antigènes Tn et STn [18].

Chez l'homme, de multiples isoformes de ppGalNAcT aux activités partiellement redondantes, ou au contraire très spécifiques, sont impliquées dans l'étape initiale de la O-glycosylation. Au cours du développement et lors de la différenciation tissu- ou cellule-spécifique, l'expression de ces enzymes est régulée au niveau de la transcription par des facteurs de transcription tissu-spécifiques, des micro-ARN, etc. [29]. Elle est fréquemment modifiée dans les cellules et les tissus cancéreux avec, par exemple, dans les stades avancés de cancer colorectal, une surexpression de la ppGalNAcT-4, associée à l'augmentation des propriétés invasives et migratoires des cellules [30]. La sialyltransférase ST6GalNAc-I est la sialyltransférase majoritairement impliquée dans la biosynthèse de l'antigène STn [31]. Son expression est faible dans les tissus gastriques sains, mais elle augmente dans les métaplasies intestinales et les tumeurs. Dans les

³ Les Cores des O-glycannes de mucines sont classés en 8 groupes (cores 1 à 8) selon leur composition en monosaccharides et la nature des liaisons entre eux.

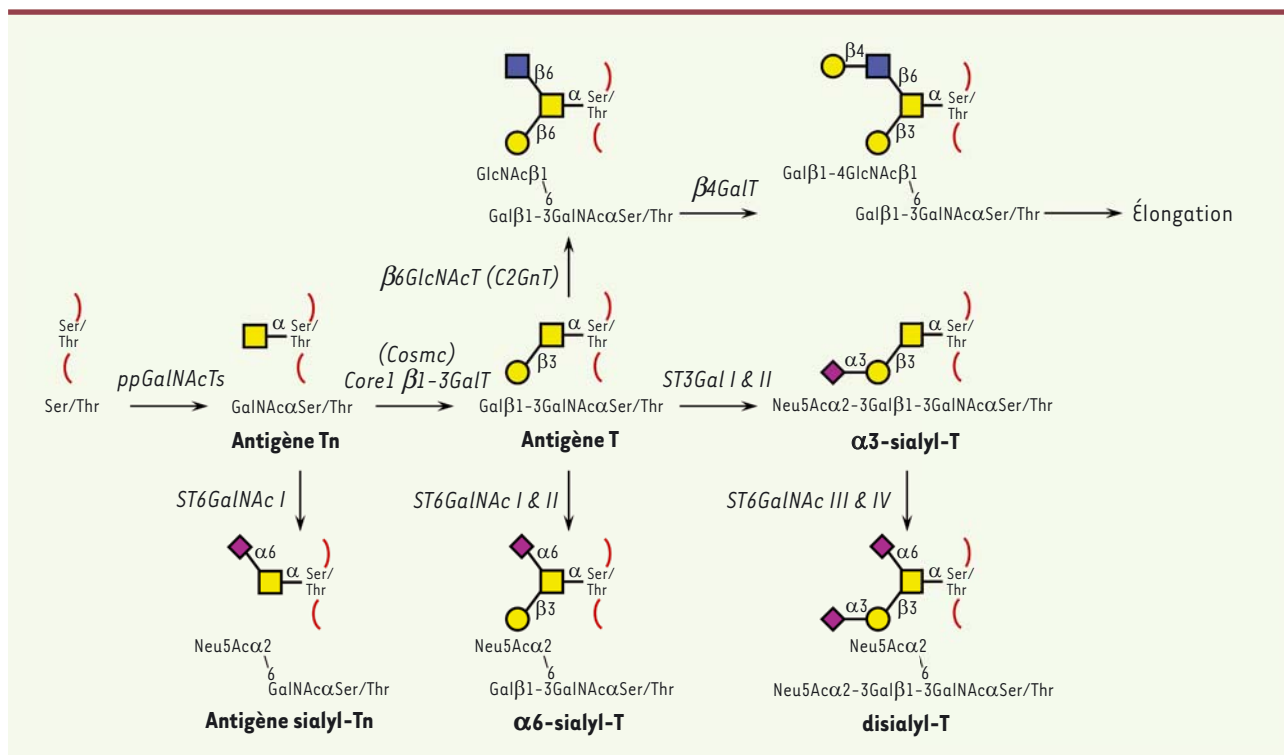


Figure 2. Biosynthèse et structure des O-glycannes tronqués, surexprimés dans les cancers d'origine épithéliale. Les glycosyltransférases impliquées dans les différentes étapes de la biosynthèse sont indiquées en italique au-dessus des flèches. Les antigènes glucidiques Tn, STn, T, et leurs dérivés sialylés sont représentés. L'antigène T correspond au Core (noyau) de type 1 des chaînes O-glycanniques, Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr, et peut être converti en Core 2 Gal β 1-3[GlcNAc β 1-6]GalNAc-Ser/Thr par la Core 2 β 1,6-N-acétylglucosaminyltransférase. Les symboles utilisés pour les différents monosaccharides proviennent de la nomenclature du Consortium de glycomique fonctionnelle [65]. β 3Gal-T : β 1,3-galactosyltransférase ; β 4Gal-T : β 1,4-galactosyltransférase ; β 6GlcNAc-T : β 1,6-N-acétylglucosaminyltransférase (Core2GnT) ; Core1 β 1,3Gal-T : Core 1 β 1,3-galactosyltransférase ; C2GnT : Core 2 β 1,6-N-acétylglucosaminyltransférase ; Cosmc : chaperonne moléculaire Cosmc (C1GALT1C1) ; ppGalNAcT : polypeptide N-acétylgalactosaminyltransférase ; ST3Gal : α 2,3-sialyltransférase ; ST6GalNAc : GalNAc α 2,6-sialyltransférase.

cellules, cette transférase est co-localisée avec l'antigène STn, ce qui souligne son importance dans l'expression de cet AGAT dans les tissus gastro-intestinaux [32].

Un autre niveau de régulation de l'expression de la biosynthèse des antigènes Tn et STn dans les cancers est lié à des mutations du gène *COSMC* qui code une chaperonne moléculaire nécessaire à l'activité de la Core 1 synthétase (également appelée T synthétase) [33]. Les cellules de multiples lignées cellulaires et différents tissus cancéreux expriment à la fois les antigènes Tn et STn, du fait de mutations affectant le gène *COSMC* et induisant une perte de fonction de la Core 1 synthétase [34]. L'augmentation de l'expression des antigènes Tn et STn dans les cellules cancéreuses peut également être liée à des modifications de trafic intracellulaire, induisant une perturbation de la localisation précise des ppGalNAcT.

L'activation du proto-oncogène Src stimule le trafic intracellulaire rétrograde des ppGalNAcT de l'appareil de Golgi vers le RE, qui est associé à une forte augmentation des niveaux d'expression intracellulaire de l'antigène Tn [35]. Cette relocalisation, la GALA (*GALNT activation*), qui n'affecte que les ppGalNAcT, et non les autres glycosyltransférases, dépend de la machinerie de trafic intracellulaire

COPI (*coat protein complex I*). Les vésicules COPI sont impliquées dans le trafic intra-golgien et dans le trafic de l'appareil de Golgi vers le RE. La modification de localisation intracellulaire des ppGalNAcT-1 et -2 dans le RE serait un des mécanismes majeurs responsable de l'augmentation d'expression de l'antigène Tn dans les tumeurs du sein et du foie [17].

Des premiers essais d'immunothérapie ciblant l'antigène STn menés dans les années 2000 avec le Theratope® (STn-KLH), un vaccin synthétique associant l'antigène STn à l'hémocyanine de patelle (KLH), n'ont malheureusement pas donné les résultats escomptés [36]. Depuis, des anticorps monoclonaux humanisés anti-STn ont été développés et ont montré leur efficacité dans le carcinome ovarien [37]. Parallèlement, des stratégies fondées sur l'utilisation de *CAR-T cells*, des lymphocytes T humains exprimant un récepteur chimérique dont le domaine extracellulaire est constitué d'un fragment d'anticorps (*single chain Fv*, ScFv) ciblant l'antigène STn, sont en cours de développement [38].

Les gangliosides dans les cancers d'origine neuro-ectodermique

La biosynthèse et la structure des glycosphingolipides (GSL)⁴ peuvent être modifiées dans nombre de maladies humaines, incluant les cancers, les maladies inflammatoires et les maladies auto-immunes. Nous nous focaliserons ici sur l'expression des gangliosides⁵ dans les cancers d'origine neuro-ectodermique.

Les gangliosides sont des glycolipides porteurs d'un ou plusieurs résidus d'acide sialique. Ils sont synthétisés dans l'appareil de Golgi par des glycosyltransférases spécifiques qui transfèrent de manière séquentielle différents monosaccharides sur un céramide, constitué d'une base sphingoïde et d'un acide gras. La biosynthèse débute par le transfert sur le céramide d'un premier résidu de glucose (Glc) pour former le GlcCer, suivi par le transfert d'un résidu de galactose (Gal) lié en β 1,4 au glucose pour former le lactosylcéramide (LacCer ou Gal β 1,4GlcCer). Le LacCer est ensuite substitué par un ou plusieurs résidus d'acide sialique transférés par des sialyltransférases spécifiques (monosialo-ganglioside [GM3]⁶ synthétase, disialoganglioside [GD3] synthétase, trisialoganglioside [GT3] synthétase) pour former le GM3, le GD3 ou le GT3. En fonction du nombre de résidus d'acide sialique (0, 1, 2 ou 3) liés au LacCer, les gangliosides sont classés en quatre séries (0-, a-, b- et c-). Ces précurseurs peuvent eux-mêmes être substitués par d'autres monosaccharides (GalNAc, Gal, acide sialique), générant une grande diversité de structures [39]. En règle générale, les tissus sains adultes n'expriment que des gangliosides simples des séries 0- et a-, présentant aucun ou 1 acide sialique. Les gangliosides complexes qui présentent au moins 2 résidus d'acide sialique sur le LacCer ne sont exprimés qu'au cours de l'embryogenèse, et dans le système nerveux de l'adulte sain. Comme les autres glycosphingolipides, les gangliosides sont présents au sein des radeaux lipidiques de la membrane plasmique des cellules, où ils interagissent avec diverses protéines membranaires, formant alors des structures dynamiques, véritables plateformes de signalisation régulant de multiples fonctions cellulaires. Ils interagissent notamment avec les récepteurs de facteurs de croissance, contrôlant ainsi la prolifération et la signalisation cellulaires [40]. Ils interviennent également dans l'adhérence, la migration, ou l'apoptose. De nombreuses études ont montré leur implication dans le développement et la plasticité du système nerveux où ils sont exprimés à des taux élevés [41].

Les gangliosides complexes sont ré-exprimés par les cellules tumorales dans des cancers d'origine neuro-ectodermique, à la suite de l'augmentation d'expression de la GD3 synthétase (GD3S). Le GD3, de même que le GD2, sont ainsi reconnus comme marqueurs oncofœtaux du mélanome, du neuroblastome ou du cancer du poumon à petites cellules, dans lesquels ils jouent un rôle important [42, 43]. Ces gangliosides constituent donc des cibles de choix pour le traitement de ces cancers. Ainsi, l'inhibition de l'expression du GD3 dans des cel-

lules de neuroblastome permet de réduire la migration cellulaire et le potentiel métastatique de ces tumeurs [44]. Le dinutuximab (Unitixin™), un anticorps thérapeutique dirigé contre le GD2, a obtenu l'agrément de la FDA (*food and drug administration*) américaine et de l'agence européenne des médicaments en 2015 pour le traitement du neuroblastome de haut risque, en combinaison avec le *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), l'interleukine-2 (IL-2) et l'acide rétinoïque (*retinoic acid*, RA) [45]. Il a été retiré du marché européen en 2017. Un anticorps similaire, le dinutuximab bêta (Qarziba®), mais produit dans des cellules différentes, a reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) européenne en 2017 et est utilisé en monothérapie, en seconde ligne. Du fait de l'expression du GD2 sur les fibres nerveuses, notamment sensorielles, et des douleurs que ces anticorps induisent, leur utilisation reste problématique et nécessite l'utilisation conjointe de puissants antalgiques comme la morphine. Les effets biologiques des gangliosides complexes sur la cellule tumorale et les mécanismes par lesquels ils augmentent l'agressivité tumorale restent néanmoins largement à explorer. Pour le GD2, il a cependant été montré que son expression par les cellules de cancer du sein triple-négatif⁷ conduisait à une activation constitutive du récepteur c-Met (récepteur du facteur de croissance des hépatocytes) et des voies de signalisation PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/AKT (protéine kinase B) et ERK (*extracellular signal-regulated kinases*)/MAPK (*mitogen-activated protein kinases*), induisant la prolifération des cellules et une augmentation de la tumorigenèse [46-48]. Plusieurs études ont également révélé, dans les cellules de cancer du sein ER-négatif⁸, une expression plus importante de ces gangliosides complexes, sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires, notamment du TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*), et de l'activation de la voie NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) à l'origine de la transcription du gène *ST8SIA1* qui code la GD3S (CMP-Neu5Ac: GD3 α -2,8-sialyltransférase) [49]. Ces travaux ont par ailleurs mis en évidence l'effet répresseur de l'œstradiol, par sa capacité d'inhiber la translocation nucléaire du facteur NF- κ B, sur l'expression du gène *ST8SIA1* et sur l'activité de sa région promotrice dans ces cellules. Ces résultats ont ainsi permis de comprendre l'origine de l'augmentation d'expression de la GD3S observée dans les tumeurs du sein ER-négatives et dans le sous-type triple-négatif « *basal-like* »⁹. La région

⁴ Les glycosphingolipides ont pour tête polaire un groupement glucidique. Ils sont représentés par les cérébrosides, les sulfatides et les gangliosides.

⁵ Les gangliosides sont des glycosphingolipides formés de céramides hydrophobes couplés à des oligosaccharides sialylés hydrophiles.

⁶ G pour ganglioside, M pour mono, 3 indiquant l'ordre de migration en chromatographie sur couche mince dans le solvant chloroforme : méthanol : 15 mM CaCl₂, 60:40:9 (v/v/v).

⁷ Ne présentant aucun récepteur des œstrogènes et de la progestérone, ni de récepteurs HER-2/neu (*human epidermal growth factor receptor-2/neu*).

⁸ Ne possédant pas de récepteurs des œstrogènes.

⁹ Le terme « *basal-like* » se rapporte à l'origine cellulaire du cancer. Les cellules de ce cancer ressemblent aux cellules basales des canaux galactophores (canaux qui apportent le lait dans le mamelon), par opposition aux cellules lumorales. Tous les cancers de type *basal-like* sont triple-négatifs.

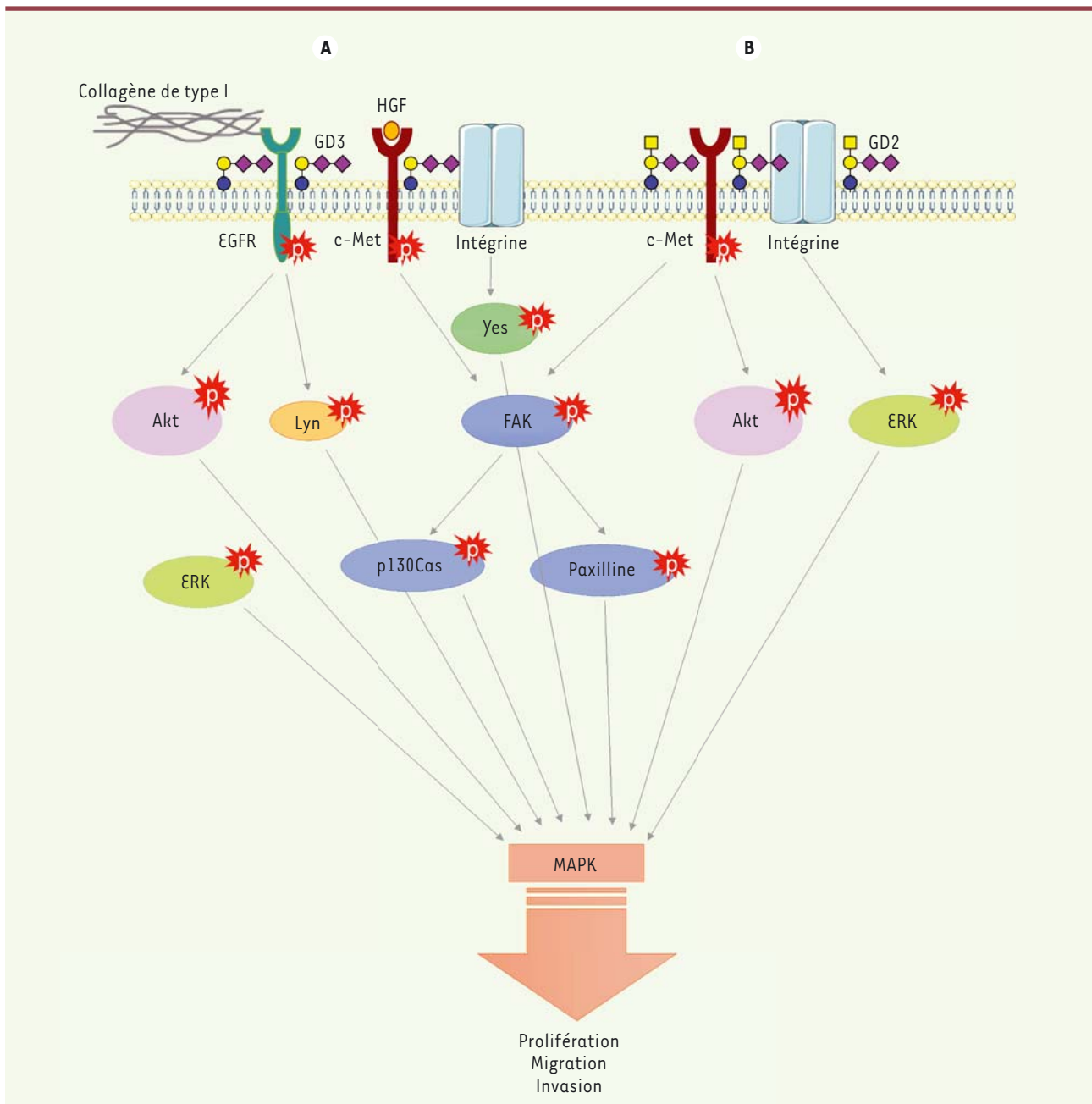


Figure 3. Activation de la voie des MAP kinases (MAPK) par les disialogangliosides GD2 et GD3. **A.** Activation de la voie de signalisation des MAP kinases par le complexe c-Met, EGFR (*epidermal growth factor receptor*) et collagène de type I. **B.** Activation constitutive du récepteur c-Met par le GD2 et les intégrines, induisant l'activation de la voie de signalisation des MAP kinases.

promotrice contrôlant l'expression du gène *ST8SIA1* a également été étudiée dans les cellules de différentes lignées cancéreuses. Ces études ont permis de révéler le rôle essentiel des facteurs de transcription AREB6 (ou ZEB1, *zinc finger E-box binding homeobox 1*) et Elk-1 (*ETS-like gene 1*) dans la surexpression de la GD3S dans les cellules de glioblastome [50]. Il en a été de même pour le facteur NF- κ B dans les cellules de mélanome [51]. Le GD3, comme le GD2, peut activer le récepteur c-Met dans les cellules de mélanome. Dans la lignée de cellules de mélanome SK-MEL-28 qui surexpriment la GD3S, c-Met est activé par son ligand, l'HGF (*hepa-*

toocyte growth factor) et par le collagène de type I. Cette co-activation de c-Met par le complexe GD3-HGF-collagène de type I stimule les voies de signalisation PI3K/Akt et MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*)/ERK, induisant la prolifération des cellules et favorisant leur capacité d'invasion [52]. Parallèlement, la surexpression du GD3 dans ces cellules augmente la phosphorylation de certaines molécules adaptatrices, telles que la kinase FAK (*focal adhesion kinase*) ou la paxilline [53]. Dans

les cellules de mélanome, l'expression de GD3 et de GD2 induit le regroupement d'intégrines¹⁰ à leur membrane, provoquant un signal à l'origine de la phosphorylation de FAK, de la paxilline et de Yes, des kinases dont l'activation favorise la motilité, la prolifération et l'invasion cellulaires [54-56]. En particulier, le GD2 forme un complexe trimérique avec l'intégrine $\beta 1$ et FAK, ce qui active la voie des MAP kinases [57]. Dans le cas de l'ostéosarcome, l'expression de GD2 et de GD3 est corrélée à une augmentation des signaux d'invasion et de motilité cellulaires, sans modification de la prolifération. Dans ces cellules qui surexpriment la GD3S, la phosphorylation des kinases de la famille Src, notamment FAK et Lyn, induit l'activation de la paxilline [58] qui joue un rôle clé dans la formation des jonctions entre matrice extracellulaire et cytosquelette [59]. Le GD3 et le GD2 favorisent donc la prolifération, la motilité et l'invasion des tumeurs d'origine neuro-ectodermique, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Figure 3).

Actuellement, les recherches convergent sur les formes O-acétylées du GD2. Les résidus d'acide sialique présents sur le GD2 peuvent être O-acétylés (substitution de la fonction alcool en position 7 ou 9 de l'acide sialique par un groupement acétyle [-CO-CH₃]) [60]. Ces formes O-acétylées, absentes des tissus sains, notamment du système nerveux périphérique, sont retrouvées dans certains tissus tumoraux. L'anticorps monoclonal chimérique c.8B6 dirigé contre le O-acétyl-GD2 (OAcGD2) a ainsi prouvé son efficacité dans le traitement du neuroblastome, sans effets secondaires tels que ceux induits par les anticorps comme le dinutuximab ou le dinutuximab bêta, dirigés contre le GD2 non acétylé [61]. Les voies responsables de la O-acétylation des résidus d'acide sialique restent mal connues. Actuellement, la protéine CASD1 (*CAS1 domain-containing protein 1*), localisée dans la membrane de l'appareil de Golgi, est la seule sialyl-O-acétyl-transférase identifiée chez l'homme [62]. Elle participe à la O-acétylation des acides sialiques dans des cellules HAP1¹¹, en particulier au cours de la biosynthèse du GD3 O-acétylé. Néanmoins, le rôle de CASD1 dans la biosynthèse du GD2 O-acétylé, cible thérapeutique potentielle dans les cancers d'origine neuro-ectodermique, reste à établir [63].

Conclusion

L'étude des mécanismes de régulation de la glycosylation a permis des avancées notables dans la compréhension de la biosynthèse et des rôles biologiques des glycoconjugués associés aux maladies. Ces avancées ont ainsi conduit au développement de nouvelles approches thérapeutiques, notamment l'utilisation du dinutuximab bêta pour le traitement du neuroblastome ou le développement de cellules CAR-T ciblant l'antigène STn. Néanmoins, de nombreux aspects de cette régulation restent encore mal compris, en particulier la modulation

physiopathologique de l'expression des glycosyltransférases, l'organisation supramoléculaire de ces enzymes dans l'appareil de Golgi, ainsi que les rôles biologiques respectifs et les substrats spécifiques de glycosyltransférases dont l'activité est parfois redondante. \diamond

SUMMARY

Reticular and Golgi glycosylation: Advances and associated diseases

Glycosylation is one of the essential modifications of proteins and lipids. It is carried out mainly in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, and requires a specific molecular machinery associating several hundreds of glycosyltransferases, glycosidases, transporters and regulating proteins. Modifications of glycosylation are found in numerous diseases, notably in cancers. All types of glycosylation can be affected and this leads to dysfunctions of cellular metabolism. In this review, we present the current knowledge on the regulation of glycosylation mechanisms and illustrate how the alteration of these regulatory mechanisms can lead to abnormal protein and lipid glycosylation, and take part in the development of cancers. \diamond

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

- Nothaft H, Szymanski CM. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nat Rev Microbiol* 2010 ; 8 : 765-78.
- Aebi M. N-linked protein glycosylation in the ER. *Biochim Biophys Acta* 2013 ; 1833 : 2430-7.
- Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 2017 ; 27 : 3-49.
- Gagneux P, Aebi M, Varki A. Evolution of glycan diversity. In: Varki A, et al., eds. *Essentials of glycobiology*, 3rd ed, chapter 20. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.
- Krištić J, Zoldoš V, Lauc G. Complex genetics of protein N-glycosylation. In: Endo T, et al., eds. *Glycoscience: biology and medicine*. Tokyo : Springer, 2014 : 1-7.
- Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012 ; 13 : 448-62.
- Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, et al. (eds). *Handbook of glycosyltransferases and related genes*. Tokyo : Springer, 2014 : 1-477.
- Ruddock LW, Molinari M. N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci* 2006 ; 119 : 4373-80.
- Xu C, Ng DTW. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015 ; 16 : 742-52.
- Foulquier F. COG defects, birth and rise! *Biochim Biophys Acta* 2009 ; 1792 : 896-902.
- Reynders E, Foulquier F, Annaert W, et al. How Golgi glycosylation meets and needs trafficking: the case of the COG complex. *Glycobiology* 2011 ; 21 : 853-63.
- D'Souza Z, Taher FS, Lupashin VV. Golgi inCOGnito: from vesicle tethering to human disease. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2020 ; 1864 : 129694.
- Wu X, Steet RA, Bohorov O, et al. Mutation of the COG complex subunit gene COG7 causes a lethal congenital disorder. *Nat Med* 2004 ; 10 : 518-23.
- Foulquier F, Ungar D, Reynders E, et al. A new inborn error of glycosylation due to a Cog8 deficiency reveals a critical role for the Cog1-Cog8 interaction in COG complex formation. *Hum Mol Genet* 2007 ; 16 : 717-30.
- Linders PTA, Peters E, Ter Beest M, et al. Sugary logistics gone wrong: membrane trafficking and congenital disorders of glycosylation. *Int J Mol Sci* 2020 ; 21 : 4654.

¹⁰ Les intégrines ont une implication majeure dans le contrôle de différentes fonctions cellulaires, incluant la prolifération, la différenciation, la migration et l'expression de certains gènes. Elles sont formées d'un hétérodimère constitué de deux sous-unités α et β . La sous-unité $\beta 1$ s'associe aux sous-unités $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ pour constituer les intégrines $\alpha 1\beta 1$ ou $\alpha 2\beta 1$.

¹¹ Les cellules HAP1 sont des cellules fibroblastiques isolées de cellules leucémiques humaines. Elles sont presque haploïdes, n'ayant qu'une seule copie de tous les chromosomes hormis un fragment hétérozygote de 30 mégabases du chromosome 15.

RÉFÉRENCES

16. Peanre R, Legrand D, Duvet S, et al. Differential effects of lobe A and lobe B of the conserved oligomeric Golgi complex on the stability of β 1,4-galactosyltransferase 1 and α 2,6-sialyltransferase 1. *Glycobiology* 2011 ; 21 : 864-76.
17. Chia J, Tay F, Bard F. The GalNAc-T Activation (GALA) pathway: drivers and markers. *PLoS One* 2019 ; 14 : e0214118.
18. Chia J, Goh G, Bard F. Short O-GalNAc glycans: regulation and role in tumor development and clinical perspectives. *Biochim Biophys Acta* 2016 ; 1860 : 1623-39.
19. Chalal M, Menon I, Turan Z, et al. Reconstitution of glucosylceramide flip-flop across endoplasmic reticulum: implications for mechanism of glycosphingolipid biosynthesis. *J Biol Chem* 2012 ; 287 : 15523-32.
20. Bigay J, Antony B. Curvature, lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity. *Dev Cell* 2012 ; 23 : 886-95.
21. Patterson GH, Hirschberg K, Polishchuk RS, et al. Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. *Cell* 2008 ; 133 : 1055-67.
22. Kellokumpu S. Golgi pH, ion and redox homeostasis: how much do they really matter? *Front Cell Dev Biol* 2019 ; 7 : 93.
23. Foulquier F, Legrand D. Biometals and glycosylation in humans: congenital disorders of glycosylation shed lights into the crucial role of Golgi manganese homeostasis. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 2020 ; 1864 : 129674.
24. Munkley J. The role of Sialyl-Tn in cancer. *Int J Mol Sci* 2016 ; 17 : 275.
25. Julien S, Lagadec C, Krzewinski-Recchi MA, et al. Stable expression of sialyl-Tn antigen in T47-D cells induces a decrease of cell adhesion and an increase of cell migration. *Breast Cancer Res Treat* 2005 ; 90 : 77-84.
26. Zhang L, Zhang Y, Ten Hagen KG. A mucin-type O-glycosyltransferase modulates cell adhesion during *Drosophila* development. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 34076-86.
27. Victorzon M, Lundin J, Haglund C, et al. A risk score for predicting outcome in patients with gastric cancer, based on stage, sialyl-Tn immunoreactivity and ploidy - a multivariate analysis. *Int J Cancer* 1996 ; 67 : 190-3.
28. Ju T, Aryal RP, Kudelka MR, et al. The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer. *Cancer Biomark* 2014 ; 14 : 63-81.
29. Bennett EP, Mandel U, Clausen H, et al. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* 2012 ; 22 : 736-56.
30. Yan X, Lu J, Zou X, et al. The polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4 exhibits stage-dependent expression in colorectal cancer and affects tumorigenesis, invasion and differentiation. *FEBS J* 2018 ; 285 : 3041-55.
31. Sewell R, Bäckström M, Dalziel M, et al. The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 3586-94.
32. Marcos N, Bennett EP, Gomes J, et al. ST6GalNAc-I controls expression of sialyl-Tn antigen in gastrointestinal tissues. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011 ; 3 : 1443-55.
33. Ju T, Aryal RP, Stowell CJ, et al. Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum-localized molecular chaperone Cosmc. *J Cell Biol* 2008 ; 182 : 531-42.
34. Ju T, Lanneau GS, Gautam T, et al. Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc. *Cancer Res* 2008 ; 68 : 1636-46.
35. Gill DJ, Chia J, Senewiratne J, et al. Regulation of O-glycosylation through Golgi-to-ER relocation of initiation enzymes. *J Cell Biol* 2010 ; 189 : 843-58.
36. Julien S, Videira PA, Delannoy P. Sialyl-Tn in cancer: (how) did we miss the target? *Biomolecules* 2012 ; 2 : 435-66.
37. Eavarone DA, Al-Alem L, Lugovskoy A, et al. Humanized anti-Sialyl-Tn antibodies for the treatment of ovarian carcinoma. *PLoS One* 2018 ; 13 : e0201314.
38. Loureiro LR, Feldmann A, Bergmann R, et al. Extended half-life target module for sustainable UniCAR T-cell treatment of STn-expressing cancers. *J Exp Clin Cancer Res* 2020 ; 39 : 77.
39. Groux-Degroote S, Guérardel Y, Delannoy P. Gangliosides: structures, biosynthesis, analysis, and roles in cancer. *ChemBiochem* 2017 ; 18 : 1146-54.
40. Julien S, Bobowski M, Steenackers A, et al. How do gangliosides regulate RTKs signaling? *Cells* 2013 ; 2 : 751-67.
41. Skaper SD, Leon A, Toffano G. Ganglioside function in the development and repair of the nervous system. From basic science to clinical application. *Mol Neurobiol Fall* 1989 ; 3 : 173-99.
42. Yoshida S, Fukumoto S, Kawaguchi H, et al. Ganglioside GD2 in small cell lung cancer cell lines: enhancement of cell proliferation and mediation of apoptosis. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 4244-52.
43. Furukawa K, Hamamura K, Aixinjueluo W. Biosignals modulated by tumor-associated carbohydrate antigens: novel targets for cancer therapy. *Ann NY Acad Sci* 2006 ; 1086 : 185-98.
44. Zeng G, Gao L, Yu RK. Reduced cell migration, tumor growth and experimental metastasis of rat F-11 cells whose expression of GD3-synthase is suppressed. *Int J Cancer* 2000 ; 88 : 53-7.
45. ODHillon S. Dinutuximab: first global approval. *Drugs* 2015 ; 75 : 923-7.
46. Cazet A, Groux-Degroote S, Catiéau-Teylaert B, et al. GD3 synthase over-expression enhances proliferation and migration of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol Chem* 2009 ; 390 : 601-9.
47. Cazet A, Lefebvre J, Adriaenssens E, et al. GD3 synthase expression enhances proliferation and tumor growth of MDA-MB-231 breast cancer cells through c-Met activation. *Mol Cancer Res* 2010 ; 8 : 1526-35.
48. Cazet A, Bobowski M, Rombouts Y, et al. The ganglioside GD2 induces the constitutive activation of c-Met in MDA-MB-231 breast cancer cells expressing the GD3 synthase. *Glycobiology* 2012 ; 22 : 806-16.
49. Bobowski M, Vincent A, Steenackers A, et al. Estradiol represses the GD3 synthase gene *ST8SIA1* expression in human breast cancer cells by preventing NF κ B binding to *ST8SIA1* promoter. *PLoS One* 2013 ; 8 : e62559.
50. Dae HM, Kwon HY, Kang NY, et al. Isolation and functional analysis of the human glioblastoma-specific promoter region of the human GD3 synthase (*hST8Sia1*) gene. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009 ; 41 : 237-45.
51. Kang NY, Kim CH, Kim KS, et al. Expression of the human CMP-NeuAc: GM3 α 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) gene through the NF- κ B activation in human melanoma SK-MEL-2 cells. *Biochim Biophys Acta* ; 1769 : 622-30.
52. Furukawa K, Kambe M, Miyata M, et al. Ganglioside GD3 induces convergence and synergism of adhesion and hepatocyte growth factor/Met signals in melanomas. *Cancer Sci* 2014 ; 105 : 52-63.
53. Hamamura K, Furukawa K, Hayashi T, et al. Ganglioside GD3 promotes cell growth and invasion through p130Cas and paxillin in malignant melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 11041-6.
54. Ohkawa Y, Miyazaki S, Miyata M, et al. Essential roles of integrin-mediated signaling for the enhancement of malignant properties of melanomas based on the expression of GD3. *Biochem Biophys Res Commun* 2008 ; 373 : 14-9.
55. Ohkawa Y, Miyazaki S, Hamamura K, et al. Ganglioside GD3 enhances adhesion signals and augments malignant properties of melanoma cells by recruiting integrins to glycolipid-enriched microdomains. *J Biol Chem* 2010 ; 285 : 27213-23.
56. Hamamura K, Tsuji M, Hotta H, et al. Functional activation of Src family kinase Yes protein is essential for the enhanced malignant properties of human melanoma cells expressing ganglioside GD3. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 18526-37.
57. Aixinjueluo W, Furukawa K, Zhang Q, et al. Mechanisms for the apoptosis of small cell lung cancer cells induced by anti-GD2 monoclonal antibodies: roles of anoikis. *J Biol Chem* 2005 ; 280 : 29828-36.
58. Shibuya H, Hamamura K, Hotta H, et al. Enhancement of malignant properties of human osteosarcoma cells with disialyl gangliosides GD2/GD3. *Cancer Sci* 2012 ; 103 : 1656-64.
59. Okada M, Itoh Mi MI, Haraguchi M, et al. b-series ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 1633-6.
60. Cavdarli S, Dewald JH, Yamakawa N, et al. Identification of 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid (Neu5,9Ac2) as main O-acetylated sialic acid species of GD2 in breast cancer cells. *Glycoconj J* 2019 ; 36 : 79-90.
61. Terme M, Dorvillius M, Cochonneau D, et al. Chimeric antibody c.8B6 to O-acetyl-GD2 mediates the same efficient anti-neuroblastoma effects as therapeutic ch14.18 antibody to GD2 without antibody induced allodynia. *PLoS One* 2014 ; 9 : e87210.
62. Baumann AM, Bakkers MJ, Buettner FF, et al. 9-O-Acetylation of sialic acids is catalyzed by CASD1 via a covalent acetyl-enzyme intermediate. *Nat Commun* 2015 ; 6 : 7673.
63. Cavdarli S, Delannoy P, Groux-Degroote S. O-acetylated gangliosides as targets for cancer immunotherapy. *Cells* 2020 ; 9 : 741.
64. Neelamegham S, Aoki-Kinoshita K, Bolton E. Updates to the symbol nomenclature for glycans guidelines. *Glycobiology* 2019 ; 29 : 620-4.

TIRÉS À PART

P. Delannoy



**Abonnez-vous
à médecine/sciences**

**Bulletin d'abonnement page 670
dans ce numéro de m/s**

