



HAL
open science

L'héparane sulfate 3-O-sulfotransférase 3A (3-OST3A) : une enzyme de maturation des glycosaminoglycanes en tant que nouveau régulateur tumoral dans le cancer du sein

Caroline Gauche

► **To cite this version:**

Caroline Gauche. L'héparane sulfate 3-O-sulfotransférase 3A (3-OST3A) : une enzyme de maturation des glycosaminoglycanes en tant que nouveau régulateur tumoral dans le cancer du sein. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0187 . tel-01527367

HAL Id: tel-01527367

<https://theses.hal.science/tel-01527367>

Submitted on 24 May 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Caroline GAUCHE**

L'héparane sulfate 3-O-sulfotransférase 3A (3-OST3A) : une enzyme de maturation des glycosaminoglycanes en tant que nouveau régulateur tumoral dans le cancer du sein

Le 2 Décembre 2016

Membres du jury :

Rapporteurs :

Monsieur Fabrice ALLAIN, Professeur des Universités, UMR 8576 CNRS-Université de Lille 1, Lille

Monsieur Hugues LORTAT-JACOB, Directeur de Recherche CNRS, Institut de Biologie Structurale, Grenoble

Examineurs :

Monsieur Jean-Christophe BOURDON, Directeur de Recherche, Division of Cancer Research, Jacqui Wood Cancer Centre, University of Dundee, Dundee

Monsieur Jean-Louis MERLIN, Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-lès- Nancy

Madame Sylvie FOURNEL-GIGLEUX, Directeur de Recherche INSERM, UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Vandœuvre-lès- Nancy (Directeur de thèse)

Madame Sandrine GULBERTI, Maître de Conférences, UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine, Vandœuvre-lès-Nancy (Co-encadrant)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame le Docteur Sylvie-Fournel Gigleux pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et pour avoir dirigé ce travail de thèse. Je la remercie de son implication constante, de sa disponibilité et de ses précieux conseils mais aussi de son exigence qui m'ont fait évoluer positivement. Qu'elle trouve ici toute ma reconnaissance pour la confiance qu'elle m'a accordée et mes sincères remerciements.

Mes remerciements s'adressent également à Madame le Docteur Sandrine Gulberti, qui a co-encadré ce travail de thèse. Je la remercie de m'avoir pris sous son aile dès mon premier stage au laboratoire, d'avoir eu confiance en moi et de m'avoir transmis sa rigueur et son organisation. Merci pour son implication dans ce travail de thèse, sa bonne humeur et sa capacité à rendre les périodes difficiles beaucoup plus agréables.

Je tiens également à remercier le Professeur Jean-Yves Jouzeau de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

J'exprime tous mes remerciements à Monsieur le Professeur Fabrice Allain et à Monsieur le Docteur Hugues Lortat-Jacob pour avoir accepté de juger ce travail thèse en qualité de rapporteur.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Jean-Christophe Bourdon d'avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant qu'examinateur et pour ses remarques constructives en tant que membre de mon comité de thèse. Sa disponibilité, ses connaissances scientifiques et sa réflexion m'ont permis de me guider dans l'avancée de ce travail de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude et mes sincères remerciements.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Jean-Louis Merlin pour avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examinateur et pour ses conseils pertinents qu'il a pu me donner à l'occasion de journées scientifiques.

Je remercie également Madame le Docteur Xianqing Mao qui m'a permis d'initier ce travail de thèse. Je la remercie de m'avoir transmis ses connaissances scientifiques et techniques et sa constante implication.

Dans un registre plus personnel, je tiens à remercier mes compagnons de thèse, à commencer par tout le bureau, qui a été un peu mon second appartement durant toutes ces

années. Que de bons souvenirs avec vous tous ! On a quand même un beau panier de basket, il faut le dire !

Ces années passées au Biopôle m'auront permis de rencontrer une personne qui compte énormément pour moi aujourd'hui. Jacqueline, j'ai trouvé en toi bien plus qu'une collègue de thèse, et même bien plus qu'une copine de labo. Tu es une amie, une vraie amie, toujours là dans les bons comme dans les mauvais moments (faut juste que tu répondes au tel !! lol) et qui sait tout de moi. Merci d'être ce que tu es et d'être entrée dans ma vie. Spéciale dédicace à la salle de mécanobio qui a connu nos plus gros fous rires !! Tu sais que tu pourras toujours compter sur moi et même si on se voit moins qu'avant je resterai toujours ta Prooty ;))

Je veux également remercier tout particulièrement mon Mathew, que dis-je ? Dr Riffault ! Ma thèse n'aurait pas été la même sans toi. Je pourrais rédiger un mémoire de tous nos délires mais je t'avoue que là tout de suite j'ai pas trop envie ! You know what I mean ?? Je suis tellement fière de toi et de ton apprentissage de la mode et des couleurs, tu auras été un parfait élève ! Mon chewiii tou è magnifaaaiiikkee !! Plus sérieusement merci du fond du cœur pour avoir égayer ma thèse au quotidien, merci de ta présence, sans toi ça aurait été beaucoup moins drôle ! Si tu savais comme tu me manques ! Mais je peux venir te voir maintenant que je sais qu'il y a un M.A.C (non pas les ordis non) et deux Zara dans ta nouvelle ville ☺.

Merci à Guitoune et Toinou (parce que l'un ne va pas sans l'autre) pour tous les bons moments passés avec un point d'honneur aux pauses café et aux soirées Time's Up et p'tits suisses :))

Je souhaite aux suivants tout le courage et la ténacité qu'il faut pour y arriver : Anne-So, Gabi, Léo, Julie, Xiaomeng, Paul, Dima, Madhia vous allez tout déchirer ! Et merci aux anciens pour votre expérience et votre présence : Émilie, Reine, Mosta, Hassan, Mineem, Irfan, Xavier et Mathilde je vous souhaite le meilleur !!

Marie-Hélène et Brigitte, mes tatas du labo, un immense merci pour votre présence au quotidien, vous m'avez fait grandir aux travers de vos conseils et vous avez réussi l'impossible : m'assagir. Merci de votre écoute, de vos sourires et de votre gentillesse. David merci pour le temps que tu m'as accordé, merci pour tes conseils et tout ce que tu m'as appris. Nick merci pour ton écoute, ton soutien, nos discussions, ta compréhension et tes précieux conseils, vraiment merci du fond du cœur, je sais que tu n'aimes pas que je dise ça mais je ne sais pas comment j'aurai fais sans toi.

Merci à mes amis d'avoir toujours été là pour moi. Marie ma meilleure amie, ma sœur, tu es mon soutien sans failles depuis toutes ces années, tu as toujours été là pour moi et je ne te remercierai jamais assez. Mon Booba merci de me donner le sourire en toutes circonstances, il était hors de question que tu ne fasses pas parti de cette aventure et de ne pas laisser une trace de toi dans ce manuscrit (en plus de gravé dans le bois ;)).

Enfin j'ai une occasion de dire cette phrase : merci à mes parents sans qui je ne serai pas là aujourd'hui ! Je sais que vous allez sourire en lisant ça et c'est fait pour, mais il n'empêche que je le pense vraiment. Merci également à toute ma famille de me chouchouter aussi bien et de me faire vivre des moments de bonheur, je vous aime. Mes papys, je sais que vous aurez été très fiers de moi, vous me manquez beaucoup et je vous dédie cette thèse. Ma petite Mia, mon petit chat à moi, qui sans le savoir m'a permis de tenir le coup quand ça n'allait pas. J'ai ressenti une grande tristesse et un grand vide quand elle est partie, je ne l'oublierai jamais et aucune boule de poils ne la remplacera.

Et toi mon chéri, mon Ludo... Le meilleur pour la fin. Je t'adresse un remerciement tout particulier, unique, comme tu l'es pour moi. Je ne sais même pas quels mots choisir pour te dire à quel point tu es important pour moi et à quel point tu rends ma vie belle. Merci de toujours me soutenir quand j'en ai besoin, merci de ta patience, de ton écoute et merci de me pousser à ne rien jamais rien lâcher et de croire en moi. Tu as changé ma vie, merci d'en faire parti, merci pour tout ce que tu m'apportes et merci de me rendre heureuse. Je t'aime <3

SOMMAIRE

SOMMAIRE	5
LISTE DES ILLUSTRATIONS	11
LISTE DES ABREVIATIONS	16
AVANT-PROPOS	22
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	26
I. Protéoglycanes et glycosaminoglycanes: structure et classification	27
A. Structure des protéoglycanes et glycosaminoglycanes	27
1. Structure générale des protéoglycanes	27
2. Composition des chaînes de glycosaminoglycanes	27
a) L'acide hyaluronique (AH).....	29
b) Les kératanes sulfates (KS)	29
c) L'héparine (Hep) et les héparanes sulfates (HS).....	31
d) Les chondroïtines sulfates (CS) et dermatanes sulfates (DS).....	33
B. Classification des protéoglycanes.....	33
1. Un HSPG intracellulaire : la serglycine.....	35
2. Les HSPGs membranaires.....	36
a) Les HSPGs membranaires comportant un domaine protéique transmembranaire.....	36
(1) Les syndécans	37
(2) Les variants du CD44.....	40
(3) Le bétaglycan.....	42
b) Les HSPGs membranaires fixés <i>via</i> une ancre GPI : les glypicans.....	42
3. Les HSPGs péricellulaires (ou les HSPGs de la lame basale).....	44
4. Les HSPGs extracellulaires de type SPOCK	45
II. LA Biosynthèse des chaînes d'héparanes sulfates	47
A. Etapes d'initiation de la biosynthèse des chaînes de HS	47
1. Formation de l'amorce tétrasaccharidique commune aux PG à chaînes de HS et à chaînes de CS/DS (Figure 1).....	47
2. Modifications de l'amorce.....	47
a) La phosphorylation du xylose sur l'hydroxyle en position 2	48
b) La sulfatation des galactoses en position 6 et/ou 4.....	48
B. Etapes d'élongation des chaînes de HS	50
1. Mécanisme général d'élongation et acteurs impliqués	50
2. Implication des différentes exostosines dans l'élongation des chaînes de HS.....	51
a) Les « exostosines-like » glycosyltransférases : EXTL1, EXTL2 et EXTL3	51
b) Les exostosines glycosyltransférases EXT1 et EXT2	53
C. Maturation des chaînes d'héparanes sulfates	54
1. Mécanisme général de maturation	54
2. Les <i>N</i> -déacétylases / <i>N</i> -sulfotransférases (NDSTs)	56
3. La C5-épimérase	61
4. La 2- <i>O</i> -sulfotransférase (2-OST).....	63
5. Les 6- <i>O</i> -sulfotransférases (6-OSTs)	65
6. Les 3- <i>O</i> -sulfotransférases (3-OSTs)	69
7. Les 6- <i>O</i> -endosulfatases	69
D. Focus sur les 3- <i>O</i> -sulfotransférases (3-OSTs ou HS3STs)	73
1. Implication des 3-OSTs dans la maturation des chaînes de HS	73
2. Proportion de groupements 3- <i>O</i> -sulfates au sein des chaînes de HS.....	73
3. Pourquoi existe-t-il autant d'isoformes dans la famille des 3-OSTs ?.....	74

a)	Deux sous familles d'isoformes des 3-OSTs : « AT-type » et « gD-type ».....	75
b)	Spécificité de substrat des 3-OSTs.....	76
4.	Données structurales des 3-OSTs	78
a)	Mise en évidence des acides aminés importants pour la spécificité de substrat oligosaccharidique accepteur des 3-OSTs.....	79
b)	Mise en évidence des acides aminés importants pour la fixation du substrat donneur (PAPS) et le transfert du groupement sulfate.....	80
c)	Mise en évidence des acides aminés impliqués dans la fixation du substrat accepteur	80
III.	La 3-O-sulfatation : implications biochimique, physiologique et physiopathologique	82
A.	Description des différents ligands des HSPGs.....	82
1.	Les HBP (Heparin Binding Proteins)	82
2.	Implication des motifs sulfatés des chaînes de HS dans la formation d'un complexe ternaire HS / FGF / FGFR.....	85
a)	Rôle des motifs N-, 2-O et 6-O sulfatés dans la fixation du FGF-2 à son récepteur et dans l'activation de la voie de signalisation associée.....	86
b)	Rôles physiologiques du complexe ternaire HS / FGF / FGFR.....	87
c)	Implications pathologiques du complexe ternaire HS / FGF / FGFR	88
3.	Interaction des HS 3-O-sulfatés avec les FGFs.....	90
a)	Rôle de la 3-O-sulfatation dans la liaison aux FGF-1 et -2	90
b)	Rôle de la 3-O-sulfatation dans la liaison au FGF-7.....	91
B.	Implication de la 3-O-sulfatation dans l'activité anticoagulante de l'antithrombine III (AT-III)	93
1.	Mécanisme de liaison de l'antithrombine à l'héparine	94
2.	Le motif pentasaccharidique 3-O-sulfaté de type HS impliqué dans la liaison à l'antithrombine.....	94
3.	Rôle des 3-OSTs dans la production de HS coagulants.....	96
C.	Implication de la 3-O-sulfatation dans l'infection par l' <i>Herpes Simplex virus</i> de type 1 (HSV-1)	97
1.	Mécanisme d'infection par l'HSV-1 : rôle des HS 3-O-sulfatés	97
2.	Le motif octasaccharidique 3-O-sulfaté de type HS impliqué dans l'infection par l'HSV-1.....	98
D.	La 3-O-sulfatation dans le développement.....	99
a)	Etudes du développement chez le Poisson Zèbre.....	99
b)	Etudes du développement chez le nématode <i>Caenorhabditis elegans</i> (<i>C.elegans</i>)	100
c)	Etudes du développement chez la Drosophile.....	101
E.	La 3-O-sulfatation en situation pathologique	102
1.	La 3-O-sulfatation dans l'inflammation	102
2.	La 3-O-sulfatation dans les cancers.....	104
a)	Les HSPGs et le processus cancéreux.....	104
(1)	Implication des HSPGs ancrés à la surface des cellules dans le processus tumoral.....	104
(2)	Implication des HSPGs présents dans la matrice extracellulaire dans le processus tumoral ..	104
b)	Implication de la 3-O-sulfatation dans différents types de cancers : rôle des modifications épigénétiques	107
IV.	Le Cancer du sein : Focus sur le sous-type HER2+ et implication des héparanes sulfates dans ce contexte.....	110
A.	Généralités sur le cancer du sein	110
1.	Incidence, diagnostic et traitements.....	110
2.	Classification des cancers du sein.....	111
a)	Les quatre sous-types de cancers du sein.....	111
b)	Le sous-type HER2+.....	112
B.	Les récepteurs HERs et leurs ligands.....	112
1.	Description des récepteurs HERs.....	112
a)	Structure des récepteurs HERs	113
b)	Rôles des récepteurs HERs.....	113
2.	Mécanisme d'activation des récepteurs HERs.....	114
3.	Ligands des récepteurs HERs.....	115
4.	Le récepteur HER2 : activation et signalisation.....	117
a)	Activation du récepteur HER2.....	117
b)	La signalisation de HER2.....	118
(1)	La voie PI3K/AKT.....	119
(2)	La voie RAS/RAF/MAPK.....	120

c) Le trastuzumab : un anticorps anti-HER2.....	120
C. Implication des héparanes sulfates dans le cancer du sein.....	122
1. Les PGs à héparanes sulfates membranaires régulent la progression tumorale dans le cancer du sein	123
2. Les héparanes sulfates solubles régulent la progression tumorale dans le cancer du sein : rôle des héparanases	124
a) Le rôle pro-métastatique de l'héparanase dans le cancer du sein	125
b) Le rôle pro-angiogénique de l'héparanase dans le cancer du sein	125
3. Rôle des HS dans l'activation de HER2 : un lien avec la voie de signalisation du FGF-7 ?	127
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE	133
MATERIELS ET METHODES	138
I. LIGNÉES cellulaires et conditions de culture.....	139
A. Lignées cellulaires	139
B. Conditions de culture	139
II. Méthodes de transfection des cellules.....	140
A. Transfection transitoire par électroporation	140
1. Transfection des cellules par le plasmide contenant la séquence d'ADNc codant la 3-OST3A ..	140
2. Transfection des cellules par les siRNA spécifiquement dirigés contre le gène 3-OST3A	140
B. Transfection stable des cellules de la lignée MCF-7	141
III. Traitements des lignées cellulaires	142
A. Protocole de traitement des lignées MCF-7 et MDA-MB-231 par les inhibiteurs des marques épigénétiques, la 5-aza-2'-déoxycytidine (Aza) et la trichostatine A (TSA)	142
B. Traitements des cellules SKBR3.....	144
1. Traitement des cellules SKBR3 par le trastuzumab (Herceptin™)	144
2. Stimulation des cellules SKBR3 par des facteurs de croissance.....	144
IV. ANALYSE DU TAUX D'EXPRESSION DES ARNm DE LA 3-OST3A.....	145
A. Analyse à partir des lignées cellulaires étudiées	145
1. Extraction des ARN totaux	145
2. Analyse en RT-PCR quantitative (RT-PCRq)	145
B. Analyse à partir de tissus tumoraux mammaires de patientes atteintes d'un cancer du sein	146
1. Méthodologie employée	146
2. Analyses statistiques des données cliniques.....	147
V. Établissement DU PROFIL DE MÉTHYLATION Du GÈNE 3-OST3A dans un panel de lignées cellulaires cancéreuses mammaires	147
A. Identification des îlots CpG.....	147
B. Méthodologie expérimentale de la mise en évidence de la méthylation de l'ADN	147
1. Extraction de l'ADN génomique.....	147
2. Conversion au bisulfite	148
3. Amplification des séquences d'intérêt par Nested-PCR.....	148
4. Purification des produits de PCR, clonage, ligation et transformation bactérienne	150
C. Établissement de la carte de méthylation du gène 3-OST3A.....	150
VI. Mise en évidence des acteurs épigénétiques associés au gène 3-OST3A dans les cellules MCF-10A, MCF-7 et MDA-MB-231 par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	151
1. Pontage ADN-protéines dans les cellules MCF-10A, MCF-7 et MDA-MB-231	151
2. Lyse des cellules et fractionnement de l'ADN par sonication.....	152
3. Immunoprécipitation de l'ADN total	152
a) Préparation du complexe billes magnétiques de protéines G / anticorps.....	152
b) Immunoprécipitation de l'ADN total	153
4. Dépontage entre ADN et anticorps liés aux billes de protéines G	153
a) Réaction de dépontage.....	153

b) Purification et élution de l'ADN immunoprécipité.....	154
5. Amplification de l'ADN immunoprécipité par PCR.....	154
a) Design des amorces spécifiques pour l'amplification du gène 3-OST3A.....	154
b) Conditions de la réaction de PCR.....	155
VII. Tests cellulaires d'apoptose et de prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7, MDA-MB-231 et SKBR3 par une approche de gain ou de perte de fonction de la 3-OST3A.....	157
A. Evaluation de l'apoptose par cytométrie en flux.....	157
B. Evaluation de la prolifération cellulaire.....	158
VIII. ETUDE DE l'apoptose des les cellules MCF-7 suite À LA SUREXPRESSION DE LA 3-OST3A : MISE en évidence et EXPLORATION DES mécanismes.....	159
A. Mise en évidence de l'apoptose des cellules MCF-7 suite à la surexpression de la 3-OST3A par la technique TUNEL.....	159
B. Étude de l'expression des protéines impliquées dans l'apoptose des cellules MCF-7 suite à la surexpression de la 3-OST3A par western blot.....	160
IX. Etude de l'expression du récepteur HER2 et de sa forme phosphorylée phospho HER2 dans les cellules SKBR3.....	162
A. Méthodologie de l'étude.....	162
B. Étude de l'influence de l'expression de la 3-OST3A sur l'expression du récepteur HER2 et sa forme phosphorylée (pHER2) dans les cellules SKBR3 par Western-Blot.....	162
C. Étude de l'influence de l'expression de la 3-OST3A sur l'expression du récepteur HER2 dans les cellules SKBR3 par microscopie confocale.....	164
1. Fixation des cellules.....	164
2. Immunomarquage du récepteur HER2.....	164
3. Immunomarquage des cellules transfectées par la 3-OST3A-HA.....	164
4. Marquage du noyau cellulaire.....	164
X. Influence de l'expression de la 3-OST3A sur la fixation du FGF-7 a son récepteur et sur la 3-O-sulfatation globale des chaînes de HS dans les cellules MCF-7 et SKBR3.....	165
A. Mise en évidence de l'influence de l'expression de la 3-OST3A sur la fixation du FGF-7 à son récepteur sur les cellules MCF-7 et SKBR3 par immunomarquage.....	165
1. Préparation et traitement des cellules.....	165
2. Immunomarquage du FGF-7.....	165
3. Marquage du noyau.....	165
B. Mise en évidence de la l'influence de l'expression de la 3-OST3A sur la 3-O-sulfatation globale des chaînes de HS dans les cellules MCF-7 et SKBR3.....	166
1. Préparation et traitement des cellules.....	166
2. Immunomarquage de la 3-O-sulfatation globale des chaînes de HS.....	166
a) Immunomarquage des chaînes de GAGs 3-O-sulfatées avec l'anticorps anti-HS4C3V.....	166
b) Immunomarquage de l'anticorps anti-HS4C3V avec l'anticorps <i>anti-Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein (VSV-G)</i>	166
c) Immunomarquage avec l'anticorps AlexaFluor® 488.....	166
3. Immunomarquage des cellules transfectées par la 3-OST3A-HA.....	167
4. Marquage du noyau cellulaire.....	167
XI. Analyses statistiques.....	167
RÉSULTATS ET DISCUSSIONS.....	168
I. PARTIE 1 : L'héparane sulfate 3-O-sulfotransférase 3A (3-OST3A) : un nouveau régulateur tumoral et un marqueur pronostique dans le cancer du sein.....	169
A. Publication.....	169
B. Principaux résultats.....	196
C. Discussion et Conclusions.....	200

II. PARTIE II : La 3-O-sulfatation des héparane sulfates médiée par la 3-OST3A induit l'activation du récepteur HER2 dans les cellules de cancer du sein SKBR3	206
A. Résultats préliminaires	206
B. Principaux résultats	218
C. Discussion et Conclusions	223
 CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	227
 I. CONCLUSION GÉNÉRALE	228
II. PERSPECTIVES	233
 BIBLIOGRAPHIE.....	238

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Liste des illustrations

Liste des figures

Figure 1. Structure chimique des unités disaccharidiques des différents types de GAGs

Figure 2. Zones d'ancrage des différents types de kératanes sulfates (KS) à la protéine core

Figure 3. Les modifications de l'unité disaccharidique de l'héparine et des héparanes sulfates

Figure 4. Représentation schématique des domaines structuraux des héparanes sulfates

Figure 5. Représentation schématique des différentes localisations cellulaires des protéoglycanes

Figure 6. Représentation schématique des HSPGs membranaires

Figure 7. Représentation schématique des différents types de syndécans

Figure 8. Représentation schématique de l'organisation modulaire des HSPGs de type SPOCK : les testicans

Figure 9. Initiation de la biosynthèse des chaînes de GAGs : formation de l'amorce tétrasaccharidique

Figure 10. Représentation schématique de l'activité des glycosyltransférases impliquées dans l'élongation des chaînes de HS

Figure 11. Représentation schématique des étapes séquentielles de la maturation des chaînes de HS

Figure 12. Représentation schématique de la réaction de C5 épimérisation lors de la maturation des chaînes de HS

Figure 13. Structure cristallographique du complexe homo-trimérique de la 2-OST

Figure 14. Représentations schématiques de l'implication des 6-O-endosulfatases Sulf-1 et Sulf-2 dans la régulation de la liaison et de l'activation de ligands protéiques au niveau des chaînes de HS

Figure 15. Structure des substrats accepteurs spécifiques de la 3-OST3A et leurs produits

Figure 16. Structure cristallographique du complexe ternaire 3-OST3 / PAPS / tétrasaccharide

Figure 17. Activités biologiques modulées par les interactions HS / HBP

Figure 18. Représentation schématique du complexe ternaire HS / FGF / FGFR

Figure 19. L'antithrombine : un inhibiteur de la cascade de la coagulation sanguine

Figure 20. Mécanisme d'action de la liaison de l'antithrombine à l'héparine et aux chaînes de HS

Figure 21. Motif pentasaccharidique de fixation à l'antithrombine III

Figure 22. Motif octasaccharidique de fixation à la glycoprotéine D (gD) de l'enveloppe virale de l'*Herpes Simplex virus* de type 1 (HSV-1)

Figure 23. Les HSPGs présents sous forme soluble dans l'environnement tumoral influencent le comportement des cellules cancéreuses

Figure 24. Structure des récepteurs HERs

Figure 25. Mécanisme d'activation des récepteurs HERs

Figure 26. Les principaux ligands des récepteurs HERs

Figure 27. Les différents types de signalisation cellulaire

Figure 28. Les voies de signalisation associées à HER2

Figure 29. Représentation schématique de la fixation du trastuzumab sur le récepteur HER2

Figure 30. Les différents modes d'action du trastuzumab

Figure 31. Modèle d'activation de HER2 médiée par le complexe HS / FGF-7 / FGFR2-IIIb

Figure 32. Implication d'ADAM17 dans la transactivation des récepteurs HERs médiée par le FGF-7

Figure 33. Schéma de conversion au bisulfite des cytosines

Figure 34. Étapes permettant l'établissement de la carte de méthylation du gène *3-OST3A* dans un panel de lignées cancéreuses mammaires

Figure 35. Principales étapes de la réaction d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Figure 36. Illustration d'un résultat de cytométrie en flux suite au double marquage des cellules à l'annexine V et à l'iodure de propidium

Figure 37. Détection de l'apoptose cellulaire par la technique TUNEL basée sur la réaction chimique "click"

Figure 38. Représentation schématique de l'hypothèse du rôle direct des HS 3-*O*-sulfatés dans l'activation du récepteur HER2

Figure 39. Représentation schématique de l'hypothèse du rôle indirect des HS 3-*O*-sulfatés dans l'activation du récepteur HER2

Liste des tableaux

Tableau 1. Expressions tissulaires et principaux rôles des syndécans

Tableau 2. Expressions tissulaires et principaux rôles des glypicans

Tableau 3. Expressions tissulaires et principaux rôles des protéoglycanes à héparanes sulfates de la lame basale

Tableau 4. Spécificités de substrats et expressions tissulaires des *N*-déacétylases / *N*-sulfotransférases (NDSTs). Adapté de Kusche-Gullberg et Kjellén, 2003

Tableau 5. Spécificité de substrats et expression tissulaire des enzymes de la famille des 6-OSTs. Adapté de Habuchi *et al.*, 2000 ; Habuchi *et al.*, 2003 ; Kusche-Gullberg et Kjellén, 2003

Tableau 6. Classification et expression tissulaire des 3-OSTs

Tableau 7. Résidus d'acides aminés homologues du site catalytique des 3-OSTs impliqués dans la liaison du substrat oligosaccharidique accepteur

Tableau 8. HBP (*Heparin Binding Proteins*) et fonctions biologiques associées

Tableau 9. Classification moléculaire des sous-types de cancers du sein

Tableau 10. Classification des lignées cellulaires cancéreuses mammaires utilisées

Tableau 11. Séquences des siRNA utilisés pour réprimer l'expression du gène *3-OST3A*

Tableau 12. Séquences nucléotidiques des amorces utilisées en RT-PCRq pour analyser l'expression des ARNm *3-OST3A*

Tableau 13. Protocoles de traitements des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 par la 5-aza-2'-déoxycytidine (Aza) et/ou par la trichostatine A (TSA)

Tableau 14. Protocole de stimulation par des facteurs de croissance des cellules SKBR3 surexprimant la *3-OST3A*

Tableau 15. Conditions de réaction de la PCRq pour l'analyse du taux d'expression des ARNm de la *3-OST3A* dans les lignées cellulaires étudiées

Tableau 16. Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la réaction d'amplification par PCR nichée (*Nested-PCR*)

Tableau 17. Liste des anticorps utilisés pour les analyses d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Tableau 18. Séquences nucléotidiques, tailles, localisations par rapport au TSS et Tm des amorces de PCR utilisées pour les analyses de ChIP

Tableau 19. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'étude de l'expression des protéines impliquées dans l'apoptose des cellules MCF-7

Tableau 20. Résumé des différentes conditions de culture et de traitements des cellules SKBR3 pour l'étude de l'expression du récepteur HER2 et sa forme phosphorylée (pHER2)

Tableau 21. Anticorps utilisés pour l'étude de l'expression du récepteur HER2 et sa forme phosphorylée (pHER2) dans les cellules SKBR3

LISTE DES ABREVIATIONS

Liste des abréviations

AANE	Acides Aminés Non Essentiels
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
Ala	Alanine
AR	Amphiréguline
ARNi	Acide DésoxyriboNucléique interférent
AH	Acide Hyaluronique
AKT	Protéine Kinase B
Arg	Arginine
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
Asn	Asparagine
AT	Antithrombine
Bax	<i>Bcl-2-associated X</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BMP	<i>Bone Morphogenic Protein</i>
BRCA	<i>Breast Cancer</i>
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i>
BTC	Bétacelluline
CGn6ST	Corneal N-acétylglucosamine 6-O-SulfoTransférerase
ChIP	ImmunoPrécipitation de la Chromatine
CHO	Chinese Hamster Ovary
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CpG	Cytosine phosphate Guanine
CPNPC	Cancer du Poumon Non à Petites Cellules
CS	Chondroïtine sulfate
CSGalNacT	N-acétylgalactosaminylTransférerase
DCF	<i>Dorsal Forerunner Cells</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DNMT	<i>DNA MethylTransferase</i>
DS	Dermatane sulfate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EdUTP	<i>Ethynyl-dUTP</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EPG	Épigène
EPR	Epiréguline
ER	Récepteur aux Oestrogènes
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
EXT	Exostosine Glycosyltransférerase
EXTL	Exostosine-Like Glycosyltransférerase
EZH2	<i>Enhancer of Zeste Homolog 2</i>
Fam20B	<i>Family with sequence similarity 20 member B</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FGFR	<i>Fibroblast Growth Factor receptor</i>

FISH	<i>Fuorescent In Situ Hybridation</i>
Fuc	Fucose
GAGs	Glycosaminoglycanes
Gal	Galactose
GalNAc	N-AcétylGalactosamine
GalNAc-T	N-AcétylGalactosamine Transférase
gD	Glycoprotéine D
GDF	<i>Growth and Differentiation Factor</i>
GDNF	<i>Glial cell line-Derived Neutropic Factor</i>
Glc	Glucose
GlcA	Acide Glucuronique
GlcA-T	GlucuronosylTansférase
Glce	D-glucuronyl C5-épimérase
Gln	Glutamine
GlcNAc	N-AcétylGlucosamine
GlcNAc-T	N-AcétylGlucosamine Transférase
GlcNH2	Glucosamine non substituée
GlcNS	Glucosamine N-sulfatée
Glu	Acide glutamique
GPC	Glypican
GPI	Glycosyl-PhosphatidylInositol
GST	Glutathion-S-Transférase
GTs	GlycosylTransférases
HA	Hémagglutinine
HB-EGF	<i>Heparin Binding Epidermal Growth Factor</i>
HB-GAM	<i>Heparin Binding Growth-Associated Molecule</i>
HBP	<i>Heparin Binding Proteins</i>
HDAC	Histone Désacétylase
HeLa	<i>Henrietta Lacks</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
Hep	Héparine
HER	<i>Human Epidermal growth factor Receptor</i>
HER2+	HER2 positive
Hex	Hexosamine
HGFR	<i>Hepatocyte Growth Factor Receptor</i>
HGF/SF	<i>Hepatocyte Growth Fact / Scatter Factor</i>
His	Histidine
HME	<i>Hereditary Multiple Exostoses</i>
HS	Héparane Sulfate
HS(act)	Héparane Sulfate anticoagulant
HSN	<i>Hermaphrodite Specific Neuron</i>
HSPG	Protéoglycane à Héparane Sulfate
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IdoA	Acide Iduronique
IFN	Interféron
IGF1R	<i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i>
IgG	Immunoglobuline classe G
IL	InterLeukine
IP	Iodure de Propidium

KO	<i>Knock-out</i>
KS	Kératine sulfate
KSG6ST	Kératine sulfate Galactose 6- <i>O</i> -SulfoTransférase
KV	Vésicule de Kupffer
Lum-A	Luminal A
Lum-B	Luminal B
Lys	Lysine
Man	Mannose
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCF	<i>Michigan Cancer Foundation</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MDA-MB	<i>MD Anderson-Metastatic Breast</i>
MIP-1 β	<i>Macrophage Inflammatory Protein 1 beta</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
MEC	Matrice Extra Cellulaire
MeCP2	<i>Methyl-CpG binding Protein 2</i>
MEK	<i>Mitogene Extracellular signal Kinase</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NA	N-acétylé
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NDST	<i>N-Deacétylase / N-SulfoTransférase</i>
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor-kappa B</i>
NRG	Neuréguline
NS	N-sulfaté
NTP	Nucléotides TriPhosphate
PAF	<i>paraformaldéhyde</i>
pAKT	Phospho AKT
PAPS	3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate
PAPSS2	3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate 2 synthétase
PARP	<i>Poly ADP-Ribose Polymérase</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived Growth Factor Receptor</i>
PDZ	<i>Post synaptic density protein, Drosophila discs large tumor suppressor, Zonula occludens-1 protein</i>
pERK	Phospho ERK
PG	Protéoglycane
pHER	Phospho HER
PI-PLC	Phosphatidylinositol-specific Phospholipase C
PI3-K	Phosphoinositide 3-Kinase
PKC	Protéine Kinase C
PR	Récepteur à la Progestérone
PVDF	PolyVinylidène DiFluorure
Raf	<i>Receptor Activation Factor</i>
Ras	<i>Rat Sarcoma</i>
RE	Réticulum Endoplasmique
RHAMM	<i>Receptor for HA-Mediated Motility</i>
RPS29	<i>Ribosomal Protein S29</i>

RT	Rétro Transcription
SA	Acide Sialique
SAB	Sérum Albumine Bovine
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
Ser	Sérine
Ser-Gly	Sérine-Glycine
Shh	<i>Sonic HedgeHog</i>
SKBR3	<i>Sloan-Kettering Breast Cancer</i>
siRNA	<i>small interfering RiboNucleic Acid</i>
SOS	<i>Son Of Sevenless</i>
SP	<i>Signal Peptide</i>
SPOCK	<i>Sparc (Secreted protein acid and rich cystein) Osteonectine CWCV Kazal-like domain</i>
SNC	Système Nerveux Central
SLRP	<i>Small Leucine Rich Proteoglycan</i>
ST	Sulfotransférase
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
Sulf	Sulfatase
SUZ12	<i>Suppressor of Zeste 12</i>
SVF	Sérum de Veau Foetal
SYND	Syndécan
SYK	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>
TBST	<i>Tris Buffer Saline Tween</i>
TCF-4	<i>T-cell Factor 4</i>
TdT	<i>Terninal deoxynucleotidyl Transferase</i>
TEM	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
Trp	Tryptophane
Thr	Thréonine
TK	Tyrosine Kinase
TN	Triple Négatif
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TSA	Trichostatine A
TSS	<i>Transcription Start Site</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP Nick End Labeling</i>
UDP	Uridine DiPhosphate
UTP	Uridine TriPhosphate
Val	Valine
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Epidermal Growth Factor</i>
VLA	<i>Very Late Antigen</i>
VSV-G	<i>Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein</i>
Wnt	<i>Wingless integrated</i>
WT	<i>Wild Type</i>
Xyl	Xylose
XylT	XylosylTransférase
ZP	<i>Zona Pellucida</i>
β3GalT	β1,3-Galactosyltransférase
β3GnT	β1,3-N-AcétylglucosaminylTransférase
β4GalT	β1,4-GalactosylTransférase

2-OST (ou HS2ST)	2- <i>O</i> -SulfoTranf�rase (ou Héparane Sulfate 2- <i>O</i> -SulfoTransférase)
3-OST (ou HS3ST)	3- <i>O</i> -SulfoTranf�rase (ou Héparane Sulfate 3- <i>O</i> -SulfoTransférase)
6-OST (ou HS6ST)	6- <i>O</i> -SulfoTranf�rase (ou Héparane Sulfate 6- <i>O</i> -SulfoTransférase)
5-Aza; 5-Aza-dC ; Aza	5-aza-2'-déoxycytidine

AVANT-PROPOS

Avant-propos

Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules situées au niveau des membranes plasmiques et dans les matrices extracellulaires (MEC) des tissus conjonctifs. Dotées d'une position stratégique à l'interface cellule-matrice, les PGs ont un rôle structural et fonctionnel essentiel respectivement dans le maintien de l'intégrité des tissus conjonctifs et dans la régulation de l'activité biologique de divers médiateurs solubles comme les facteurs de croissance dont ils peuvent ainsi moduler les multiples fonctions biologiques.

Les PGs sont constitués d'une partie protéique appelée protéine *core* sur laquelle sont greffées de longues chaînes linéaires polysaccharidiques appelées glycosaminoglycanes (GAGs). Les GAGs sont constitués de la répétition d'une unité disaccharidique composée d'un acide uronique et d'une hexosamine. La biosynthèse des PGs implique de nombreuses enzymes de la famille des glycosyltransférases (GTs) qui synthétisent d'abord une amorce tétrasaccharidique commune aux différents types de GAGs à partir de laquelle s'effectuera l'élongation de la chaîne polysaccharidique dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi. Parallèlement à leur polymérisation, les chaînes de GAGs sont maturées en cours et en fin de synthèse par de nombreuses sulfotransférases et épimérasés, conférant à ces GAGs une grande complexité structurale et fonctionnelle.

Les GAGs sont des acteurs importants à considérer dans le cadre de la régulation de processus physiopathologiques majeurs. Dans le cas des héparanes sulfates (HS), les groupements sulfates, ajoutés aux différentes positions de la chaîne, constituent des motifs de reconnaissance pour des ligands protéiques tels que les facteurs de croissance et les cytokines dont la biodisponibilité et l'activité sont ainsi régulées. Il est aujourd'hui établi que les chaînes de HS, *via* leurs motifs sulfatés, jouent le rôle de co-récepteur du FGF (*Fibroblast Growth Factor*) à son récepteur FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) et permettent ainsi la formation d'un complexe ternaire FGF/FGFR/HS activant des voies de signalisation intracellulaires impliquées notamment dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires, que ce soit dans un contexte physiologique ou pathologique. De part leurs propriétés régulatrices et leur capacité d'interaction avec de nombreux effecteurs protéiques, les chaînes de GAGs peuvent être considérés comme des modulateurs de certains processus pathologiques majeurs, comme l'angiogenèse et le développement tumoral.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à une sulfotransférase impliquée dans l'étape terminale de la maturation des chaînes de HS, la 3-*O*-sulfotransférase 3A (3-OST3A). Cette sulfotransférase présente la particularité d'être responsable de l'ajout d'une

modification rare au niveau des résidus glucosamines de la chaîne de HS. Bien que sa fonction biologique demeure méconnue, son rôle dans le développement tumoral a précédemment été mis en évidence par notre équipe dans des cellules de chondrosarcomes (Bui *et al.*, 2010). Dans l'objectif d'évaluer si cette enzyme pouvait avoir un rôle dans d'autres types de tumeurs, ce travail de thèse a été mené sur des lignées d'adénocarcinome mammaires et sur une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein.

Dans la première partie de ce travail, je me suis tout d'abord attachée à étudier si l'expression du gène *3-OST3A* était régulée par des marques épigénétiques dans des cellules d'adénocarcinomes mammaires et dans l'affirmative, d'identifier les acteurs moléculaires responsables de ce phénomène dans les cellules tumorales. Pour étudier le rôle fonctionnel de la 3-OST3A dans ce contexte, des tests cellulaires d'apoptose et de prolifération ont été réalisés *in vitro* en utilisant une approche de perte ou gain de fonction de la 3-OST3A.

Pour étudier la relevance clinique de l'étude de l'expression de la 3-OST3A dans les tumeurs de patientes atteintes de cancer du sein, une étude a été menée sur une cohorte de 117 patientes représentatives des 4 sous-types de cancer du sein : luminal-A (Lum-A), luminal-B (Lum-B), triple négative (TN) et HER2 positive (HER2+) (Collaboration Jean-Christophe Bourdon, Université de Dundee, Écosse LIA MolCellTEG-CNRS-UL). Le premier objectif a été de déterminer, par des tests statistiques, si le niveau d'expression de la 3-OST3A au sein des tumeurs mammaires est dépendant du sous-type de cancer du sein. Les courbes de Kaplan-Meier illustrant la rechute des patientes suivies sur 12 ans, ont permis d'établir une association entre le cancer du sein de sous-type HER2+ et le niveau d'expression de la 3-OST3A au sein des tumeurs de ces patientes.

Sur la base de ces travaux, nous avons, dans un deuxième temps, tenter d'élucider les mécanismes responsables des conséquences délétères de la forte expression de la 3-OST3A au sein des tumeurs mammaires HER2+ sur le devenir des patientes atteintes de ce sous-type de cancer du sein. J'ai d'abord étudié l'influence de la surexpression de la 3-OST3A sur l'activation du récepteur HER2 dans les cellules SKBR3 et sur l'activation des molécules effectrices des voies de signalisation de HER2 impliquées dans la survie cellulaire. La recherche du mécanisme d'activation du récepteur HER2 a constitué point clé de cette deuxième partie. Deux hypothèses ont été envisagées à ce sujet : la première impliquant un rôle direct des chaînes de HS des HSPGs de surface en tant que co-récepteur de ligands de la famille des récepteurs HERs permettant l'activation de HER2 par hétérodimérisation, la deuxième impliquant un rôle indirect des HSPGs de surface en tant co-récepteur du FGF-7 permettant la formation d'un complexe ternaire HS 3-O-sulfatés *via* la 3-OST3A/ FGF-7 /

FGFR2IIIb induisant la transactivation de HER2.

Ce manuscrit de thèse débutera par une introduction bibliographique présentant la structure et les fonctions des PGs et des GAGs. Une partie sera consacrée aux enzymes responsables de la biosynthèse et de la maturation des chaînes de HS, une attention particulière sera portée à la famille des 3-*O*-sulfotransférases. La troisième partie de mon introduction bibliographique présentera les implications biochimiques et physiopathologiques de la 3-*O*-sulfatation des HS. Pour finir cette partie, le rôle des HS dans le cancer du sein sera décrit ainsi que la famille des récepteurs HERs et plus particulièrement le mode d'activation du récepteur HER2 et de ses effecteurs protéiques.

Le contexte et la problématique de l'étude seront présentés afin d'illustrer l'importance de l'étude des 3-*O*-sulfotransférases et en particulier de l'isoforme 3A dans un contexte pathologique. Après une description détaillée des protocoles expérimentaux dans la section « Matériels et Méthodes », les résultats obtenus seront présentés en deux parties : une première partie ayant fait l'objet d'une publication dans le journal *Oncogene* en 2016 et une deuxième partie sous forme d'une ébauche de publication contenant des résultats préliminaires en cours de vérification dans notre équipe. Les résultats seront discutés avant de conclure et de détailler les perspectives de ce travail qui porteront notamment sur l'élucidation des mécanismes moléculaires permettant d'expliquer le rôle de la 3-OST3A dans l'activation du récepteur HER2.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. PROTÉOGLYCANES ET GLYCOSAMINOGLYCANES : STRUCTURE ET CLASSIFICATION

A. Structure des protéoglycanes et glycosaminoglycanes

1. Structure générale des protéoglycanes

Les protéoglycanes (PGs) sont des macromolécules ubiquitaires constituées d'une protéine porteuse appelée protéine « *core* » sur laquelle sont greffées de façon covalente de longues chaînes linéaires polysaccharidiques appelées glycosaminoglycanes (GAGs). D'une façon générale, un PG est composé de deux parties distinctes d'un point de vue biochimique et fonctionnel :

-une partie protéique appelée protéine « *core* » qui comporte des motifs d'ancrage pour les chaînes de GAGs, comme par exemple, un résidu sérine situé au niveau d'un motif répété Sérine-Glycine (Ser-Gly) sur lequel vient se greffer le résidu xylose qui initie la synthèse des principaux types de chaînes de GAGs (Bourdon *et al.*, 1987 ; Esko et Zhang, 1996),

-une partie glucidique qui comprend (i) une amorce tétrasaccharidique composée des 4 résidus [GlcA(β 1,3)-Gal(β 1,3)-Gal(β 1,4)-Xyl(β 1)-O]- fixés de façon covalente à la protéine *core* et commune aux principales familles de PGs et **(ii) -des chaînes de GAGs** composées d'une unité disaccharidique élémentaire polymérisée *n* fois et spécifique à chaque famille de PGs.

2. Composition des chaînes de glycosaminoglycanes

Les chaînes de GAGs sont constituées d'une unité disaccharidique répétitive, pouvant être plus ou moins sulfatée, composée (i) d'une hexosamine : N-acétylglucosamine (GlcNAc) ou N-acétylgalactosamine (GalNAc) et (ii) d'un acide uronique : l'acide glucuronique (GlcA), son épimère en position 5, l'acide iduronique (IdoA) ou un galactose (Gal) dans le cas des chaînes de kératanes sulfates (Esko *et al.*, 2009). La composition de l'unité disaccharidique et ses modifications, principalement des acétylations et des sulfatations, confèrent aux chaînes de GAGs une grande diversité structurale et fonctionnelle permettant de les classer en quatre familles : (i) l'acide hyaluronique (AH), (ii) les kératanes sulfates (KS), (iii) l'héparine (Hep) et les héparanes sulfates (HS) et (iv) les chondroïtines sulfates (CS) et dermatanes sulfates (DS). La composition et la structure chimique des différentes unités disaccharidiques composant les chaînes de GAGs sont présentées en Figure 1.

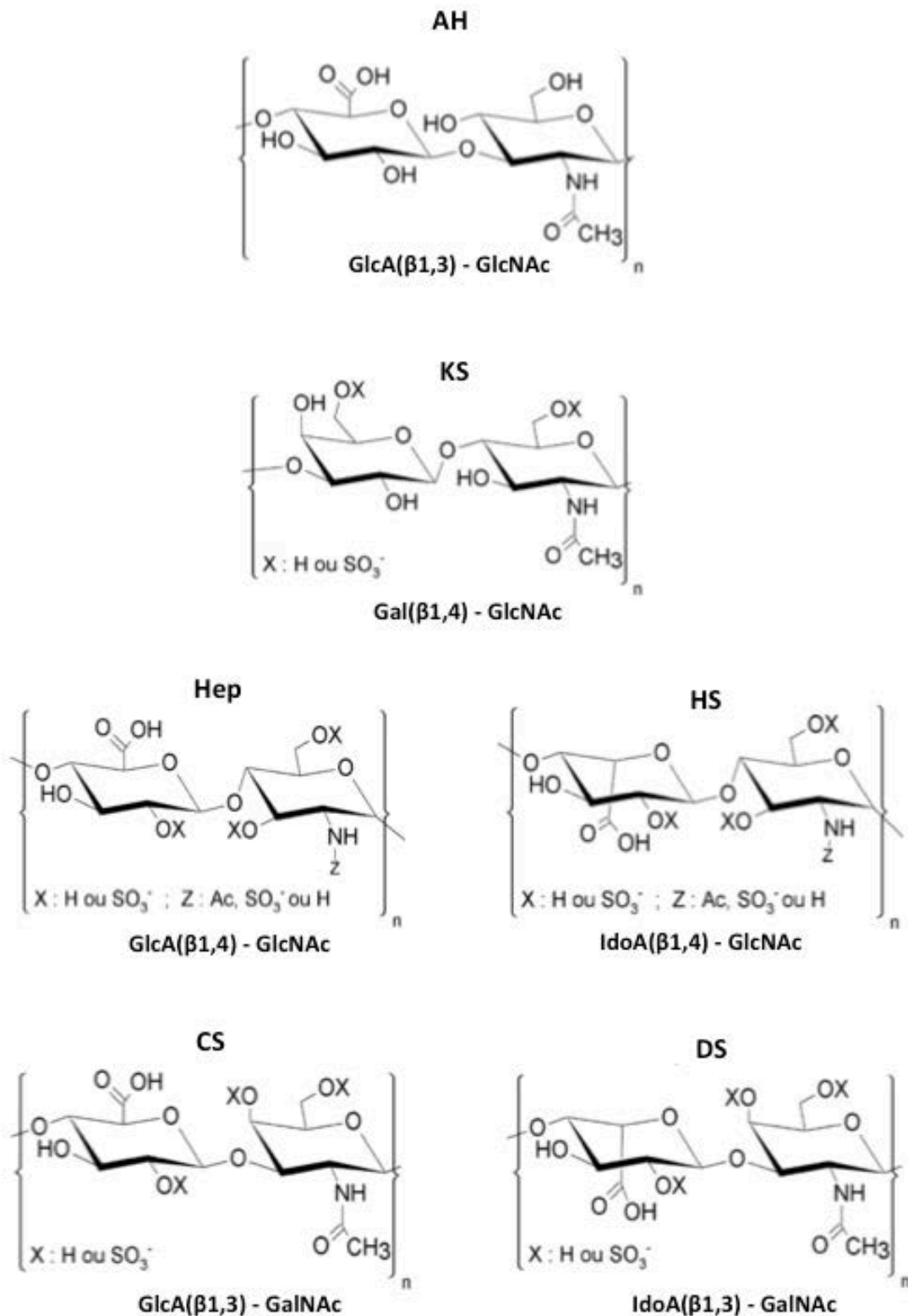


Figure 1. Structure chimique des unités disaccharidiques des différents types de GAGs

Les unités disaccharidiques des GAGs sont constituées d'un ose aminé et d'un autre sucre soit un acide uronique (acide glucuronique ou iduronique), soit un galactose dans le cas des KS. La polymérisation des chaînes des GAGs correspond à la répétition (n fois) de l'unité disaccharidique élémentaire et se fait en même temps que leur maturation par ajout notamment de groupement(s) sulfate(s) sur les différentes positions des résidus osidiques. L'AH est le seul GAG à ne pas subir de modification. AH : acide hyaluronique ; KS : kératanes sulfates ; Hep : héparine ; HS : héparanes sulfates ; CS : chondroitines sulfates ; DS : dermatanes sulfates ; GlcA : acide glucuronique ; IdoA : acide iduronique ; Gal : galactose ; GlcNAc : N-acétylglucosamine ; GalNAc : N-acétylgalactosamine.

a) L'acide hyaluronique (AH)

L'AH est un GAG particulier car il est synthétisé en absence de protéine *core* et est ainsi retrouvé sous forme de chaîne libre (Nikitovic *et al.*, 2014). Il est constitué d'une longue chaîne hétéropolysaccharidique linéaire unique composée de plusieurs centaines de résidus glucidiques et ne subit aucune modification. L'AH est composé de la répétition de l'unité disaccharidique [GlcA-(β 1-3)-GlcNAc] polymérisée n fois par les hyaluronates synthétases 1, 2 et 3 (Itano *et al.*, 2002) du côté interne de la membrane plasmique avant d'être exporté vers la matrice extracellulaire (MEC). Il joue un rôle majeur dans les caractéristiques structurales de nombreux tissus. Du fait de la présence de nombreuses charges négatives (groupements carboxylates) sur ses chaînes de GAGs, l'AH joue en particulier un rôle essentiel dans le maintien de l'hydratation dans les tissus (Oh *et al.*, 2011) dans la mesure où il est capable de capter des molécules d'eau jusqu'à 1000 fois son poids moléculaire (Anderegg *et al.*, 2014). Les fonctions de l'AH sont dépendantes de sa localisation cellulaire (Anderegg *et al.*, 2014). La présence de l'AH dans les MEC est stabilisée par des interactions avec d'autres PGs, notamment l'agrécane. En effet, l'agrécane est capable de former des agrégats en se liant de façon non covalente à l'AH et permet d'assurer la stabilité structurale de ces matrices (Knudson, 1993). De plus, la liaison de l'AH avec les autres protéines de la matrice telles que le réseau de collagène résulte en la formation de structures supramoléculaires permettant d'augmenter la rigidité des tissus (Anderegg *et al.*, 2014).

Au niveau péricellulaire, l'AH interagit avec la glycoprotéine membranaire CD44 et le récepteur RHAMM (*Receptor for HA-Mediated Motility*). Ces associations ont des effets sur la stimulation de la prolifération, de la migration cellulaire et de l'angiogenèse (Slevin *et al.*, 2007). De plus, l'AH est capable de recruter et d'activer les leucocytes, permettant la production d'IL-10 et le déclenchement de la réponse inflammatoire (Petrey *et al.*, 2014). Ainsi, bien que sa structure soit la plus « simple » parmi celle des différents types de GAGs, l'AH est impliqué dans un grand nombre de processus physiopathologiques majeurs tels que l'inflammation, l'angiogenèse, la prolifération et la migration du fait des nombreuses interactions qu'il est capable de mettre en œuvre.

b) Les kératanes sulfates (KS)

Les KS se différencient de tous les autres GAGs par le fait que l'unité disaccharidique qui les compose ne contient pas d'acide uronique mais un galactose (Figure 1). Leur biosynthèse a lieu dans l'appareil de Golgi avant qu'ils ne soient sécrétés dans la MEC. La polymérisation des résidus Gal et GlcNAc fait appel à plusieurs glycosyltransférases : la β 1,3-

N-acetylglucosaminyltransférase (β 3GnT) et la β 1,4-galactosyltransférase (β 4GalT) qui fonctionnent de façon séquentielle pour allonger la chaîne de GAG. Leur maturation implique des réactions de sulfatations des deux résidus Gal et GlcNAc qui est catalysée par deux sulfotransférases : la KS galactose 6-*O* sulfotransférase (KSG6ST) et la corneal *N*-acetylglucosamine 6-*O* sulfotransférase (CGn6ST, également appelée GlcNAc6ST-5 et GST4 β) (Kitayama *et al.*, 2007).

Il est intéressant de noter que les chaînes de KS ne sont pas polymérisées sur l'amorce tétrasaccharidique commune à tous les autres types de GAGs [GlcA-Gal-Gal-Xyl] (voir I.1.), mais sont ancrées à des motifs protéiques spécifiques permettant de les distinguer en trois types : les KSI, II et III (Figure 2), essentiellement présents dans les cartilages hyalin et articulaire (KSI et II), la cornée (KSI) et le cerveau (KSIII) (Funderburgh, 2002). Les KS se différencient également par la nature du corps protéique auquel ils se greffent, le mode d'ancrage et les résidus osidiques qui y sont greffés avant l'étape de polymérisation. Ainsi, les chaînes de KSI s'attachent à la protéine *core* au niveau de résidus asparagine par l'intermédiaire d'une liaison *N*-glycosidique, alors que les chaînes de KSII et KSIII sont fixées sur des sérines ou des thréonines par l'intermédiaire d'une liaison de *O*-glycosyde (Figure 2). Une particularité supplémentaire des KSIII vient du fait que la liaison ose – protéine *core* implique un résidu mannose (Krusius *et al.*, 1986, Funderburgh, 2002). Une dernière particularité des KS est la présence de ramifications sur la chaîne polysaccharidique telles que l'ajout d'un fucose en position 6 des résidus GlcNAc ou encore des acides sialiques à l'extrémité des chaînes de KSII permettant une organisation précise des fibrilles de collagènes (Figure 2, Funderburgh, 2002).

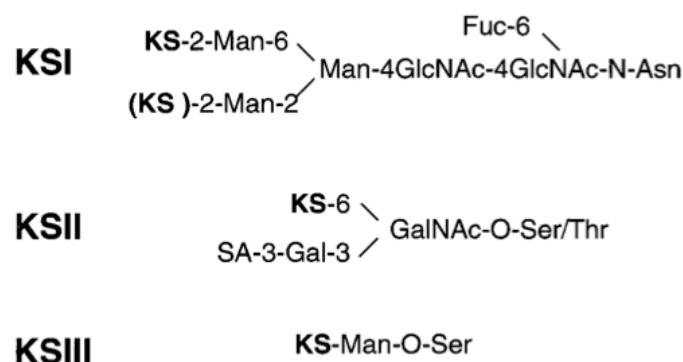


Figure 2. Zones d'ancrage des différents types de kératanes sulfates (KS) à la protéine core

Les chaînes de KS ont des zones d'ancrage à la protéine core particulières et spécifiques, qui les différencient des autres GAGs. Les KSI s'attachent *via* une *N*-glycosylation sur des résidus asparagines (Asn) et peuvent être ramifiées suite à la fixation d'un fucose (Fuc) en position 6 sur les résidus GlcNAc. Les KSII et III se lient à leur protéine *core* *via* une *O*-glycosylation sur des résidus sérines (Ser) ou thréonines (Thr). Les KSII peuvent porter à leur extrémité des résidus d'acide sialique (SA) ou être liées au corps protéique par l'intermédiaire d'un mannose (Man) pour les KSIII. D'après Funderburgh, 2002.

c) L'héparine (Hep) et les héparanes sulfates (HS)

L'Hep et les HS sont composés d'une unité disaccharidique [acide uronique-(β 1,4)-GlcNAc] et se caractérisent par un degré de sulfatation très élevé. Les différentes modifications apportées sur l'unité disaccharidique des HS et de l'Hep sont illustrées en Figure 3. Les résidus du motif disaccharidique peuvent subir différentes modifications : (i) la glucosamine peut être *N*-acétylée (GlcNAc), *N*-sulfatée (GlcNS) ou plus occasionnellement rester sous forme non substituée (GlcNH₂). (ii) Le résidu GlcA peut être épimérisé en position 5 pour former l'IdoA, (iii) une réaction de 2-*O*-sulfatation peut être observée sur les résidus GlcA et IdoA. (iv) Une réaction de 6-*O*-sulfatation peut avoir lieu sur les GlcNAc et GlcNS et de façon plus rare, (v) une réaction de 3-*O*-sulfatation sur les GlcNS précédemment 6-*O*-sulfatés ou non (Poulain et Yost, 2015).

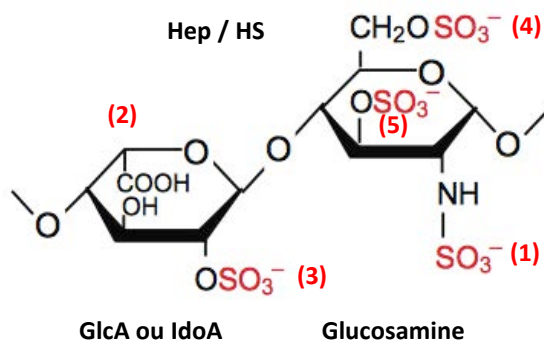


Figure 3. Les modifications de l'unité disaccharidique de l'héparine et des héparanes sulfates

Le motif disaccharidique de base des HS / Hep est constitué d'un acide uronique et d'une glucosamine. Ces résidus subissent de nombreuses modifications : la *N*-déacétylation / *N*-sulfatation des glucosamines (1), la C-5-épimérisation du GlcA en IdoA (2), la 2-*O*-sulfatation de l'IdoA (3), la 6-*O*-sulfatation (4) et plus rarement la 3-*O*-sulfatation (5) des glucosamines conférant à ces molécules un haut degré de sulfatation. D'après Poulain et Yost, 2015. HS : héparanes sulfates ; GlcA : acide glucuronique ; IdoA : acide iduronique.

Au final, plus de vingt-cinq enzymes (glycosyltransférases, épimérase, sulfotransférases) ont été caractérisées dans la voie de biosynthèse et de maturation des HS/Hep, ce qui explique la très grande diversité structurale et fonctionnelle de ces molécules (Esko et Lindahl, 2001; Shriver *et al.*, 2012; Kreuger et Kjellén, 2012). Les rôles fonctionnels et l'importance de ces sulfatations seront décrits et discutés plus précisément dans la partie II.C. Nous pouvons toutefois remarquer que ces différentes modifications sont localisées plus particulièrement dans certaines régions de la chaîne polysaccharidique. En effet, ces chaînes de GAGs sont organisées en domaines fortement *N*-sulfatés (appelés « domaines NS ») ou, au

d) Les chondroïtines sulfates (CS) et dermatanes sulfates (DS)

Les CS et les DS sont respectivement composés d'une unité disaccharidique [GlcA(β 1-3) - GalNAc] et [GlcA ou IdoA (β 1-3) – GalNAc].

Les modifications co- et post-traductionnelles réalisées sur les CS sont essentiellement des sulfatations qui sont responsables de la classification de ces GAGs en plusieurs types : (i) les CS de type A et C, dont les galactosamines peuvent être modifiées par une réaction de 4-*O*-sulfatation ou de 6-*O*-sulfatation respectivement ; (ii) les CS de type D et E, plus rares, vont être composés de résidus GalNAc di-sulfatés.

Les modifications apportées sur les DS sont les mêmes que celles présentes sur les CS, auxquelles viennent s'ajouter (i) une réaction d'épimérisation du GlcA en IdoA qui se fait préférentiellement lorsque la galactosamine est 4-*O*-sulfatée, et (ii) une 2-*O*-sulfatation de l'IdoA. Les DS sont également appelés CS de type B étant donné qu'ils peuvent avoir la même structure que les CS lorsque le GlcA n'est pas épimérisé en IdoA (Maccarana *et al.*, 2006; Laremore *et al.*, 2007). Comme pour les autres types de GAGs, la biosynthèse des CS/DS a lieu dans l'appareil de Golgi et fait appel à plus de quinze enzymes différentes (glycosyltransférases, sulfotransférase et épimérase) (Mikami et Kitagawa, 2013).

Les CS sont les GAGs majoritairement retrouvés dans les tissus conjonctifs et leur fonction la mieux décrite est la structuration des cartilages, où ils exercent des rôles essentiels dans les propriétés élastiques et de résistance à la compression de ce tissu (Lauder, 2009).

Les DS sont notamment présents dans le derme et jouent un rôle important dans l'architecture et la structure de la matrice. La décorine, un petit PG portant une chaîne unique de DS est capable d'interagir avec les fibrilles de collagène de type I et joue ainsi un rôle dans la régulation de la taille des faisceaux de collagène en relation directe avec le maintien de la structure du tissu (Lauder, 2009; Thelin *et al.*, 2013).

B. Classification des protéoglycanes

A l'exception de l'AH, toutes les chaînes de GAGs sont liées à une protéine *core* pour former des PGs. Plusieurs classifications des PGs sont décrites : (i) selon la nature de la protéine *core*, (ii) selon le type de chaînes de GAGs, (iii) en fonction de leur taille, (iv) de leur structure, ou (v) selon leur localisation cellulaire et tissulaire. A ce titre, sont alors distingués dans ce dernier système de classification, les PGs péricellulaires (appelés également PGs de la membrane basale), les PGs extracellulaires, les PGs membranaires et les PGs intracellulaires (Figure 5).

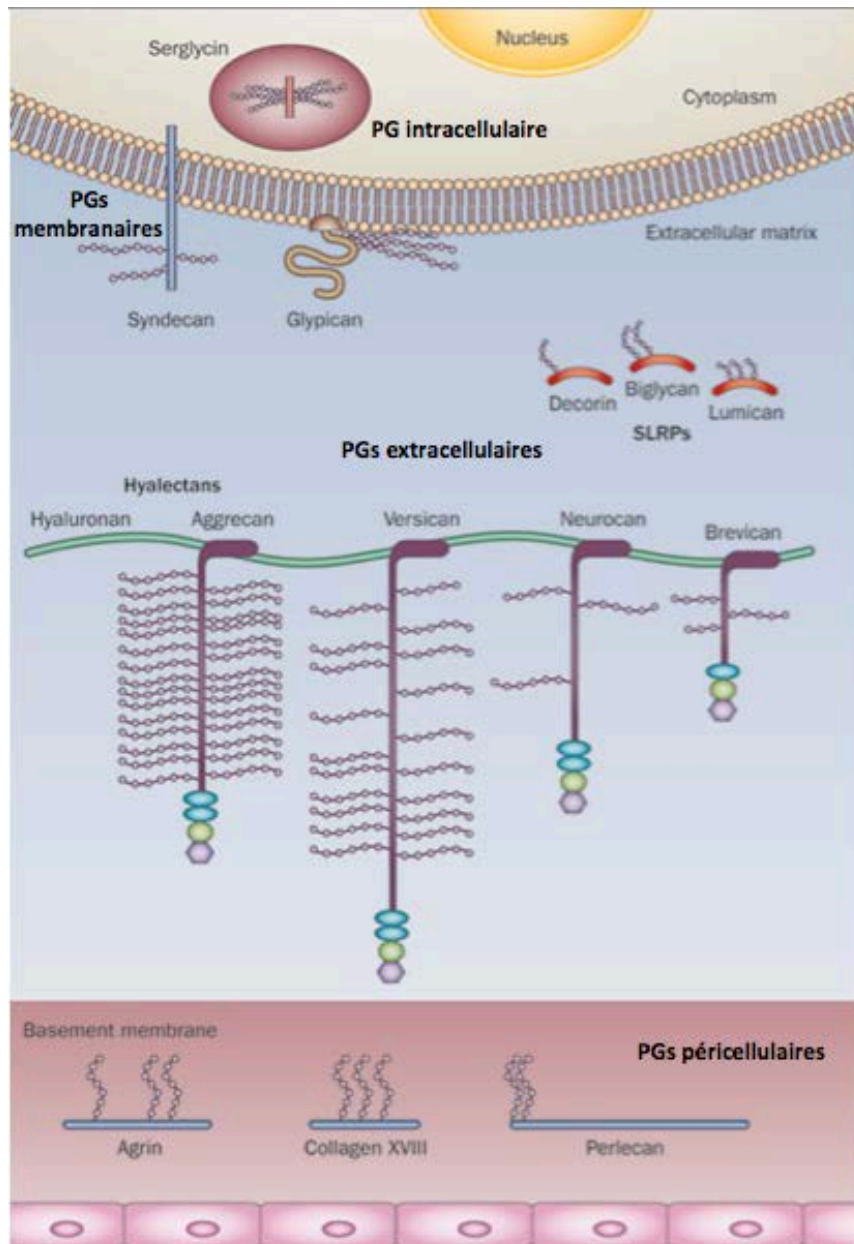


Figure 5. Représentation schématique des différentes localisations cellulaires des protéoglycans

Les protéoglycans peuvent être classés selon leur localisation cellulaire. Les PGs péricellulaires regroupant l'agrine, le collagène XVIII et le perlécan. Les PGs extracellulaires divisés en plusieurs groupes : les hyaléctanes comprenant l'agrécan, le versican, le neurocan et le brevican ; et les petits PGs riches en leucine ou SLRPs incluant la décorine, le biglycan et le lumican. Les PGs extracellulaires comprennent également les PGs circulants (non représentés sur cette figure). Les deux familles majeures de PGs membranaires sont les syndécans et les glypicans. La serglycine, un PG intracellulaire, est retrouvé au sein de vésicules sécrétoires. D'après Edwards, 2012. SLRPs : *small leucine-rich proteoglycans*.

Nous nous focaliserons, dans la partie qui suit, sur la description des PGs à héparanes sulfates (HSPGs), en choisissant comme système de classification celui qui se base sur leur localisation cellulaire. Leurs voies de biosynthèse et de maturation seront ultérieurement présentées dans la partie II.

1. Un HSPG intracellulaire : la serglycine

La serglycine est le seul PG intracellulaire connu à ce jour et a initialement été caractérisé en tant que PG exprimé au sein des vésicules de sécrétion de toutes les cellules hématopoïétiques (Edwards, 2012 ; Korpetinou *et al.*, 2014). Son nom s'explique par la présence répétitive de sérine et de glycine dans sa séquence protéique. Il a été montré durant la dernière décennie que la serglycine était également synthétisée par d'autres types cellulaires, comme les chondrocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes ainsi que dans les cellules souches embryonnaires et aurait ainsi un rôle dans la structure des tissus conjonctifs, dans la sécrétion de chimiokines, dans la prolifération et la différenciation cellulaires (Schick *et al.*, 2003 ; Schick, 2010 ; Meen *et al.*, 2011).

De façon complémentaire, il a été observé que la serglycine était fortement exprimée par certaines cellules tumorales en relation avec leur phénotype agressif. Il a par exemple été montré que la serglycine était sécrétée de façon constitutive par les cellules du myélome multiple et que son expression est un marqueur du développement tumoral (Purushothaman et Toole, 2014). Il est également intéressant de noter que certaines lignées tumorales hématopoïétiques produisent la serglycine avec des chaînes de HS, alors que ce PG porte naturellement des chaînes de CS suggérant que ces cellules orientent la synthèse de chaînes de GAGs de type HS pour promouvoir leur développement en interagissant avec des agents morphogènes et des facteurs de croissance (Schick *et al.*, 2003).

La présence de la serglycine peut également être associée au développement de maladies inflammatoires telles que les coronaropathies, les maladies rhumatismales et la dermatomyosite (Scully *et al.*, 2012). Dans ce contexte, la serglycine agit en fixant et en stockant, et donc en séquestrant, des médiateurs inflammatoires tels que les protéases, les chimiokines, les cytokines et les facteurs de croissance dans les granules de sécrétion des cellules de l'inflammation. A ce niveau, elle régule leur relargage et potentialise leur activité en les protégeant de la dégradation et en facilitant leur transport au niveau de leurs cibles (Pejler *et al.*, 2009). La serglycine peut ainsi renforcer le processus inflammatoire dans le microenvironnement tumoral et favorise, en ce sens, la tumorigénèse (Korpetinou *et al.*, 2014).

2. Les HSPGs membranaires

Les HSPGs membranaires sont divisés en deux groupes : les membres du premier groupe, comme les syndécans, comportent un seul domaine protéique transmembranaire alors que ceux du second groupe, comme les glypicans, sont fixés à la membrane *via* une ancre GPI (Glycosylphosphatidylinositol) (Figure 6).

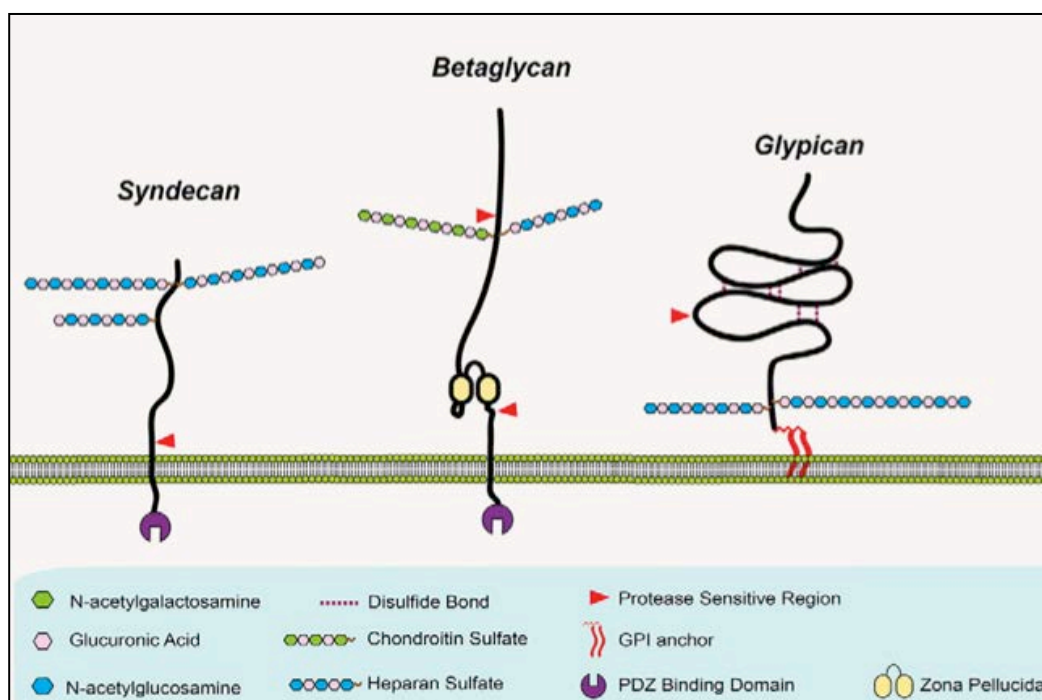


Figure 6. Représentation schématique des HSPGs membranaires

Les HSPGs membranaires sont divisés en deux familles : les PGs comportant un domaine protéique transmembranaire qui regroupent les syndécans (1 à 4), le bétaglycan, et les variants du CD44 (non représentés ici) et les HSPGs membranaires liés à la membrane par l'intermédiaire d'une ancre GPI qui sont majoritairement représentés par les glypicans (1 à 6). Modifié d'après Iozzo et Schaefer, 2015.

a) Les HSPGs membranaires comportant un domaine protéique transmembranaire

Les HSPGs membranaires comportant un seul domaine protéique transmembranaire sont essentiellement représentés par trois familles : (i) les syndécans qui en sont les représentants majoritaires, (ii) les variants du CD44 et (iii) le bétaglycan. Ces PGs ont une position stratégique à l'interface cellule – matrice qui leur confère un rôle majeur dans la transduction du signal et la régulation des voies de signalisation intracellulaire. En effet, grâce à leurs chaînes de HS, ils sont capables d'interagir avec une grande diversité d'effecteurs protéiques (ligands) tels que les facteurs de croissance, les cytokines, les BMPs (*Bone Morphogenic Protein*) et aussi avec leurs récepteurs. La formation de ces complexes

macromoléculaires est impliquée dans des processus physiologiques tels que le développement cérébral, l'adhésion, l'apoptose, la différenciation et la prolifération cellulaires (Sasisekharan *et al.*, 2002). Autant de processus retrouvés dans un contexte pathologique comme les cancers et l'angiogenèse tumorale (De Rossi et Whiteford, 2014), les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Bruinsma *et al.*, 2010) et les maladies possédant une composante inflammatoire telles que les maladies inflammatoires de l'intestin (Patterson *et al.*, 2012) dans lesquels les HSPGs membranaires tiennent une place des plus importantes en permettant l'activation de voies de signalisation cellulaire impliquées dans le développement de ces pathologies.

(1) Les syndécans

Les syndécans sont des PGs membranaires comportant un domaine transmembranaire regroupant quatre membres : le syndécane-1, le syndécane-2 ou fibroglycan, le syndécane-3 ou N-syndécane et le syndécane-4 ou amphiglycan/ryudocan (Figure 7). Ces PGs présentent une organisation structurale en trois domaines aux propriétés fonctionnelles distinctes (Tkachenko *et al.*, 2005) : un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire cytoplasmique :

- **le domaine extracellulaire**, comprenant plusieurs sites d'attachement pour les chaînes de GAGs de type HS et/ou CS. Ces chaînes vont conférer à ces molécules la capacité d'interagir avec des ligands et des effecteurs et de réguler ainsi de nombreuses voies de signalisation intracellulaires. Leurs chaînes de GAGs, majoritairement de type HS, sont localisées au niveau de la partie N-terminale de ce domaine et les chaînes de CS portés en plus des chaînes de HS par les syndécans 1 et 3 sont quant à elles situées à proximité de la membrane plasmique (Ueno *et al.*, 2001). Les syndécans peuvent exister sous forme soluble, suite à leur clivage protéolytique juxta membranaire par différentes protéases matricielles telles que la thrombine, la plasmine, l'élastase ou encore les MMPs (*Matrix Metalloproteinases*) (Choi *et al.*, 2010).

- **le domaine transmembranaire**, constitué en majorité d'acides aminés hydrophobes, assurant l'ancrage à la membrane. Il contient un motif conservé GxxxG (où G correspond à un résidu glycine et x à un acide aminé quelconque) permettant l'homo- et/ou l'hétérodimérisation des syndécans et la possibilité de créer des interactions avec d'autres protéines comme les intégrines ou d'autres récepteurs comme ceux de la famille des récepteurs HERs (*Human Epidermal growth factor Receptor*) (Dews et Mackenzie, 2007).

- **le domaine intracellulaire cytoplasmique**, constitué de trois régions : deux régions conservées, notées C1 et C2, et une région variable (V). La région C1 interagit avec des protéines de liaison (comme par exemple les ezrine, radixine et moesine) qui contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine; la région V, spécifique d'un type de syndécan à l'autre ; la région C2 conservée dans tous les syndécans contient une séquence de quatre acides aminés EFYA capable de lier des protéines à domaine PDZ (un acronyme de la première lettre de *post synaptic density protein* (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor* (Dlg1), et *zonula occludens-1 protein* (zo-1)), qui permettent les interactions protéines-protéines, telles que la synbindine, la synectine et la synténine, qui jouent un rôle physiologique clé dans le transport des vésicules, la signalisation synaptique, la migration neuronale et dans un contexte pathologique, la formation de métastases (Leonova et Galzitskaya, 2013).

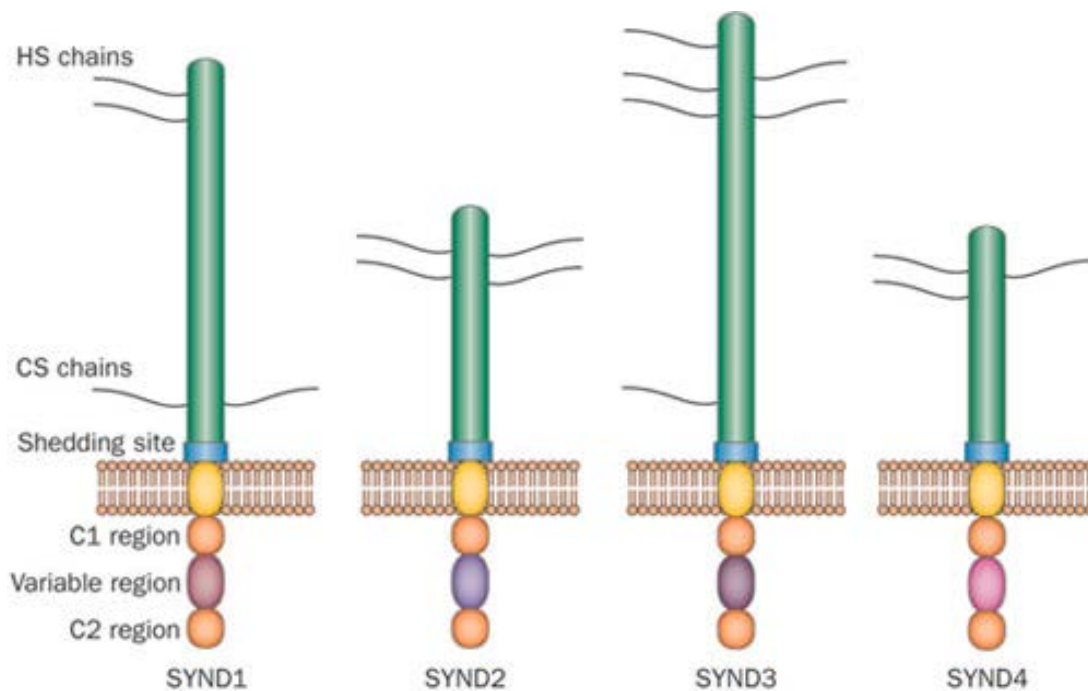


Figure 7. Représentation schématique des différents types de syndécans

Les syndécans (SYND) comportent 4 membres : SYND1 à 4. Ils s'organisent en plusieurs domaines : un domaine extracellulaire (en vert) porteurs des chaînes de GAGs de type HS et/ou CS ; un domaine juxtamembranaire de clivage (en bleu) conduisant à la libération du PG sous forme soluble ; un domaine transmembranaire (en jaune) assurant l'ancrage dans la membrane plasmique ; un domaine intracellulaire composé de deux régions conservées (C1 et C2) au milieu desquelles s'intercale une région variable. D'après Pap et Bertrand, 2013.

Bien que tous les syndécans possèdent des propriétés biologiques communes, leur expression est sujette à des variations spatiales et temporelles, ce qui leur confère également

des fonctions spécifiques (Tableau 1). En effet, bien qu'ils soient exprimés de façon ubiquitaire, le niveau d'expression des syndécans est très régulé en fonction du type et de l'environnement cellulaire (Alexopoulou *et al.*, 2007).

Tableau 1. Expressions tissulaires et principaux rôles des syndécans

Syndécans	Expression tissulaire	Rôles biologiques	Références bibliographiques
Syndécan-1	-Ubiquitaire -Syndécan majoritaire des cellules épithéliales	-Rôle dans l'organisation de la MEC par interaction avec des protéines telles que la laminine et le collagène (D) -Implication dans la transition épithélio-mésenchymateuse (A) -Augmentation de l'expression de sa forme soluble (sous l'action des héparinases), et implication dans la régulation de la croissance tumorale, la formation de métastases et l'angiogenèse en promouvant la signalisation des FC au sein du microenvironnement tumoral (C) - Liaison à l'IGF1R (Insulin-like Growth factor 1 receptor) pour induire sa signalisation en formant un complexe ternaire avec les intégrines (B) -Modulation de son expression dans les cancers : faible expression corrélée à un mauvais pronostic dans les carcinomes de la tête et de cou ; très forte expression retrouvée au sein des gliomes (A)	A- Alexopoulou <i>et al.</i> , 2007 B- Beauvais et Rapraeger, 2010 C- Sanderson et Iozzo, 2012 D- Stepp <i>et al.</i> , 2015
Syndécan-2	-Ubiquitaire -Expression majoritaire dans les fibroblastes et les cellules épithéliales et les cellules mésenchymateuses	-Participation aux interactions cellules – MEC (A) -Inhibition de l'angiogenèse des cellules endothéliales par la forme soluble du SYND2 (C) -Rôle de co-récepteur en interagissant avec le FGF-2, le VEGF et les membres de la superfamille du TGF- β pour réguler la prolifération, l'adhésion et la différenciation cellulaires (D) -Surexpression dans certains types de cellules tumorales, comme les cellules de cancer du côlon et du poumon dont il favorise la migration et la survie cellulaires (A et B)	A-Essner <i>et al.</i> , 2006 B -Barbouri <i>et al.</i> , 2014 C-De Rossi <i>et al.</i> , 2014 D-Mansouri <i>et al.</i> , 2015
Syndécan-3	-Ubiquitaire -Expression majoritaire dans le SNC	-Rôle de co-récepteur de nombreux médiateurs cellulaires décrits ci-après : -Liaison avec le bFGF (<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>) et l'HB-GAM (<i>Heparin-Binding Growth-Associated Molecule</i>) pour promouvoir la formation et la réorganisation du cytosquelette (A) -Médiateur de la protéine <i>Indian hedgehog</i> pour réguler la prolifération des chondrocytes (C)	A-Carey, 1996 B-Fuentealba <i>et al.</i> , 1999 C-Shino <i>et al.</i> , 2004 D-Bespalov <i>et al.</i> , 2011 E-Barbouri <i>et al.</i> , 2014

		<ul style="list-style-type: none"> -Expression à la surface des myoblastes critique pour la modulation de la réponse au FGF-2 (B) -Interaction avec le GDNF (<i>Gial cell line-Derived Neurotrophic Factor</i>) pour promouvoir la migration des neurones corticaux (D) -Pas d'implication connue dans la tumorigénèse (E) 	
Syndécan-4	-Ubiquitaire (mais niveau d'expression plus faible que les autres syndécans)	<ul style="list-style-type: none"> -Établissement de connexions entre la MEC et les protéines du cytosquelette en s'associant avec les intégrines (C) -Rôle dans l'adhésion cellulaire par sa capacité d'interaction avec la fibronectine et les intégrines pour la formation des plaques focales d'adhésion (B) -Fonction de co-récepteurs des récepteurs au FGF 1 à 4 (FGFR1-4) et également de récepteur indépendant des FGFs, VEGFs et PDGFs par l'intermédiaire de leurs chaînes de HS (C) -Liaison en particulier avec le FGF-2 et le VEGF-A pour jouer un rôle dans la régulation de l'homéostasie microvasculaire (A) -Interaction avec l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ <i>via</i> son domaine cytoplasmique pour médier la signalisation des récepteurs HER1 et HER2 impliqués dans le développement tumoral mammaire (D) 	<ul style="list-style-type: none"> A-Zhang <i>et al.</i>, 2003 B-Gopal <i>et al.</i>, 2010 C-Elfenbein et Simons, 2013 D-Wang <i>et al.</i>, 2014

(2) Les variants du CD44

Le gène *CD44* est constitué de 20 exons dont 9 ($v1$ à $v10$) sont exprimés variablement en fonction de l'épissage alternatif, expliquant l'appellation de « variants » du CD44 (Prochazka *et al.*, 2014).

CD44 est une glycoprotéine transmembranaire organisée en plusieurs domaines fonctionnels. Le domaine N-terminal (extracellulaire) contient des motifs de liaison à différents facteurs, comme l'AH, mais également des glycoprotéines et des PGs de la MEC, des facteurs de croissance et des chimiokines (Dzwonek et Wilczynski, 2015). Ce domaine est séparé de la membrane par un petit domaine protéique appelé « région tige », qui contient des sites de clivages protéolytiques pour les métalloprotéases ADAM 10 et 17 (Dzwonek et Wilczynski, 2015). Le domaine cytoplasmique (C-terminal) est quant à lui très important pour assurer les mécanismes de transduction du signal en interagissant avec des molécules de signalisation intracellulaires, telles que les kinases Src (Dzwonek et Wilczynski, 2015). Ce domaine cytoplasmique peut-être clivé pour libérer la forme CD44ICD et être transloqué dans

le noyau où il va agir en tant que régulateur transcriptionnel pour contrôler l'expression de son propre gène (Nagano et Saya, 2004).

Les protéines porteuses des différents variants du CD44 sont généralement substituées par des chaînes de GAGs de type CS. Les variants incluant l'exon v3 (CD44v3) sont les seuls à porter des chaînes de HS (Greenfield *et al.*, 1999). Des fonctions distinctes sont attribuées à ces différents variants en relation directe avec le type de chaînes de GAGs qu'ils portent. Ainsi les variants du CD44 porteurs de chaînes de CS à la surface des cellules endothéliales sont importantes pour la migration de ces cellules (Kinsella et Wight, 1986). Les variants du CD44 substitués par les chaînes de HS présents à la surface de ces mêmes cellules, lient quant à eux la chimiokine MIP-1 β (*Macrophage inflammatory protein 1 alpha*) permettant le recrutement et l'activation des lymphocytes. Ceci va induire la reconnaissance entre le récepteur VLA-4 à la surface des lymphocytes et la protéine VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales. Cette interaction VLA-4/VCAM-1 permet l'adhésion des lymphocytes T aux cellules endothéliales et est indispensable à l'extravasation lymphocytaire pour la mise en place de la réponse anti-inflammatoire et l'activation du système immunitaire (Tanaka *et al.*, 1993).

L'isoforme prédominante du CD44, appelée CD44s ou CD44H, est exprimée dans la substance blanche du cerveau et dans les gliomes astrocytaires. Les autres variants sont quant à eux exprimés dans les métastases de tumeur de cerveau (Bouvier-Labit *et al.*, 2002). Dans le cerveau, les variants du CD44 ont pour fonction principale d'être le récepteur de l'AH qui est le composant clé des MEC dans le cerveau. Ils jouent alors un rôle structural dans l'organisation de ces MEC (Wlodarczyk *et al.*, 2011).

D'autre part, les variants du CD44 jouent un rôle crucial dans le développement neuronal, la neurodégénérescence et l'invasion tumorale cérébrale. En effet, certains variants, comme le CD44v3, sont capables de lier des facteurs de croissance, par l'intermédiaire de leurs chaînes de HS, notamment le HGF/SF (*Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor*). Une étude s'est intéressée aux conséquences cellulaires de cette interaction dans des cellules de lymphome de Burkitt, une forme rare de lymphome malin. Il a ainsi été montré que la reconnaissance entre les chaînes de HS du CD44v3 et le ligand HGF/SF induit la phosphorylation du récepteur HGFR (*Hepatocyte Growth Factor Receptor*, également appelé c-Met) et l'activation des MAP Kinases ERK1 et ERK2, aboutissant à la croissance tumorale et à la formation de métastases. Ces données suggèrent que les variants du CD44 portant des chaînes de GAGs de type HS jouent le rôle de co-récepteurs de l'HGF-SF et favorisent l'invasion tumorale (Van der Voort *et al.*, 1999).

(3) Le bétaglycan

Le bétaglycan est un PG ubiquitaire qui contient une grande région extracellulaire porteuse de chaînes de GAGs de type HS et CS, une région hydrophobe transmembranaire et un court domaine cytoplasmique riche en résidus sérine et thréonine qui constituent des sites potentiels de phosphorylation des protéines kinases. La région proximale extracellulaire contient un domaine ZP (*Zona Pellucida*) qui contribue au rôle de co-récepteur du bétaglycan pour les membres de la superfamille du TGF- β (Bernabeu *et al.*, 2009 ; Iozzo et Schaefer, 2015). En effet, la principale fonction décrite pour le bétaglycan est de lier le TGF- β , facteur qui est impliqué dans les voies de signalisation qui régulent des processus cellulaires majeurs tels que la prolifération, l'angiogenèse ou encore la synthèse des composants de la MEC (Bernabeu *et al.*, 2009). A ce titre le bétaglycan est également appelé récepteur de type III du TGF- β (T β RIII). Il est également connu pour renforcer la liaison des BMP2, 4 et 7 (*Bone Morphogenic Protein*), aboutissant à l'augmentation de la phosphorylation des protéines Smad1 pour en potentialiser les fonctions activatrices dans la différenciation cellulaire (Kirkbride *et al.*, 2008 ; Aleman-Muench *et al.*, 2012). Les co-récepteurs du TGF- β , dont le bétaglycan, commencent également à être décrits dans les voies de signalisation impliquées dans les cancers (Bernabeu *et al.*, 2009). En effet, la forme soluble du bétaglycan, obtenue après le clivage de la partie extracellulaire par un mécanisme qui reste à élucider, séquestre les ligands de la famille du TGF- β (tels que les BMPs et les GDFs (*Growth and Differentiation Factors*)) dans la MEC pour inhiber l'activation des voies de signalisation intracellulaires, et empêcher ainsi la migration cellulaire et l'invasion tumorale dans le cancer du sein (Elderbrook *et al.*, 2014).

b) Les HSPGs membranaires fixés *via* une ancre GPI : les glypicans

Les glypicans sont des PGs membranaires fixés à la membrane *via* une ancre GPI. Cette dernière assure la liaison à la membrane plasmique et contribue à la localisation précise du PG dans la membrane au niveau de micro domaines appelés radicaux lipidiques. Cette position leur permet de former des complexes multimoléculaires impliqués dans la signalisation cellulaire (Paulick et Bertozzi, 2008). Six membres ont été décrits dans cette famille, les glypicans 1 à 6. Contrairement aux syndécans, l'attachement des chaînes de GAGs a lieu à proximité de la membrane plasmique et tous les glypicans portent des chaînes de HS, à l'exception du glypican-5, qui peut également être porteur de chaînes de CS (Filmus, 2008).

Ces chaînes ont pour rôle de fixer et de maintenir des agents morphogènes et des facteurs de croissance dans une conformation active pour leur récepteur (Iozzo et Schaefer, 2015). A ce titre, les glypicans sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques, le plus souvent liés à la morphogénèse. Les fonctions biologiques des glypicans sont décrites dans le Tableau 2.

Tableau 2. Expressions tissulaires et principaux rôles des glypicans

Glypicans	Expression tissulaire	Rôles biologiques	Références bibliographiques
Glypican-1	-Système nerveux central (SNC) chez l'embryon -Ubiquitaire chez l'adulte	-Internalisation de polyamines : phénomène impliqué dans le recyclage de ses chaînes de HS avec augmentation de leur degré de sulfatation créant ainsi davantage de sites de fixations pour les facteurs de croissance (B) -Implication dans la voie de signalisation du FGF-2 et donc dans l'apoptose et la prolifération cellulaire (C) -Surexpression dans les cellules de cancer de sein où il maintient l'effet mitogénique de plusieurs facteurs de croissance liés aux chaînes de HS (A)	A-Mastuda et al., 2001 B-Fransson <i>et al.</i> , 2004 C-Yoneda <i>et al.</i> , 2012
Glypican-2	-SNC chez l'embryon -Absent chez l'adulte	-Implication dans la guidance axonale lors de l'embryogénèse	Fransson <i>et al.</i> , 2004
Glypican-3	-Ubiquitaire chez l'embryon -SNC chez l'adulte	-Modulation de l'activité des protéines Hedgehog (C-2014), Wnt (<i>wingless-integrated</i>) (A), des FGFs (<i>Fibroblasts Growth Factors</i>) et des BMP (<i>Bone Morphogenic Protein</i>) (B) et leurs voies de signalisation : implication dans la formation osseuse et dans le développement -Implication dans le cancer et le contrôle de la croissance cellulaire. Son expression est très fortement induite dans les carcinomes hépatocellulaires et corrélée avec un mauvais pronostic de survie (C-2013) -Des mutations du gène <i>GPC3</i> sont responsables du syndrome de Simpson-Golabi-Behmel (SGBS), caractérisé par une croissance excessive dès la naissance, des anomalies cardiovasculaires, rénales et des malformations des voies urinaires (C-2014).	A-Capurro <i>et al.</i> , 2005 B-Dwivedi <i>et al.</i> , 2013 C-Filmus et Capurro., 2013, 2014
Glypican-4	-Rein et neurones chez l'embryon -SNC chez l'adulte	-Interaction avec le récepteur de l'insuline pour en améliorer la signalisation intracellulaire et aboutir à stimuler la différenciation des adipocytes (A)	A-Ussar <i>et al.</i> , 2012 B-Mitchell, 2012

	l'adulte	-Interaction (glypican 4/récepteur de l'insuline) qui aurait une implication dans le développement de l'obésité (B)	
Glypican-5	-Rein et cerveau chez l'embryon -SNC chez l'adulte	-Implication dans le cancer du poumon non à petite cellules mais rôle controversé dans ce contexte : rôle de suppresseur de métastases dans certaines études (A) alors que pour d'autres, promotion de la migration de ces cellules en association avec un mauvais pronostic de survie (B)	A-Yang <i>et al.</i> , 2013 B-Li <i>et al.</i> , 2013
Glypican-6	-Cœur, foie, rein chez l'embryon - En plus dans les ovaires et l'intestin chez l'adulte	-Intervient dans la migration des cellules de cancer du sein <i>via</i> la voie de signalisation du facteur NFAT (<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>) (A) -Expression associée dans le développement du cancer gastrique (B)	A-Yiu <i>et al.</i> , 2011 B-Dinccecik-Aslan <i>et al.</i> , 2015

3. Les HSPGs péricellulaires (ou les HSPGs de la lame basale)

La lame basale est composée d'une MEC spécialisée jouant le rôle de frontière entre les cellules épithéliales, endothéliales ou musculaires et les tissus conjonctifs sous-jacents. Ses principaux constituants sont les laminines, le nidogène, le collagène de type IV, la fibronectine et des PGs tels que le perlécan, l'agrine et le collagène de type XVIII (Erickson et Couchman, 2000). Ces HSPGs ont en premier lieu un rôle structural en contribuant au maintien de l'organisation de la lame basale, mais également un rôle fonctionnel, de par leur capacité à interagir avec un nombre important d'effecteurs cellulaires (Tableau 3).

Tableau 3. Expressions tissulaires et principaux rôles des protéoglycanes à héparanes sulfates de la lame basale

PGs de la lame basale	Expression tissulaire	Rôles biologiques	Références bibliographiques
Agrine (HS)	SNC et périphérique, poumons, rein, muscles	-Structuration de la membrane basale (B) -Participation à la réponse immunitaire en modulant l'activation des lymphocytes T (A) -Rôle clé dans la formation des synapses (B) -Rôle dans l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine dans le SNC et dans les muscles (B) - Facilite la formation des filopodes : les chaînes de HS de l'agrine transmembranaire augmentent l'activité intracellulaire de cdc42 et Rac1 impliquées dans le développement des filopodes (C) -Interaction avec la NCAM dans le contexte du développement des axones (D) -Interaction avec la laminine, la tenascine et le FGF-2 dans le développement du système visuel chez le poussin (D)	A-Jury et Kabouridis, 2010 B-McCarthy, 2015 C-Lin <i>et al.</i> , 2010 D-Cotman <i>et al.</i> , 1999
Collagène	Ubiquitaire	-Structuration de la membrane basale (A)	A-Marneros <i>et</i>

e de type XVIII (HS)		-Inhibition de l'angiogenèse et de la croissance tumorale des cellules endothéliales en induisant leur apoptose (A) -Rôle essentiel dans le développement oculaire et le maintien de la fonction visuelle (B) -Rôle dans l'adhésion cellulaire par interaction avec la L-sélectine et MCP-1 impliquées dans l'infiltration des leucocytes (C)	Olsen, 2005 B-Seppinen et Pihlajaniemi, 2011 C-Kawashima <i>et al.</i> , 2003
Perlécan (HS et CS)	Ubiquitaire	-Structuration de la membrane basale (B) -Rôle structural en assurant la stabilité des tissus : interaction avec des protéines de la MEC telles que l'élastine, la laminine et le collagène de type IV (B) -Rôle clé au niveau du cartilage : séquestration du FGF-2 et relargage au niveau des récepteurs des chondrocytes pour répondre aux forces de compression, promotion de l'adhésion et de la différenciation chondrocytaire et séquestration du FGF-18 et diminution des effets de ce facteurs de croissance sur la prolifération des chondrocytes (C) -Favorise l'angiogenèse cérébrale en déclenchant la libération de VEGF à partir de cellules endothéliales cérébrales (A)	A- Farach-Carson <i>et al.</i> , 2014 B- McCarthy, 2015 C- Smith <i>et al.</i> , 2007

4. Les HSPGs extracellulaires de type SPOCK

Les PGs extracellulaires de type SPOCK (*Sparc (Secreted protein acid and rich cystein) / Osteonectin, CWCV, Kazal-like domain*) regroupent les testicans 1 à 3. Ils s'organisent en 5 domaines : le domaine I, N-terminal, le domaine II, dit « *follistatin-like* », suivi du domaine III, domaine de liaison au calcium, le domaine IV, dit « *thyroglobulin-like* » et le domaine V, C-terminal, qui contient deux sites d'attachement pour les chaînes de HS (Figure 8).

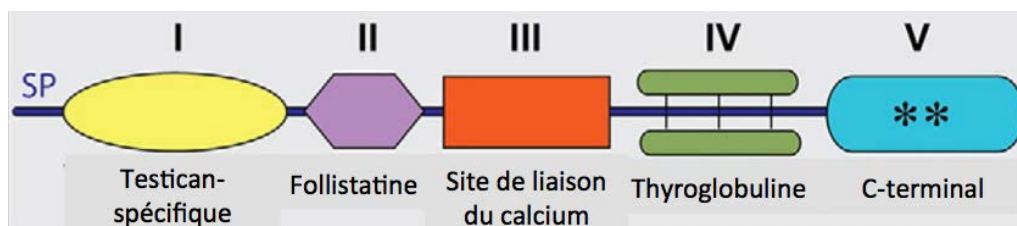


Figure 8. Représentation schématique de l'organisation modulaire des HSPGs de type SPOCK : les testicans

Les testicans sont organisés en 5 domaines : le domaine I, N-terminal, le domaine II, dit « *follistatin-like* », le domaine III, domaine de liaison au calcium, le domaine IV, dit « *thyroglobulin-like* » et le domaine V, C-terminal comportant deux sites d'attachement pour les chaînes de HS (*). SP : *signal peptide*. Modifié d'après Iozzo et Schaefer, 2015.

L'expression des différents testicans est tissu-spécifique : le testican 1 au niveau de l'hippocampe (Bonnet *et al.*, 1996), le testican 2 dans le cervelet, le cerveau, le poumon et les testicules (Vannahme *et al.*, 1999), alors que le testican 3 est exprimé dans tout le SNC (Hartmann *et al.*, 2013). Du fait de leur localisation préférentielle dans le SNC, ces PGs sont impliqués de façon importante dans la régulation du développement du SNC. En effet, des cellules de cervelet de souris cultivées sur une lame recouverte de laminine (connue pour induire la migration neurorale) en présence de testican-2 présentent une diminution significative de la croissance des neurites par rapport aux cellules cultivées en absence de testican-2. Ces données montrent l'effet inhibiteur du testican-2 sur la migration des neurones (Schnepp *et al.*, 2005) et sa capacité à moduler le développement cérébral.

II. LA BIOSYNTHESE DES CHAÎNES D'HÉPARANES SULFATES

La biosynthèse des chaînes des HS est un processus coordonné, complexe et hautement régulé faisant intervenir de nombreuses enzymes de synthèse et de maturation et qui a lieu dans l'appareil de Golgi. Elle peut être divisée en trois étapes (Figure 1) : **(i) la formation de l'amorce tétrasaccharidique** commune aux PGs à chaînes de HS et à chaînes de CS/DS impliquant des glycosyltransférases; **(ii) la polymérisation de la chaîne** de GAGs correspondant à l'ajout de l'unité disaccharidique constitutive des chaînes de HS contenant des résidus GlcA et GlcNAc liés par l'intermédiaire d'une liaison β 1,4 *O*-glycosidique ; **(iii) la maturation des chaînes de HS** par l'action séquentielle des *N*-déacétylases / *N*-sulfotransférases (NDSTs), de la C5-épimérase, de la 2-*O*-sulfotransférase (2-OST), des 6-*O*-sulfotransférases (6-OSTs), des 3-*O*-sulfotransférases (3-OSTs) et des 6-*O*-endosulfatases.

A. Etapes d'initiation de la biosynthèse des chaînes de HS

1. Formation de l'amorce tétrasaccharidique commune aux PGs à chaînes de HS et à chaînes de CS/DS (Figure 1)

La biosynthèse des PGs à chaînes de HS est initiée par la formation d'un tétrasaccharide $\text{GlcA}\beta$ 1-3 $\text{Gal}\beta$ 1-3 $\text{Gal}\beta$ 1-4 $\text{Xyl}\beta$ 1 permettant l'attachement de ces polysaccharides à la protéine *core* des PGs au niveau de sites d'attachement spécifiques pour les chaînes de GAGs. Le premier résidu xylose est transféré sur un résidu sérine situé à proximité d'un résidu glycine de la protéine *core* par l'action des xylosyltransférases XylT-I ou XylT-II, en utilisant comme substrat donneur l'UDP-Xyl (Esko et Zhang, 1996 ; Götting *et al.*, 2000). Deux résidus galactose sont ensuite successivement ajoutés par la β 1,4-galactosyltransférase 7 (β 4GalT7 ou GalT-I) (Okajima *et al.*, 1999) et par la β 1,3-galactosyltransférase 6 (β 3GalT6 ou GalT-II) (Bai *et al.*, 2001) en utilisant toutes les deux comme substrat donneur l'UDP-Gal. La formation de cette amorce est finalisée par l'addition d'un résidu d'acide glucuronique par la glucuronosyltransférase-I (GlcAT-I) qui transfère le groupement GlcA à partir de l'UDP-GlcA sur le trisaccharide $\text{Gal}\beta$ 1-3 $\text{Gal}\beta$ 1-4 $\text{Xyl}\beta$ 1 (Kitagawa *et al.*, 1998).

2. Modifications de l'amorce

L'amorce tétrasaccharidique peut ensuite subir plusieurs modifications : la phosphorylation du xylose sur le C2 (Oegema *et al.*, 1984 ; Fransson *et al.*, 1985) ainsi que les sulfatations des résidus galactose, en position 6 pour le premier Gal et en positions 4 et/ou

6 pour le second (Krishna et Agrawal, 2000 ; Kitagawa *et al.*, 2008). Il a été montré que ces modifications pouvaient moduler l'activité des glycosyltransférases impliquées dans la biosynthèse des GAGs (Gulberti *et al.*, 2005 et Gulberti *et al.*, 2012), et réguler la quantité et la nature du type de chaînes de GAGs polymérisés par la suite sur la protéine core vers les HS ou les CS/DS (Kreuger et Kjellén, 2012).

a) La phosphorylation du xylose sur l'hydroxyle en position 2

L'amorce peut tout d'abord être modifiée par une réaction de phosphorylation au niveau du xylose en position 2. Cette réaction est catalysée dans l'appareil de Golgi par la kinase FAM20B (*family with sequence similarity 20 member B*), enzyme qui a été récemment clonée. Il a été montré que sa surexpression dans les cellules HeLa conduit à une augmentation de la quantité de chaînes de HS et de CS produites, indiquant un rôle régulateur de la Fam20B sur la biosynthèse des chaînes de GAGs (Koike *et al.*, 2009). En effet, il a été montré que les dérivés xylosidiques 2-*O*-phosphorylés sont de meilleurs substrats accepteurs pour la β 3GalT6 et la GlcAT-I, et donc potentialisent le transfert du deuxième résidu Gal et du GlcA (Tone *et al.*, 2008). A l'inverse, ils ne sont pas substrats de la β 4GalT7, suggérant que la phosphorylation du Xyl pourrait servir de signal d'arrêt précoce de l'initiation de la biosynthèse des GAGs à cette étape (Gulberti *et al.*, 2005). Ainsi la 2-*O*-phosphorylation du Xyl est une modification responsable d'une régulation très fine des étapes d'initiation des chaînes de GAGs. Il est intéressant de noter que cette réaction de modification est réversible et peut impliquer une étape de déphosphorylation qui coïncide avec l'ajout du dernier résidu (GlcA) de l'amorce tétrasaccharidique (Moses *et al.*, 1997). Cette étape est catalysée par la 2-phosphoxylose phosphatase XYLP, récemment caractérisée par Koike *et al.* (2014) et décrite comme interagissant avec la GlcAT-I. Ces travaux ont également montré que l'amorce tétrasaccharidique phosphorylée n'est pas un bon substrat pour orienter la synthèse des chaînes de GAGs vers celle des chaînes de HS. Par conséquent, il semble que la déphosphorylation du xylose soit requise pour permettre l'initiation de la polymérisation des HS (Koike *et al.*, 2014).

b) La sulfatation des galactoses en position 6 et/ou 4

Le second type de modifications de l'amorce tétrasaccharidique correspond à des réactions de sulfatation sur les deux résidus Gal, sulfatations qui n'ont été décrites qu'au niveau des amorces portant des chaînes de GAGs de type CS/DS. Plus précisément, une sulfatation sur les hydroxyles en position 6 des deux résidus Gal1 et/ou Gal2 et/ou en position 4 sur le deuxième Gal ont été décrites (Krishna et Agrawal, 2000 ; Kitagawa *et al.*, 2008). A

l'inverse de la phosphorylation du Xyl, il semble que ces modifications peuvent discriminer la poursuite de la biosynthèse des GAGs en l'orientant plutôt vers celle des CS dans la mesure où aucune sulfatation n'a été observée sur les amorces des chaînes de HS. Il semblerait que la 4-*O*-sulfatation sur le Gal2 joue en particulier ce rôle déterminant dans l'initiation de la biosynthèse des chaînes de type CS (Ueno *et al.*, 2001). Il a également été montré que ces sulfatations modulent l'activité de la chondroïtine sulfate N-acétylgalactosaminyltransférase-1 (CSGalNacT-1), l'enzyme qui catalyse le transfert du premier résidu GalNac sur le GlcA terminal de l'amorce et initie la biosynthèse des chaînes de CS. Dans ce cas, les oligosaccharides analogues du substrat accepteur, sulfatés en 4 ou 6 sur le premier Gal et en C6 sur le deuxième résidu Gal, sont de meilleurs substrats pour la CSGalNacT-1 que leurs homologues non sulfatés (Gulberti *et al.*, 2012). En ce sens, la sulfatation des Gal de l'amorce tétrasaccharidique agirait comme un signal régulateur de l'initiation des chaînes de CS.

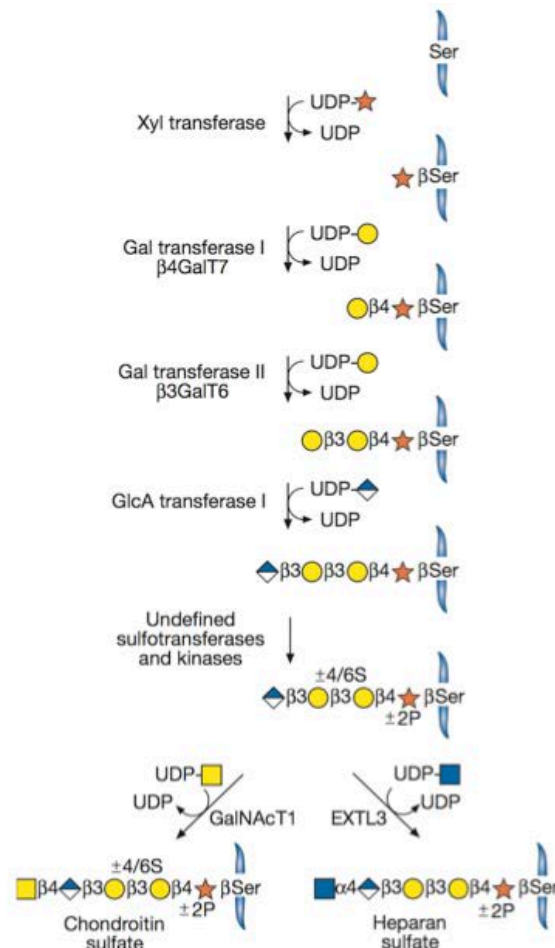


Figure 9. Initiation de la biosynthèse des chaînes de GAGs : formation de l'amorce tétrasaccharidique

La biosynthèse de l'amorce tétrasaccharidique a lieu dans l'appareil de Golgi et nécessite l'action séquentielle de glycosyltransférases. Elle est initiée par le transfert d'un résidu xylose sur un résidu sérine de la protéone core par les xylosyltransférases I et II, suivi de l'ajout de deux résidus galactose catalysé par les galactosyltransférases I (β 4GalT7) et II (β 3GalT6) respectivement et finalisée par le transfert d'un résidu d'acide glucuronique par la glucuronosyltransférase I (GlcAT- I). Cette amorce peut être modifiée suite à une phosphorylation du xylose et des sulfatations des galactoses. Les chaînes de GAGs de type HS ou CS/DS seront ensuite polymérisées (ou non) à partir de cette amorce modifiée. D'après Esko *et al.*, 2009.

B. Etapes d'élargissement des chaînes de HS

1. Mécanisme général d'élargissement et acteurs impliqués

Après la synthèse de l'amorce tétrasaccharidique [GlcA β 1-3-Gal β 1-3-Gal β 1-4-Xyl β 1], la polymérisation des chaînes de HS débute par l'addition d'un résidu GlcNAc, catalysée par les N-acétylglucosamine transférases I (GlcNAc-TI) EXTL2 et EXTL3, qui orientent la poursuite de la biosynthèse des chaînes de GAGs spécifiquement vers celle des HS. L'élargissement va ensuite se faire par addition séquentielle de l'unité disaccharidique [GlcA(β 1-4) - GlcNAc(α 1-4)], assurée par les enzymes EXT1 et EXT2 (*exostosine glycosyltransférases*) possédant une double activité N-acétylglucosaminyltransférase (GlcNAc-TII) et glucuronosyltransférase II (GlcA-TII) (Sugahara et Kitagawa, 2002 ; Busse-Wicher *et al.*, 2014) (Figure 10).

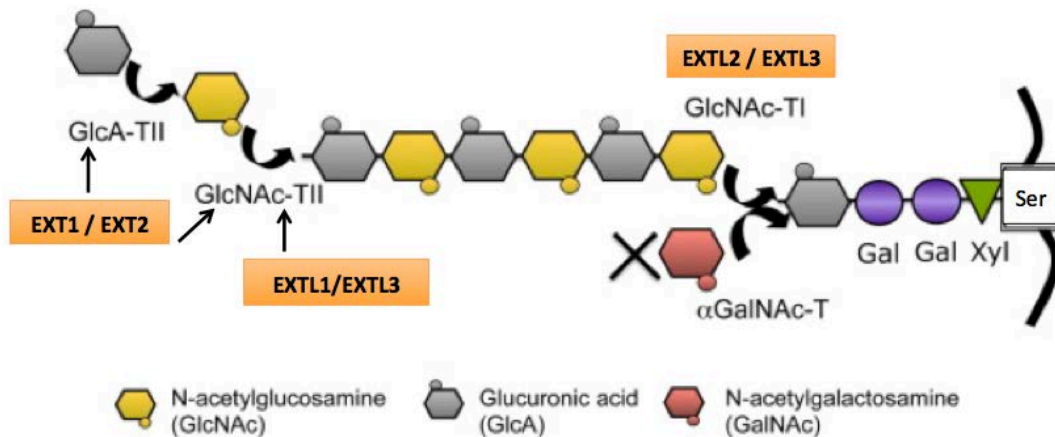


Figure 10. Représentation schématique de l'activité des glycosyltransférases impliquées dans l'élargissement des chaînes de HS

Après la biosynthèse du tétrasaccharide [GlcA(β 1-3)-Gal(β 1-3)-Gal(β 1-4)-Xyl(β 1)], les GlcNAc transférases I (GlcNAc-TI) EXTL2 ou EXTL3 ajoutent un résidu GlcNAc permettant de diriger l'élargissement des chaînes vers les HS. Puis le complexe enzymatique EXT1/EXT2 vient ajouter successivement les résidus GlcNAc et GlcA grâce à leur double activité N-acétylglucosaminyltransférase (GlcNAc-TII) et glucuronosyltransférase (GlcA-TII). Les EXTL1 et EXTL3 possèdent également une activité GlcNAc-TII et peuvent potentiellement intervenir dans l'élargissement des chaînes de HS. Modifié d'après Busse-Wicher *et al.*, 2014

A l'origine, seulement les EXT1 et EXT2 ont été décrites comme impliquées dans l'élargissement des chaînes de HS puis la famille des EXT a été étendue suite à l'identification de trois autres gènes dits « *EXT-like* » (EXTL) codant les EXTL1, EXTL2 et EXTL3 (Sugahara et Kitagawa, 2000). Ces cinq enzymes sont exprimées de façon ubiquitaire dans les tissus à l'exception de la EXTL1 qui est principalement retrouvée au niveau des muscles squelettiques, du cerveau et du cœur (Busse-Wicher *et al.*, 2014). Chacune des exostosines a

un rôle défini dans la biosynthèse des chaînes de HS et leur implication dans ce contexte est détaillé dans le paragraphe suivant (voir paragraphe C.2.a et b).

2. Implication des différentes exostosines dans l'élongation des chaînes de HS

a) Les « exostosines-like » glycosyltransférases : EXTL1, EXTL2 et EXTL3

L'appellation « exostosine-like » s'explique par le fait que les exostosines EXTL1, EXTL2 et EXTL3 présentent de fortes homologies de séquences avec les EXT1 et EXT2. En effet, les travaux de Wise *et al.*, (1997) et de Wuyts *et al.*, (1997) ont tout d'abord identifié les EXTL1 et EXTL2, homologues des séquences des EXT1 et EXT2. Les travaux de Van Hul *et al.*, (1998) ont ensuite identifié la EXTL3 comme un membre de la famille des exostosines en montrant une homologie de séquence génique entre la EXTL3 et la EXT1, EXT2, EXTL1 et EXTL2 et une identité de séquence protéique entre 26 et 31% selon l'exostosine. Les trois EXTLs sont capables de catalyser le transfert d'un résidu GlcNAc sur un GlcA, mais à des étapes différentes de la biosynthèse et donc elles ont chacune des spécificités de substrats différentes (Busse *et al.*, 2007).

L'implication de l'EXTL1 dans la biosynthèse des chaînes de HS n'est pas encore clairement décrite. Une étude réalisée en transfectant les cellules COS-1 par un plasmide contenant le gène *EXTL1*, a montré qu'un substrat accepteur oligosaccharidique de type N-acetylheparosane ($\text{GlcA}\beta 1-4\text{GlcNAc}\alpha 1-(4\text{GlcA}\beta 1-4\text{GlcNAc}\alpha 1-)_n$), mimant une chaîne de HS en cours de polymérisation et présentant un résidu GlcA à son extrémité non réductrice, est reconnu comme substrat par l'EXTL1 puisqu'elle est capable d'y transférer un résidu GlcNAc à partir du donneur UDP-[³H]GlcNAc (Kim *et al.*, 2001). A l'inverse, l'EXTL1 n'est pas capable de transférer un résidu GlcA (à partir de l'UDP-[¹⁴C]GlcA) sur un substrat oligosaccharidique de type N-acetylheparosan ($\text{GlcNAc}\alpha 1-(4\text{GlcA}\beta 1-4\text{GlcNAc}\alpha 1-)_n$), présentant un résidu GlcNAc à son extrémité non réductrice indiquant que l'EXTL1 ne possède pas d'activité GlcAT, mais uniquement une activité GlcNAcT. Dans le même sens, elle ne peut pas non plus transférer un GlcA sur l'amorce trisaccharidique en cours de synthèse $\text{Gal}\beta 1-3\text{Gal}\beta 1-4\text{Xyl}$ (Kim *et al.*, 2001). D'après ces résultats, il a été proposé que l'EXTL1 présente une activité N-acétylglucosaminyl transférase II (GlcNAcT-II) et serait donc exclusivement impliquée dans l'élongation des chaînes de HS (Kim *et al.*, 2001).

Parmi les trois EXTL, l'EXTL2 est la seule à présenter à la fois une activité GlcNAcT et une activité N-acétylgalactosaminyltransférase (GalNAcT), ce qui lui permet de transférer soit un résidu GlcNAc, soit un résidu GalNAc sur l'amorce tétrasaccharidique. Cette double capacité confère à cette enzyme un rôle clé dans l'orientation de la poursuite de la biosynthèse des chaînes de GAGs vers celle des HS ou des CS/DS (Kitagawa *et al.*, 1999). Cependant, l'amorce tétrasaccharidique porteuse d'un résidu GalNAc n'est pas un substrat accepteur pour les glycosyltransférases impliquées dans l'élongation (EXT1 et EXT2), indiquant que l'ajout de ce résidu par l'EXTL2 serait alors plutôt un signal d'arrêt de la biosynthèse des chaînes de HS, et donc une autre façon de réguler les voies de biosynthèse (parallèlement aux modifications de l'amorce décrites dans la partie II.A.2). Des études récentes se sont intéressées au rôle de l'EXTL2 dans ce contexte. Elles ont permis de mettre en évidence que le transfert d'un résidu GlcNAc sur l'amorce tétrasaccharidique contenant un résidu xylose phosphorylé empêche l'élongation de la chaîne. Ce résultat a été confirmé par les travaux de Koike *et al.*, (2014) qui ont montré que la 2-*O*-phosphorylation du xylose de l'amorce n'est pas une caractéristique structurale favorable à l'orientation de la synthèse des GAGs vers celle des HS. D'autre part, dans des cellules de foie de souris déficientes en EXTL2, la production de HS et de CS est significativement augmentée (Nadanaka *et al.* 2013), ce qui indiquerait que l'EXTL2 n'est pas indispensable à l'initiation de la polymérisation des chaînes de HS. Ce résultat a été confirmé par une étude *in vitro* réalisée sur les cellules HEK 293 dans lesquelles l'expression de l'EXTL2 éteinte par un siRNA conduit à une augmentation du nombre de chaînes de HS produites (Katta *et al.*, 2015). L'ensemble de ces données serait ainsi en faveur d'un rôle secondaire de l'EXTL2 dans l'élongation de la chaîne de HS lorsque l'amorce contient un résidu xylose phosphorylé par exemple.

Enfin, le dernier membre de cette famille, l'EXTL3, a une activité GlcNAcT responsable du transfert d'un résidu GlcNAc aussi bien sur l'amorce tétrasaccharidique (activité GlcNAc-TI) que sur les chaînes de HS en cours de polymérisation (activité GlcNAc-TII) (Kim *et al.*, 2001). Par conséquent, l'EXTL3 pourrait avoir un rôle à la fois dans l'orientation de la biosynthèse des chaînes de HS et dans leur élongation. Son activité enzymatique étant nettement supérieure à celles des EXTL1 et EXTL2, l'EXTL3 semble être le meilleur candidat pour ajouter le premier résidu GlcNAc sur l'amorce tétrasaccharidique grâce à son activité GlcNAc-TI (Zak *et al.*, 2002). Cependant, des études ont permis de nous renseigner sur l'activité prédominante de l'EXTL3, entre l'activité GlcNAc-TI et l'activité GlcNAc-TII. En effet, une étude a révélé que l'utilisation de siRNA, spécifiquement dirigés contre le gène *EXTL3* dans les cellules HEK293, conduit à la synthèse de chaînes de HS plus

longues que dans les cellules contrôles. La surexpression de l'EXTL3 n'a quant à elle pas d'effet sur la longueur des chaînes de HS (Busse et al., 2007). Les auteurs ont suggéré que l'inhibition de l'activité de l'EXTL3 induirait une baisse de la quantité de substrat se terminant par un résidu GlcNAc [GlcA β 1-3-Gal β 1-3-Gal β 1-4-Xyl β 1] nécessaire pour initier l'élongation de nouvelles chaînes de HS. La diminution de ces substrats induirait une réduction du nombre de chaînes mais serait en faveur d'une plus grande élongation des quelques chaînes en cours de polymérisation. (Busse-Wicher *et al.*, 2014). D'autre part, aucun HS n'a été détecté dans des embryons de souris âgées de 9 jours n'exprimant pas l'EXTL3 (Takahashi *et al.*, 2009). Ces résultats sont plutôt en faveur du rôle primordial de l'EXTL3 dans l'initiation de l'élongation des HS de par son activité GlcNAc-TI.

b) Les exostosines glycosyltransférases EXT1 et EXT2

Les EXT1 et EXT2 sont des protéines transmembranaires de 746 et 718 acides aminés respectivement présentant toutes les deux une topologie membranaire de type II. Elles sont constituées d'un court domaine cytoplasmique N-terminal, d'un seul domaine transmembranaire d'une quinzaine d'acides aminés et d'un long domaine C-terminal comprenant la partie catalytique et les domaines de fixation des substrats. Les séquences protéiques de ces enzymes contiennent des séquences riches en cystéines, dont la fonction n'est pas encore élucidée, et des motifs DXD (quatre dans l'EXT1, et un dans l'EXT2) caractéristique des glycosyltransférases utilisant des UDP-sucre comme substrats donneurs (Wuyts *et al.*, 1998 ; Breton *et al.*, 1998 ; Zak *et al.*, 2002). Les mécanismes régulant l'expression et l'activité de ces enzymes ne sont pas connus à l'heure actuelle. Des études ont montré que des mutations des gènes *EXT1* et *EXT2* sont corrélées à la maladie des exostoses multiples (HME, *Hereditary Multiple Exostoses*) qui se caractérise par la formation d'excroissances osseuses situées au niveau des plaques de croissance des os longs (Solomon, 1965 ; Zak *et al.*, 2002).

Les EXT1 et EXT2 forment un complexe hétéro-oligomérique permettant leur accumulation conjointe dans l'appareil de Golgi alors qu'elles sont localisées majoritairement dans le réticulum endoplasmique lorsqu'elles sont surexprimées indépendamment l'une de l'autre. L'activité enzymatique du complexe EXT1/EXT2 est d'ailleurs supérieure à celle obtenue lorsque chacune se trouve sous forme monomérique (Kobayashi *et al.*, 2000 ; McCormick *et al.*, 2000). Ceci indique que, même si la seule présence de l'EXT1 soit capable d'induire la polymérisation des chaînes de HS, l'association des deux EXTs est indispensable pour le fonctionnement optimal des enzymes assurant l'élongation des GAGs. Des études ont

mis en évidence la double activité de ces enzymes : à la fois GlcNAc-transferase et GlcA-transferase (GlcNAc-TII and GlcA-TII). De ce fait, elles sont considérées comme les enzymes assurant l'élongation des HS en ajoutant successivement les résidus du motif disaccharidique constitutif des HS (Lind *et al.*, 1998 ; McCormick *et al.*, 2000 ; Senay *et al.*, 2000).

Pour aller plus loin dans leur caractérisation fonctionnelle, une étude a montré que l'utilisation de siRNA spécifiquement dirigés contre les gènes *EXT1* et *EXT2* dans les cellules HEK293, conduit à la synthèse de chaînes de HS plus courtes que dans les cellules contrôles. A l'inverse, la surexpression de l'*EXT1* dans ces cellules montre une augmentation de la longueur des chaînes de HS, qui est d'autant plus prononcée quand l'*EXT2* est surexprimée. La surexpression de l'*EXT2* seule n'a, quant à elle, pas d'effet sur la longueur des chaînes de HS (Busse *et al.*, 2007). Ces résultats permettent de montrer que les *EXT1* et *EXT2* sont impliquées dans l'élongation des chaînes de HS et que l'*EXT2* permet d'améliorer l'efficacité de l'*EXT1*.

De façon intéressante, le niveau d'expression des *EXT1* et *EXT2* régule positivement ou négativement celui de la *NDST1* (*N*-décacétylase *N*-sulfotransférase 1), qui est la première enzyme de maturation des chaînes de HS (voir paragraphe C.2.). En effet, une surexpression de l'*EXT2* dans les cellules HEK 293 a pour effet une augmentation de l'expression de la *NDST1* à l'origine d'une augmentation de la *N*-glycosylation des résidus GlcNAc par cette même enzyme. Il en résulte donc une élévation de la sulfatation des HS pouvant être à l'origine de la dérégulation des interactions des HS avec différents ligands protéiques. La surexpression de l'*EXT1* produit quant à elle les effets inverses, à savoir une diminution de l'expression de la *NDST1* associée à une diminution de la sulfatation des HS. Des expériences d'immunoprécipitation ont permis de mettre en évidence une interaction entre l'*EXT2* et la *NDST1*, suggérant une compétition entre les *EXT1* et *NDST1* pour l'interaction avec l'*EXT2*. La formation de ces complexes enzymatiques est donc déterminante d'un point de vue fonctionnel et illustre le concept de « GAGosome » défini comme étant un complexe d'enzymes participant à la biosynthèse des GAGs, ici des HS (Presto *et al.*, 2008).

C. Maturation des chaînes d'héparanes sulfates

1. Mécanisme général de maturation

La maturation des chaînes de HS est un processus complexe faisant intervenir de nombreuses enzymes (près de vingt-cinq) qui vont agir de façon ordonnée et séquentielle pour maturer le précurseur non sulfaté précédemment polymérisé (Figure 11). Ce processus

comprend cinq étapes : **(i)** la *N*-déacétylation / *N*-sulfatation des résidus GlcNAc catalysée par les *N*-déacétylases / *N*-sulfotransférases (NDSTs), **(ii)** la C5-épipimérisation des résidus GlcA en IdoA *via* l'action de la C5-épipimérase, **(iii)** la 2-*O*-sulfatation préférentielle des résidus IdoA et dans une moindre mesure des résidus GlcA par la 2-*O*-sulfotransférase (2-OST ou HS2ST), **(iv)** la 6-*O*-sulfatation des résidus glucosamine par une famille de 6-*O*-sulfotransférases (6-OSTs ou HS6STs), et plus rarement **(v)** la 3-*O*-sulfatation des résidus GlcNS catalysée par la plus grande famille de sulfotransférases, les 3-*O*-sulfotransférases (3-OSTs ou HS3STs). Toutes ces enzymes catalysent le transfert de groupements sulfates à partir du même donneur, le PAPS (3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate) sur différentes positions des résidus de la chaîne en cours de polymérisation au sein de l'appareil de Golgi. Une modification supplémentaire peut être apportée au niveau de la surface des cellules par l'action des 6-*O*-endosulfatases (Sulfs) qui sont responsables de la désulfatation en C6 des résidus GlcNS6S. Toutes ces modifications confèrent une grande hétérogénéité structurale et fonctionnelle aux HS en créant en particulier des motifs de reconnaissance pour l'activation et la liaison de nombreux ligands protéiques, donnant aux HSPGs un rôle majeur dans la régulation de multiples processus physiopathologiques.

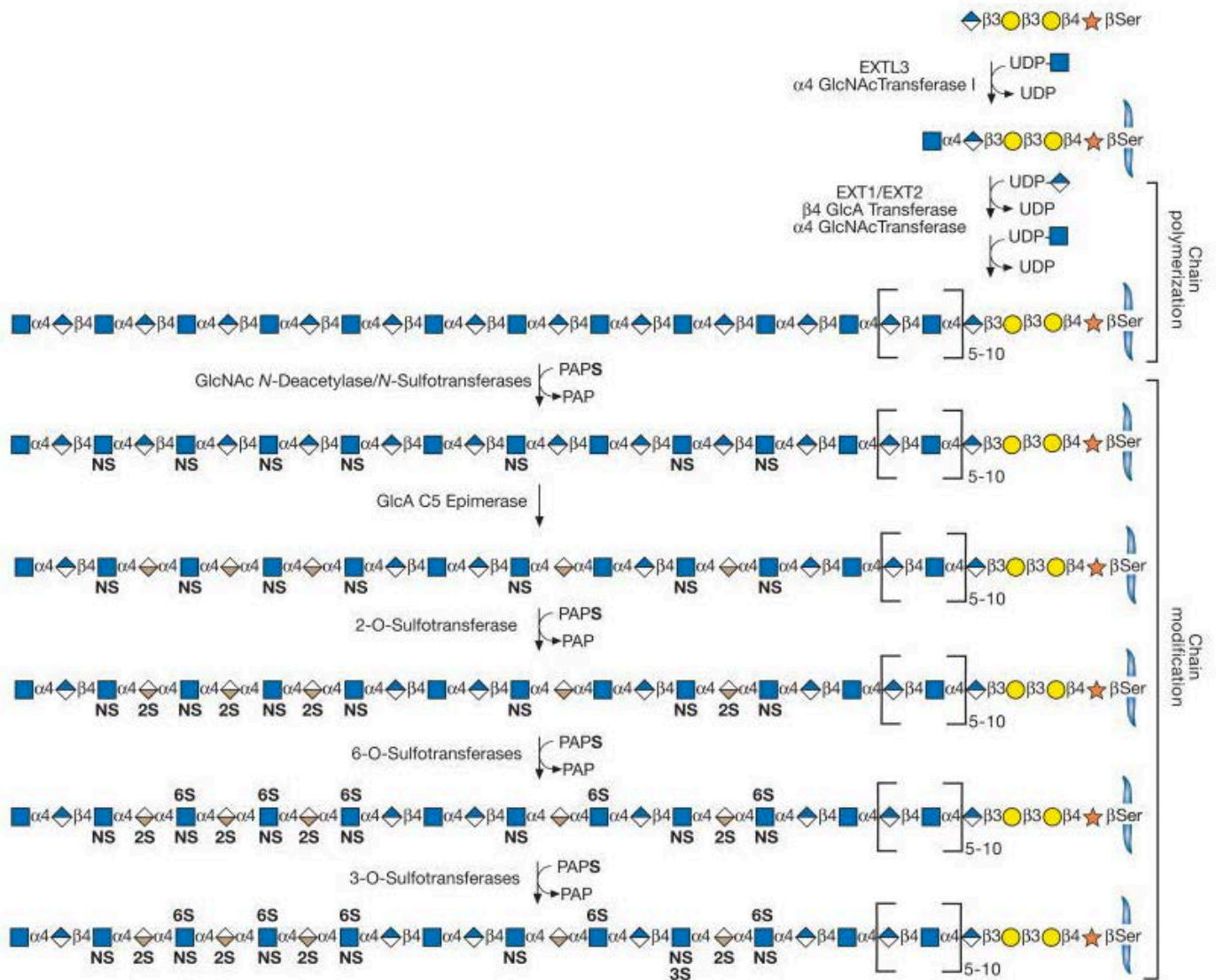


Figure 11. Représentation schématique des étapes séquentielles de la maturation des chaînes de HS

Parallèlement à leur polymérisation, les chaînes de HS subissent de nombreuses modifications apportées par l'action séquentielle d'enzymes de maturation. La première modification est catalysée par les NDSTs (*N*-déacétylases / *N*-sulfotransférases) permettant la *N*-déacétylation suivie de la *N*-sulfatation des résidus GlcNAc. La C5-épimérase va ensuite conduire à la transformation des résidus GlcA en IdoA et la 2-*O*-sulfotransférases va ajouter un groupement sulfate en C2 des résidus IdoA préférentiellement. Finalement les 6-*O*-sulfotransférases et plus rarement les 3-*O*-sulfotransférases vont catalyser respectivement la 6-*O*-sulfatation et la 3-*O*-sulfatation des résidus glucosamine. D'après Esko *et al.*, 2009.

2. Les *N*-déacétylases / *N*-sulfotransférases (NDSTs)

Les réactions de modifications de la chaîne de HS sont initiées par une réaction de *N*-déacétylation suivie d'une *N*-sulfatation assurée par une famille d'enzymes bi-fonctionnelles nommées *N*-déacétylases / *N*-sulfotransférases (NDSTs). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement sulfate provenant du donneur PAPS sur les résidus GlcNAc de la chaîne en cours d'élongation. Plus précisément, l'activité de la *N*-déacétylase élimine les groupements acétyles des résidus GlcNAc, générant des groupements amines libres en position 2 du sucre,

groupements qui seront ensuite sulfatés par l'activité *N*-sulfotransférase. La présence de ces résidus *N*-sulfatés (GlcNS) est essentielle pour la réalisation des modifications suivantes au cours de la biosynthèse puisque sans *N*-sulfatation, il ne peut pas se produire de *O*-sulfatation, ni de conversion des résidus GlcA en IdoA (réactions décrites dans les paragraphes 3-4-5 et 6 suivants). Ainsi, les modifications ultérieures des chaînes de HS dépendent initialement et exclusivement de la présence des résidus GlcNS, faisant des NDSTs les premiers responsables de la diversité structurale et fonctionnelle de ces GAGs. En effet, cette première modification des chaînes de HS va déterminer leur capacité à interagir avec de nombreuses molécules cibles notamment des effecteurs cellulaires comme les facteurs Wnt, ethedgehog ou encore avec les complexes ligand/récepteur comme FGF/FGFR (Grobe *et al.*, 2002 ; Kjéllen, 2003).

Quatre NDSTs ont été identifiées chez l'Homme : les NDST-1 et -2 sont exprimées de façon ubiquitaire à la fois durant le développement embryonnaire et au stade adulte alors que les NDST-3 et -4 sont exprimées majoritairement au stade fœtal. Leur expression est réduite aux tissus neuronaux chez l'adulte (voir Tableau 4, Kusche-Gullberg et Kjéllen, 2003).

Tableau 4. Spécificités de substrats et expressions tissulaires des *N*-déacétylases / *N*-sulfotransférases (NDSTs). Adapté de Kusche-Gullberg et Kjéllen, 2003

Isoformes des NDSTs	Substrats accepteurs	Expression tissulaire
NDST-1	-GlcA (β1-4)- GlcNAc(α1-4)-	Ubiquitaire
NDST-2	-GlcA (β1-4)- GlcNAc(α1-4)-	Ubiquitaire
NDST-3	-GlcA (β1-4)- GlcNAc(α1-4)-	Cerveau (adulte) Ubiquitaire (stade fœtal)
NDST-4	-GlcA (β1-4)- GlcNAc(α1-4)-	Cerveau (adulte) Ubiquitaire (stade fœtal)

Les NDSTs sont des protéines transmembranaires de l'appareil de Golgi, présentant une topologie membranaire de type II et un poids moléculaire apparent d'environ 100 kDa. Elles sont organisées en trois domaines : un domaine cytoplasmique de 12 à 18 acides aminés, un domaine transmembranaire de 22 acides aminés et une région « tige » de taille variable (environ 40 acides aminés) selon les isoformes, suivie par le domaine catalytique contenant

deux sites actifs indépendants porteurs des activités de *N*-déacétylation et de *N*-sulfatation responsables du caractère bi-fonctionnel de ces enzymes (Grobe *et al.*, 2002).

Des alignements de séquences protéiques mettent en évidence 70% de similarité entre les NDST-1 et -2. La NDST3 présente quant à elle, 86 et 82% de similarité avec les NDST-1 et -2 respectivement. La NDST4 contient 70, 66 et 80% d'identité de séquence avec les NDST-1, -2 et -3 respectivement. La similitude de séquences entre les différentes NDSTs et leur organisation structurale similaires suggère qu'elles proviendraient d'un gène ancestral commun (Humphries *et al.*, 1998 ; Aikawa et Esko, 1999 ; Aikawa *et al.*, 2001). A ce jour, seul le domaine *N*-sulfotransférase de la NDST-1 en complexe avec le PAPS a été cristallisé (Kakuta *et al.*, 1999). Il est composé de cinq brins β parallèles reliés entre eux par des hélices α . Deux sites de fixation du PAPS ont été mis en évidence : le site 5'PSB (*5'-PhosphoSulfate Binding motif*) et le site 3'PB (*3'- Phosphate Binding motif*). Ces éléments lui confèrent une structure sphérique présentant un sillon ouvert capable d'accueillir un hexasaccharide (Kakuta *et al.*, 1999). Des études de mutagenèse dirigée et de modélisation moléculaire ont permis de mettre en évidence que les résidus Lys-614, -833, la Glu-642 et l'His-716 ont un rôle critique dans l'activité catalytique de la NDST-1 et dans le positionnement du PAPS dans le site actif (Sueyoshi *et al.*, 1998 ; Gorokhov *et al.*, 2000 ; Gesteira *et al.*, 2013).

Un certain nombre d'études indiquent que les différentes isoformes des NDSTs sont soumises à une régulation spatio-temporelle au cours de la biosynthèse des HS. En effet, il a déjà été suggéré que les différentes isoformes peuvent travailler ensemble sur le même résidu osidique en précisant que deux ou plusieurs d'entre elles pourraient être situées dans des compartiments différents du Golgi et agirait de ce fait sur le polysaccharide à différents stades de maturation de la chaîne (Esko et Selleck, 2002 ; Bengtsson *et al.*, 2003). Pour étudier dans quelle mesure les isoformes des NDSTs modifient la structure des chaînes de HS, les formes murines de la NDST-1 ou la NDST-2 ont été surexprimées dans les cellules HEK 293 (Pikas *et al.*, 2000). Cela a permis de mettre en évidence que le niveau de *N*-sulfatation augmente dans les cellules transfectées avec la NDST-1 avec un degré de *N*-sulfatation des HS de 60% et d'autant plus dans les cellules transfectées avec la NDST-2 pour lesquelles le degré de *N*-sulfatation des HS atteint 80%. Ces données suggèrent que la *N*-sulfatation catalysée par la NDST2 est plus efficace. De plus, les domaines *N*-sulfatés les plus étendus, en terme de longueur, sont retrouvés dans les cellules transfectées par la NDST-2. Ces données témoignent d'une plus forte activité de l'isoforme 2 et montrent que les NDST-1 et-2 synthétisent des chaînes de HS avec des profils de sulfatation différents. (Pikas *et al.*, 2000). Ainsi, en plus de leur activité sur la *N*-sulfatation globale des chaînes, les NDSTs jouent

également un rôle dans la détermination des domaines *N*-sulfatés spécifiques des HS qui contribuent de façon majeure à la structure des chaînes de HS, aux étapes suivantes de maturation et à leurs fonctions biologiques (Pikas *et al.*, 2000). D'autres études ont montré que l'extinction de l'expression de la NDST-1 réduit la proportion de groupements *N*-sulfatés dans les chaînes de HS alors que ceci n'est pas observé suite à l'extinction de l'expression de la NDST-2. (Deligny *et al.*, 2010 ; Raman *et al.*, 2011). Ces données suggèrent que la NDST2 n'est pas capable de catalyser la *N*-sulfatation des résidus GlcNAc en absence de NDST1 et que la NDST1 est indispensable à la réaction de *N*-déacétylation / *N*-sulfatation des chaînes de HS. Ainsi ces NDSTs n'auraient donc pas une activité redondante dans la production de séquences *N*-sulfatés, dans le sens où elles sont complémentaires.

Il est également important de noter que le ratio entre les activités *N*-déacétylases et *N*-sulfotransférases est variable selon les isoformes de NDSTs. La NDST-3 présente une activité déacétylase plus élevée et une activité sulfotransférase plus faible que celle des NDST-1 et -2 alors que la NDST-4 montre une activité déacétylase plus faible et une activité sulfotransférase identique à celle des NDST-1 et -2 (Aikawa *et al.*, 2001). Le niveau d'expression de chaque enzyme et leurs propriétés enzymatiques spécifiques leur permettraient ainsi de déterminer le degré de *N*-sulfatation des HS (Esko et Selleck, 2002) et donc renforce leur importance biologique en terme de fonctionnalité des HS.

La plus forte activité de la NDST-2 par rapport à la NDST-1 a été confirmée par des expériences d'inactivation génique chez la souris. La déficience en NDST-1 entraîne une diminution du taux de sulfatation des chaînes de HS et conduit une létalité néonatale élevée associée à des malformations importantes au niveau des poumons, du squelette, du cerveau et des yeux (Ringvall *et al.*, 2010). Les souris déficientes en NDST2 sont quant à elles viables et fertiles. L'absence d'expression de la NDST-2 n'a pas d'influence sur la synthèse des chaînes de HS, mais conduit cependant à une diminution de la sulfatation des chaînes d'héparine associée à une diminution du nombre de mastocytes dans les tissus conjonctifs. Ces cellules déficientes en NDST-2 ont une morphologie altérée et leur contenu en histamine et protéases sont sévèrement réduits. Ce résultat indique que l'un des sites d'action de l'héparine se situerait à l'intérieur des mastocytes du tissu conjonctif pour assurer les mécanismes de sécrétion des protéines de défenses qui seraient donc dépendants de la *N*-sulfatation catalysée par la NDST-2 (Forsberg *et al.*, 1999 ; Ledin *et al.*, 2004 ; Ringvall et Kjellen, 2010). Des études ont également été réalisées chez les souris déficientes en NDST-3 qui présentent un taux de sulfatation normal au niveau des chaînes de HS et n'ont pas de problème de développement particulier (Pallerla *et al.*, 2008). Ces résultats mettent en évidence une

implication moindre de l'isoforme 3 dans le processus de *N*-déacétylation / *N*-sulfatation et suggèrent également un mécanisme de compensation par les autres isoformes si l'une est absente.

Malgré l'importance de cette réaction, les mécanismes de régulation mis en jeu sont encore mal connus. Cependant, quelques travaux ont mis en évidence des variations d'expression des NDSTs lors de processus inflammatoires et dans des pathologies comme le cancer.

Dans le cadre de l'étude des réactions inflammatoires, une étude a démontré que les cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et le TNF- α) peuvent augmenter l'expression de la NDST-1, conduisant à un nombre plus abondant de HS sulfatés à la surface cellulaire. La présence d'un nombre plus important de motifs *N*-sulfatés sur les HS entraîne une augmentation de la capacité de liaison des HS à certains effecteurs, comme la chimiokine RANTES (également appelée CCL5, *C-C Motif Chemokine Ligand 5*), qui joue un rôle majeur dans le recrutement des leucocytes au niveau des sites d'inflammation (Carter *et al.*, 2003). Une autre étude réalisée sur des souris déficientes a montré qu'en absence de NDST-1, la capacité de liaison des L-sélectines aux HS membranaires des cellules endothéliales est diminuée. Il en résulte une diminution de la capacité d'adhésion des neutrophiles, qui fait intervenir les L-sélectines, et une diminution de leur capacité d'infiltration dans les tissus. Ces données montrent donc l'importance fonctionnelle de la *N*-sulfatation des HS dans la mise en place de la réponse inflammatoire (Wang *et al.*, 2005).

Dans certains types de cancers, une variation de l'expression des NDSTs peut également être observée. En effet, dans les cellules de mélanomes, l'expression de la protéine Epac (*Exchange Protein directly Activated by cAMP*), un effecteur intracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G, est corrélée positivement à celle de NDST-1. Lorsque la protéine Epac est inhibée, l'expression de la NDST1 est réduite ainsi que la quantité de HS *N*-sulfatés. De façon intéressante, la diminution de *N*-sulfatation des HS est corrélée avec une diminution de la migration et de l'agressivité de ces cellules tumorales puisque que les motifs *N*-sulfatés des HS permettent aux HS de jouer le rôle de co-récepteurs du PDGFR (*Platelet Derived Growth Factor Receptor*) et FGFR (*Fibroblast Growth Factor Receptor*) (Baljinnayam *et al.*, 2011). Ces travaux suggèrent que la *N*-sulfatation des HS médiée par les NDSTs est un processus favorisant la tumorigénèse. L'inhibition de l'expression de ces enzymes pourrait donc être un moyen d'empêcher le développement tumoral.

3. La C5-épipimérase

Après la réaction de *N*-décétylation/*N*-sulfatation, la seconde modification des chaînes de HS consiste en une épimérisation de certains résidus d'acide D-glucuronique en acide L-iduronique. Cette réaction est catalysée par la D-glucuronyl C5-épipimérase (Glce) (Qin *et al.*, 2015) dont le mécanisme d'action consiste en une élimination/addition d'un proton en position C5 de l'acide hexuronique (Valla *et al.*, 2001, Figure 12).

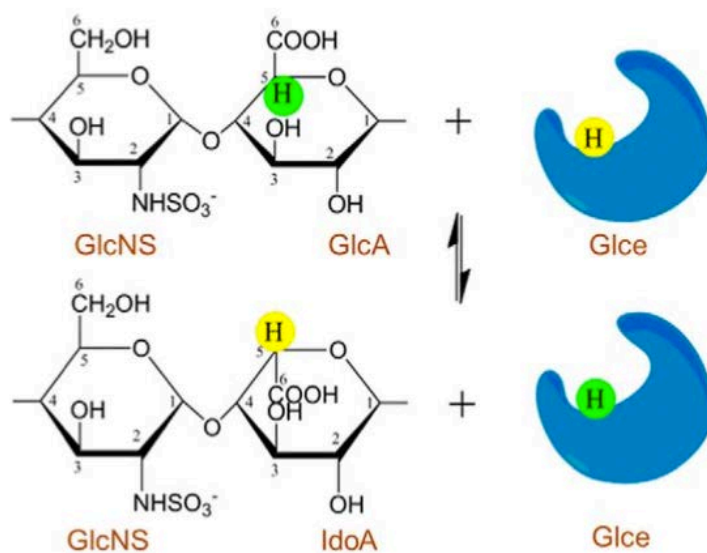


Figure 12. Représentation schématique de la réaction de C5 épimérisation lors de la maturation des chaînes de HS

L'enzyme responsable de la réaction de C5 épimérisation est la D-glucuronyl C5-épipimérase (Glce). Elle permet de convertir le résidu d'acide glucuronique (GlcA) des chaînes de HS en résidu d'acide iduronique (IdoA). Cette réaction contribue à augmenter la diversité structurale et fonctionnelle ainsi que la flexibilité des chaînes de HS et régule leur capacité d'interaction avec des ligands protéiques. D'après Qin *et al.*, 2015).

Une seule isoforme de la C5-épipimérase est retrouvée chez les Mammifères et présente une structure très conservée aussi bien au niveau des séquences nucléotidiques que des séquences en acides aminés avec entre 96 et 99% d'identité entre la forme murine, bovine et humaine (Crawford *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2001). La Glce présente une topologie transmembranaire de type II. Elle est composée d'un domaine cytoplasmique de 11 acides aminés, d'un domaine transmembranaire de 17 acides aminés et d'une tige extracellulaire comportant le site actif (Crawford *et al.*, 2001). Des travaux récents ont permis d'identifier des résidus fonctionnels importants, en particulier les tyrosines 468, 528 et 546, décrites comme étant cruciales pour l'activité enzymatique (Qin *et al.*, 2015). Comme les autres enzymes impliquées dans la maturation des HS, la Glce est localisée dans l'appareil de Golgi

et plus précisément dans le compartiment médian (Pinhal *et al.*, 2001). La réversibilité de la réaction de C5-épipimérisation demeure controversée. En effet, des études ont montré qu'elle est réversible *in vitro* mais irréversible *in vivo* (Hagner-McWhirter *et al.*, 2004). Au contraire, d'autres études ont montré une activité réversible ou irréversible dépendante de la structure du substrat (Sheng *et al.*, 2012). La réversibilité de la réaction de C5-épipimérisation a été observée en utilisant le substrat octasaccharidique [GlcA-GlcNS-GlcA-GlcNS-GlcA-GlcNAc-GlcA-AnMan], alors qu'une réaction irréversible a été observée avec le substrat octasaccharidique [GlcA-GlcNAc-GlcA-GlcNS-GlcA-GlcNS-GlcA-AnMan]. La différence entre les deux substrats venant de la position des résidus GlcNS, il a été suggéré que le caractère réversible ou non de la C5-épipimérisation venait de la capacité de la Glce à reconnaître la distribution des résidus GlcNS au sein du substrat et d'adapter son activité catalytique de façon à rendre la réaction réversible ou non. C'est ce qu'on appelle la traduction du code de *N*-sulfatation des HS (Sheng *et al.*, 2012).

Cette étape d'épipimérisation a pour conséquence d'augmenter la diversité structurale et fonctionnelle ainsi que la flexibilité des chaînes de HS. Elle est essentielle pour la fonction des HS dans la reconnaissance des ligands et la signalisation cellulaire. En effet, des travaux ont montré que l'absence de C5-épipimérisation contribue à diminuer la fixation du FGF-2 sur les chaînes de HS (Jia *et al.*, 2009). De plus, elle régule les autres modifications apportées sur les résidus puisque l'absence de Glce, et par conséquent l'absence de résidus IdoA et de 2-*O*-sulfatation sur ces résidus, est compensée par une augmentation des réactions de *N*- et -*O*-sulfatation des résidus glucosamine (Li, 2010). Après épimérisation par la Glce, les chaînes de HS sont maturées par les réactions de sulfatation (2-*O*, 6-*O* et 3-*O*) conduisant à la formation de produits qui ne sont plus reconnus comme substrats par la Glce (Jacobsson *et al.*, 1984). Ceci témoigne du fonctionnement séquentiel et ordonné de ces enzymes de maturation.

La régulation de l'expression de la Glce dépend notamment de modifications épigénétiques. En effet, il a été montré que son expression, initialement très faible dans les cellules de cancer de sein MCF-7 et T-47D, est augmentée suite au traitement de ces cellules par des inhibiteurs des marques épigénétiques comme la Trichostatine A (TSA, inhibiteur des histone-désacétylases) seule ou en association avec la 5-deoxyazacytidine (5-aza-dC, inhibiteur des méthyltransférases). Ces inhibiteurs permettent un relâchement de la chromatine, ce qui la rend accessible aux facteurs de transcription. D'ailleurs, l'augmentation de l'expression de la Glce suite aux traitements est expliquée par une augmentation de l'interaction du promoteur du gène *Glce* avec le complexe β -caténine / TCF-4 (*T-cell Factor 4*) (Mostovich *et al.*, 2012). Ce complexe est connu pour être impliqué dans l'activation transcriptionnelle du gène *Glce*

(Ghiselli et Agrawal, 2005). Un autre mécanisme impliquant le microARN-218 (miRNA-218) contribue à la régulation du niveau d'expression de la Glce dans les cellules cancéreuses de sein MCF-7. En effet, des études ont montré une corrélation négative entre l'expression du miRNA-218 et le niveau d'expression de la protéine Glce, indiquant que le miRNA-218 exerce une répression de l'expression de la Glce conduisant à une diminution du niveau d'expression de la protéine et à une réduction de la C5-épimérisation (Prudnikova *et al.*, 2012).

Bien que la C5-épimérase soit exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus (Li *et al.*, 2001), son expression peut être modulée de façon particulière en situation pathologique. Des études récentes ont mis en évidence la capacité de la Glce à freiner la progression tumorale. Les travaux de Prudnikova *et al.*, (2011) ont montré que l'expression de la Glce est significativement plus faible dans les cellules cancéreuses mammaires MCF-7 que dans les tissus sains. La surexpression de la Glce a montré un effet antiprolifératif sur ces cellules *via* l'activation de gènes suppresseurs de tumeurs (p53, BRCA1, SYK et E2F1) et une augmentation de l'expression de gènes anti-apoptotiques (BCL2 et NFkB1) (Prudnikova *et al.*, 2010). Une autre étude réalisée sur les cellules de cancer de poumon U2020 a montré des résultats similaires. L'expression de la Glce était initialement faible dans ces cellules et sa surexpression a permis d'inhiber la prolifération de ces cellules *via* une diminution de l'expression de plusieurs facteurs de croissance pro-angiogéniques et leurs récepteurs incluant VEGF-A, TGFβ1, FGFR2, PDGF-A et PDGF-B. (Grigorieva *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données suggère un rôle suppresseur de tumeur de la Glce.

4. La 2-O-sulfotransférase (2-OST)

Après la réaction de C5-épimérisation, la réaction de 2-O-sulfatation poursuit la maturation des chaînes de HS et est réalisée par l'héparane-sulfate 2-O-sulfotransférase (HS2ST ou 2-OST). Cette enzyme catalyse le transfert d'un groupement sulfate sur l'hydroxyle en position 2 des résidus d'acide hexuronique (GlcA et IdoA) à partir du donneur de groupement sulfate, le 3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate (PAPS). La 2-OST est une protéine de l'appareil de Golgi de 356 acides aminés qui présente une topologie transmembranaire de type II (Kobayashi *et al.*, 1997). Elle est organisée en trois domaines : un domaine cytoplasmique de 11 acides aminés, un domaine transmembranaire de 17 acides aminés et un domaine luminal de 328 acides aminés. Des études de cristallographie et de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier les acides aminés impliqués dans l'activité catalytique de l'enzyme (His 140 et His142), dans la fixation du PAPS (Lys 83, Ser86,

Arg164 et Ser172) et dans la fixation du substrat (Arg80, Arg189 et Arg288) (Xu *et al.*, 2007). De plus, il a été mis en évidence que la conformation active de la 2-OST était un complexe homo-trimérique (Liu *et al.*, 2014, Figure 13).

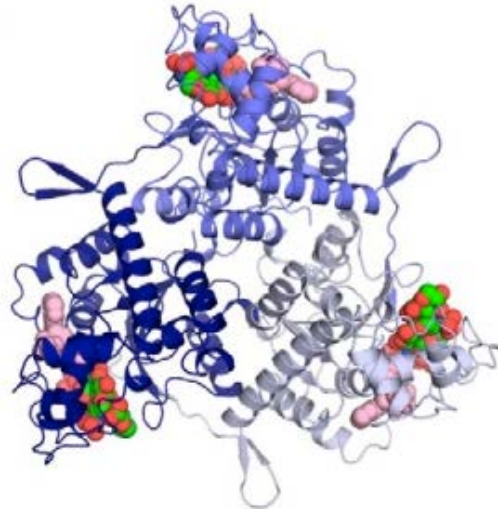


Figure 13. Structure cristallographique du complexe homo-trimérique de la 2-OST

La 2-OST forme un complexe homo-trimérique, essentiel à son activité. Chaque monomère (représenté en bleu foncé, bleu ciel et gris clair) s'associe à une molécule de PAPS (en rose) et à un substrat accepteur sur lequel sera transféré le groupement sulfate (en vert et orange). D'après Liu *et al.*, 2014

Le transfert du groupement sulfate se fait préférentiellement sur les résidus IdoA, et dans une moindre mesure sur les résidus GlcA, afin de former respectivement des IdoA2S ou des GlcA2S (Liu *et al.*, 2014). Il a été montré que la 2-OST a une affinité cinq fois supérieure pour les substrats accepteurs comportant des résidus IdoA par rapport à ceux contenant des résidus GlcA (Rong *et al.*, 2001). La spécificité de substrat de la 2-OST a été étudiée et a permis de mettre en évidence une préférence pour les substrats octasaccharidiques mono-2-*O*-sulfatés en comparaison avec des substrats ne comportant pas de groupement sulfate en position 2 (Smeds *et al.*, 2010), expliquant la sulfatation préférentielle des résidus IdoA par rapport à celles des GlcA des chaînes de HS.

De plus, il a été montré que les résidus IdoA2S constituaient un motif structural nécessaire à la liaison de certains facteurs de croissance aux chaînes de HS. Des travaux ont notamment montré une meilleure affinité du FGF-1 pour des octasaccharides contenant un motif trisaccharidique [IdoA2S – GlcNS6S – IdoA2S]. Des octosaccharides avec un degré de sulfatation global plus élevé mais sans le motif trisaccharidique spécifique présentent une plus faible affinité pour le FGF-1, attestant de l'importance et de la spécificité de la 2-*O*-sulfatation des IdoA dans ce genre d'interactions (Kreuger *et al.*, 2001).

Le FGF-2 se lie à un hexasaccharide comportant un résidu IdoA2S interne mais a une plus grande affinité pour les octosaccharides contenant le motif trisaccharidique [IdoA2S – GlcNS – IdoA2S]. Ainsi, à la fois la longueur du polysaccharide, le nombre et la position des groupements sulfates déterminent l'affinité des HS pour les FGFs (Kreuger *et al.*, 2001). La présence d'un groupement sulfate sur le résidu IdoA est également déterminante pour induire l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire impliquant les FGFs, notamment celle de la protéine Sonic Hedgehog (Shh), impliquée dans le développement du système nerveux. En ce sens, il a été montré que les HSPGs porteurs de chaînes de HS contenant des résidus IdoA2S jouent le rôle de co-récepteurs de la protéine Shh (Witt *et al.*, 2013).

Une fonction physiologique critique des résidus IdoA2S a été mise en évidence par une étude réalisée sur des souris KO (*knock-out*) pour la 2-OST. Ce travail a montré que ces souris déficientes présentaient une agénésie rénale entraînant leur décès durant la période néonatale. De plus, les animaux KO présentaient un retard de développement des yeux et du squelette, montrant le rôle essentiel de la 2-OST dans la régulation du développement embryonnaire (Bullock *et al.*, 1998). Une autre étude réalisée sur des cellules endothéliales provenant de souris déficientes en 2-OST a mis en évidence un lien avec la mise en place de la réponse inflammatoire. Dans cette étude, il a été montré que l'absence d'expression de la 2-OST améliore le recrutement des neutrophiles et leur infiltration *via* une plus forte liaison des L-sélectines aux cellules endothéliales. Ces données montrent que l'absence de 2-*O*-sulfatation des HS permet de déclencher une réponse inflammatoire, faisant de la 2-OST une cible pharmacologique potentielle dans ce contexte (Axelsson *et al.*, 2012).

L'implication de la 2-OST dans la prolifération et l'invasion tumorale a également été décrite *in vitro*. Une étude réalisée sur des cellules de cancer de la prostate a montré que le niveau d'expression de la 2-OST est corrélé positivement avec leur potentiel métastatique. L'extinction de l'expression de son gène engendre, à l'inverse, une très forte diminution de la prolifération et de la capacité migratoire de ces cellules, attestant du rôle pro-tumoral de cette enzyme dans ce type de cellules (Ferguson et Datta, 2011).

5. Les 6-*O*-sulfotransférases (6-OSTs)

Suite à la 2-*O*-sulfatation des résidus d'acide hexuronique, les HS sont alors maturés (sulfatés) au niveau de la position C6 des résidus glucosamine précédemment sulfatés (voir partie C.2.) par les enzymes de la famille des 6-*O*-sulfotransférases (6-OSTs). Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement sulfate provenant du PAPS sur l'hydroxyle en

position 6 des résidus glucosamines des chaînes de HS pour former les résidus GlcNS6S (Habuchi *et al.*, 2003).

Trois isoformes ont dans un premier temps été identifiées dans cette famille de sulfotransférases : 6-OST1, 6-OST2 et 6-OST3 (Habuchi *et al.*, 2000), avant de mettre en évidence un variant de l'isoforme 2, nommé 6-OST2S, correspondant à une forme délétée de 40 acides aminés N-terminaux de la 6-OST2 (Habuchi *et al.*, 2003). Comme les autres enzymes de maturation des HS, les 6-OSTs ont une topologie membranaire de type II et exercent leur activité dans le Golgi. Les 6-OST1, 6-OST2 et 6-OST3 sont composées respectivement de 401, 506 et 470 acides aminés. L'isoforme 1 présente 51 et 57% d'identité de séquence protéique avec les isoformes 2 et 3 respectivement, alors que l'isoforme 2 présente 50% d'identité de séquence avec l'isoforme 3 témoignant d'une variabilité importante entre les différentes isoformes (Habuchi *et al.*, 2000).

Il est intéressant de noter que la spécificité de substrats et l'expression tissulaire de ces enzymes sont différentes pour chaque isoforme (Tableau 5). Toutes les isoformes reconnaissent un substrat accepteur de type [HexA(β 1-4) – GlcNS/Ac(α 1-4)], mais chacune d'entre elles va catalyser préférentiellement la 6-*O*-sulfatation de la glucosamine cible en fonction de la nature et de la sulfatation de l'acide uronique adjacent. Concernant leur expression tissulaire, la 6-OST3 est ubiquitaire, alors que les autres enzymes sont exprimées de façon préférentielle dans des tissus comme le foie (6-OST1) ou le cerveau (6-OST2). Ces caractéristiques spécifiques des différentes isoformes témoignent d'une régulation très fine de la maturation des chaînes de HS, en ne favorisant la modification que de certains résidus qui respectent des conditions de spécificité de substrat strictes et ce, seulement au niveau de certains tissus.

Tableau 5. Spécificité de substrats et expression tissulaire des enzymes de la famille des 6-OSTs. Adapté de Habuchi *et al.*, 2000 ; Habuchi *et al.*, 2003 ; Kusche-Gullberg et Kjellén, 2003

Isoformes des 6-OSTs	Substrats accepteurs	Expression tissulaire
6-OST1	-HexA - GlcNS/Ac- (préférence pour un motif comportant un IdoA)	Foie
6-OST2	-HexA+/-2S - GlcNS/Ac- (préférence pour les substrats fortement sulfatés notamment avec un IdoA2S et action variable selon la concentration en substrat)	Cerveau, rate
6-OST2S	-HexA+/-2S - GlcNS/Ac-	Ovaires, placenta et rein au stade fœtal
6-OST3	-HexA+/-2S - GlcNS/Ac- (pas de préférence entre le GlcA ou l'IdoA voisin de la GlcNS)	Ubiquitaire

Les fonctions biologiques attribuées à ces enzymes ne sont pas encore clairement élucidées chez l'homme. Les principales études réalisées dans ce contexte ne fournissent des informations sur les 6-OSTs que chez la Drosophile (une seule isoforme, la 6-OST) et la souris (deux isoformes, la 6-OST1 et la 6-OST2) (Habuchi *et al.*, 2003).

Ainsi, une étude réalisée chez la Drosophile s'est intéressée au rôle de la 6-OST dans le développement de la trachée. Pour assurer un développement normal du système respiratoire dans cet organisme, deux récepteurs au FGF, appelés *Heartless* (Htl) et *Breathless* (Btl) sont indispensables. Il a été montré que l'inhibition de l'expression de la 6-OST dans les cellules précurseurs du développement de la trachée durant le stade embryonnaire par un ARNi spécifique, cause la mort des embryons et un défaut majeur de migration des cellules de la trachée. Ces données suggèrent que l'activité des récepteurs Htl et Btl dépend de la 6-O-sulfatation des HS et montrent l'implication des HS 6-O-sulfatés dans la régulation de la signalisation du FGF au cours de la trachéogénèse chez la Drosophile (Kamimura *et al.*, 2001).

D'autre part, une étude a montré que la plupart des souris KO pour la 6-OST1 décèdent au stade embryonnaire alors que celles qui survivent sont considérablement plus

petites que les souris non déficientes. Une réduction de moitié du nombre de micro vaisseaux placentaires permettant l'irrigation du fœtus ont été identifiés chez ces souris, ainsi que des malformations pulmonaires et un développement anormal du système nerveux (Habuchi *et al.*, 2007 ; Habuchi et Kimata, 2010). D'autres modèles animaux déficients en 6-OSTs ont montré de la même façon, des anomalies du développement musculaire et des défauts de vascularisation de la veine caudale chez le poisson zèbre et des malformations du système nerveux chez *Caenorhabditis elegans* (Habuchi et Kimata, 2010), attestant du rôle essentiel de la 6-O-sulfatation dans la régulation du développement embryonnaire chez la souris.

Comme pour les autres modifications des chaînes de HS, la 6-O-sulfatation est nécessaire à l'interaction des HS avec de nombreux facteurs de croissance, ce qui a une importance particulière dans un contexte pathologique. Les travaux de Ferreras *et al.*, (2012) ont révélé que l'endothélium des tumeurs ovariennes présente des niveaux plus élevés de HS 6-O-sulfatés que des tissus sains. Une diminution de l'expression de la 6-OST1 ou de la 6-OST2 conduit à une diminution du nombre de groupement 6-O-sulfatés sur les chaînes de HS de ces cellules endothéliales tumorales. Ceci permet de diminuer leur prolifération induite par le FGF-2 et de réduire l'angiogenèse activées par voies de signalisation impliquant le VEGF. Ces données montrent l'importance de la 6-O-sulfatation des HS dans la promotion du développement tumoral de par leur capacité à lier des facteurs de croissance pro-tumoraux et font des 6-OST1 et 2 de potentielles cibles de nouveaux agents anti angiogéniques (Ferreras *et al.*, 2012).

Une étude récente a également montré le rôle de la 6-OST2 dans la régulation du métabolisme de l'agrécan (un PG matriciel de haut poids moléculaire) et la viabilité des chondrocytes au niveau du cartilage des patients atteints d'arthrose et de la maladie de Kashin-Beck, une ostéochondropathie dégénérative causant des déformations articulaires importantes (Wang *et al.*, 2011). Afin de mieux en comprendre le mécanisme, les auteurs ont étudié le rôle de la 6-OST2 dans la différenciation des chondrocytes en utilisant un modèle de cellules pré-chondrocytaires murines. Ils ont ainsi pu mettre en évidence que la surexpression de la 6-OST2 dans ces cellules potentialise les effets du FGF-2 sur la prolifération des chondrocytes, induisant l'expression de l'agrécan et augmentant la quantité totale de PGs dans ces cellules. D'autre part, la voie de signalisation Wnt / β -caténine, qui inhibe la prolifération et la différenciation des chondrocytes, a été bloquée suite à la surexpression de la 6-OST2. Ces données suggèrent que la 6-OST2 joue un rôle important dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des chondrocytes en modulant la signalisation médiée par

le FGF-2, indiquant que cette enzyme pourrait être une potentielle cible moléculaire dans le traitement des patients atteints de la maladie de Kashin-Beck (Wang *et al.*, 2015).

Enfin, une étude a mis en évidence le rôle des 6-OST1 et 2 dans le cancer de l'ovaire, en particulier dans la régulation de l'angiogenèse. En effet, les HS 6-*O*-sulfatés jouent le rôle de co-récepteurs de l'HB-EGF pour permettre une meilleure affinité de liaison de ce ligand au récepteur EGFR. La reconnaissance HB-EGF / EGFR induit notamment l'expression de facteurs de croissance et de cytokines pro angiogéniques, telles que le FGF-2, l'IL6 et l'IL-8. L'inhibition de l'expression des 6-OST1 et 2 permet de réduire l'affinité de l'HB-EGF pour son récepteur et donc de limiter l'angiogenèse tumorale. Ainsi le taux de 6-*O*-sulfatation des chaînes de HS est un régulateur majeur de l'angiogenèse des cellules tumorales ovariennes et donc un facteur à cibler pour limiter le développement tumoral (Cole *et al.*, 2014).

6. Les 3-*O*-sulfotransférases (3-OSTs)

L'étape suivante et terminale de la maturation des chaînes de HS est assurée par les enzymes de la famille des 3-*O*-sulfotransférases. Comme les autres sulfotransférases décrites précédemment, ces enzymes catalysent le transfert d'un groupement sulfate à partir du donneur PAPS, ici sur l'hydroxyle en position 3 des résidus glucosamine déjà modifiés par les sulfotransférases qui interviennent précédemment dans la maturation de la chaîne.

Une partie complète sera consacrée à la description plus précise et plus détaillée du fonctionnement de ces enzymes et de leur implication en physiopathologie (voir partie D).

7. Les 6-*O*-endosulfatases

Après leur biosynthèse et leur maturation dans l'appareil de Golgi, les chaînes de HS peuvent subir une dernière modification par une famille de sulfatases extracellulaires (appelées Sulfs) dont la famille comporte deux isoformes : Sulf-1 et Sulf-2. Ces enzymes catalysent spécifiquement l'élimination des groupement 6-*O*-sulfate des résidus GlcNS6S présents sur les chaînes de HS à la surface cellulaire, en particulier au niveau de domaines fortement sulfatés c'est-à-dire au niveau des domaines NS (Vivès *et al.*, 2014).

Les Sulf-1 et -2 sont constituées de 871 et 870 acides aminés respectivement et sont organisées en quatre régions : un peptide signal N-terminal, un domaine catalytique, un domaine central hydrophile, essentiel pour l'activité endosulfatase et une région C-terminale qui interagit spécifiquement avec les résidus glucosamine 6-*O*-sulfatés (Morimoto-Tomita *et*

al., 2002 ; Frese *et al.*, 2009 ; Tang et Rosen, 2009). Les sulfatases sont d'abord synthétisées sous forme de précurseurs, puis sont clivées par une protéase de type furine permettant l'obtention de la forme mature de l'enzyme. La forme mature des Sulfs consiste en un hétérodimère de 125 kDa formé de deux sous-unités de 75 et 50 kDa, reliées entre elles par des ponts disulfures (Tang et Rosen, 2009 ; Nagamine *et al.*, 2010). La sous-unité N-terminale de 75 kDa contient le site actif. Elle est nécessaire pour l'activité enzymatique mais n'est pas suffisante puisque lorsqu'elle est seule, la catalyse n'a pas lieu. La présence de la sous-unité C-terminale de 50 kDa est donc indispensable à la catalyse (rôle fonctionnel) en permettant le maintien de l'hétérodimère dans sa conformation active (rôle structural) (Tang et Rosen, 2009).

La spécificité de substrat de ces enzymes reste encore à élucider. Cependant des données *in vivo* et *in vitro* indiquent que les Sulfs exercent préférentiellement leur activité sulfatase sur les unités disaccharidiques trisulfatées [HexA2S – GlcNS6S] se trouvant au sein des domaines sulfatés des chaînes de HS et dans une moindre mesure, sur le disaccharide disulfaté [HexA – GlcNS6S]. La nature de l'acide hexuronique HexA, (GlcA ou IdoA) ne semble pas importante pour la spécificité des Sulfs. De plus, elles ne montrent pas d'activité sur les disaccharides sulfatés seulement en position 6 sur le résidu glucosamine, mettant en évidence l'importance de la N-sulfatation initiale pour leur action (Pempe *et al.*, 2012 ; Vivès *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent une interaction dynamique des systèmes de sulfatation et de désulfatation, pour coordonner l'activité de ces sulfatases avec le processus de biosynthèse et de maturation des chaînes de HS.

Les Sulf-1 et -2 sont exprimées dans de nombreux tissus au cours du développement. Leur expression est régulée de façon dépendante l'une de l'autre (Lum *et al.*, 2007). En effet, il a été montré que les souris déficientes en Sulf-1 ou en Sulf-2 ne montrent pas de défaut de développement, suggérant d'abord des fonctions similaires pour les deux sulfatases, et surtout, montrant un effet de compensation entre les deux isoformes lorsque l'une n'est pas exprimée. A l'inverse, les souris déficientes pour les deux enzymes ont une faible espérance de vie associée à de multiples défauts du développement, notamment au niveau squelettique et rénal, attestant du rôle majeur des Sulfs dans le processus de maturation des HS, et donc dans leurs fonctions biologiques (Holst *et al.*, 2007).

De part leur capacité à modifier le degré de 6-O-sulfatation des chaînes de HS, les Sulfs constituent un régulateur unique capable de contrôler la liaison et l'activation de nombreux ligands et les événements de signalisation cellulaire associés (Vivès *et al.*, 2014). Une étude a montré que le traitement de l'héparine avec des Sulfs diminue considérablement

sa capacité à lier un certain nombre de ligands protéiques tel que le VEGF et le FGF1. ces données témoignent de l'importance de la présence des groupements 6-O-sulfates dans les interactions ligands / héparine pour réguler des processus cellulaires majeurs tels que l'angiogenèse et la prolifération (Uchimura *et al.*, 2006).

Les Sulf-1 et -2 ont donc un rôle important dans la modulation de l'activité de multiples ligands dont les facteurs de croissance (FGFs, VEGF), les protéines Wnt, les BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*) ou encore les chimiokines, tous essentiels pour le développement, la prolifération, l'angiogenèse, le métabolisme et la survie cellulaire (Figure 14, Ai *et al.*, 2003 ; Viviano *et al.*, 2004 ; Uchimura *et al.*, 2006 ; Lamanna *et al.*, 2008).

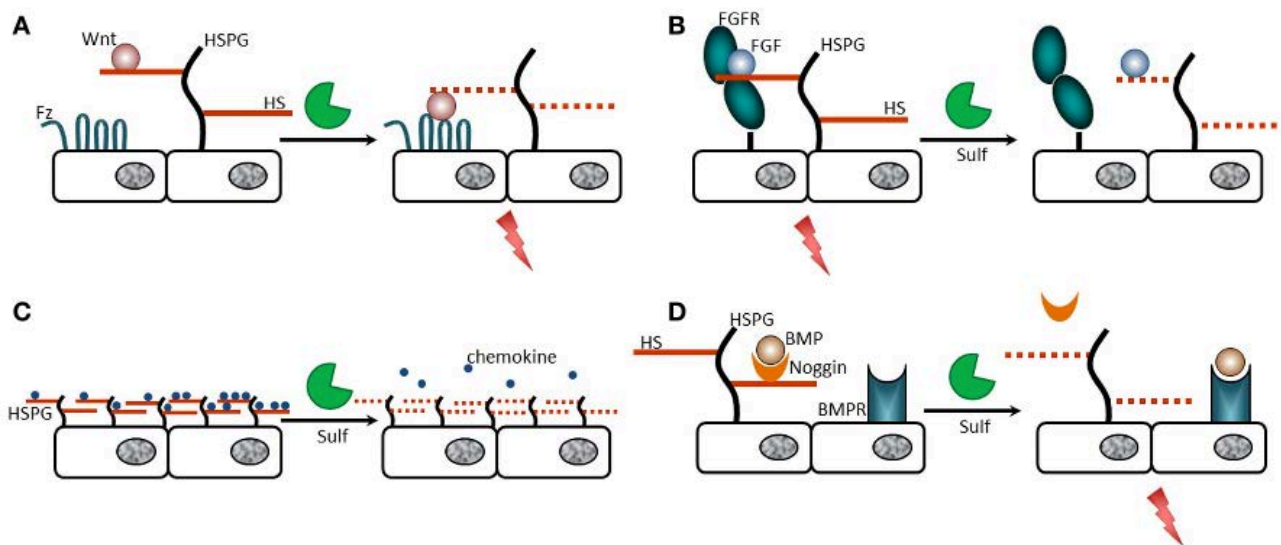


Figure 14. Représentations schématiques de l'implication des 6-O-endosulfatases Sulf-1 et Sulf-2 dans la régulation de la liaison et de l'activation de ligands protéiques au niveau des chaînes de HS

(A) La forte affinité de Wnt pour les HS 6-O-sulfatés est fortement diminuée suite à l'action des Sulfs permettant ainsi la liaison de Wnt à son récepteur Fz et induisant l'activation de la signalisation cellulaire (représentée par un éclair rouge). (B) Les HS sulfatés jouent à la fois un rôle dans la liaison du FGF et aussi dans la liaison au FGF-R pour former un complexe ternaire induisant la signalisation cellulaire. L'action des Sulfs empêche la formation de ce complexe en rendant les HS incapables de lier le FGF-R. (C) L'interaction entre les chimiokines est critique pour la formation de gradients chimiotactiques, la désulfatation des chaînes de HS par les Sulfs inhibe cette interaction et déstabilise le gradient de chimiokines à proximité des cellules. (D) La 6-O-sulfatation des chaînes de HS permet une forte liaison de Noggin responsable de la séquestration de BMP. L'action des Sulfs va permettre le relargage de Noggin à la surface cellulaire et ainsi permettre la fixation de BMP à son récepteur BMPR et l'activation de la signalisation associée. D'après Vivès *et al.*, 2014.

De façon intéressante, la modification de la structure des chaînes de HS catalysée par les Sulfs n'est pas seulement impliquée dans une activité de type perte de fonction. Dans le cas des FGFs, l'action des Sulfs est inhibitrice puisqu'elle empêche la formation du complexe

ternaire HS / FGF / FGF-R, nécessaire à l'activation de la signalisation dans la mesure où le FGF reste associé aux HS après l'action des Sulfs. Dans le cas de Wnt, la désulfatation des chaînes de HS est activatrice puisqu'elle permet sa libération et l'activation des voies de signalisation associées (Figure 14). De plus, une étude récente a soulevé un point très important de l'action des Sulfs. Les auteurs ont rappelé que la 6-O-désulfatation des chaînes de HS catalysée par les Sulf-1 et-2 n'aboutit pas seulement à une régulation négative de la signalisation cellulaire activée par des facteurs de croissance mais permet aussi une régulation positive. En effet, bien que l'activité catalytique des Sulfs a pour conséquence une diminution de l'interaction entre les facteurs de croissance et leurs récepteurs à la surface cellulaire, elle permet également le relargage de ces facteurs et acteurs de la signalisation cellulaire dans les matrices extracellulaires permettant ainsi de former une boucle de régulation au voisinage de la surface des cellules (Takashima *et al.*, 2016).

De nombreuses études se sont également intéressées aux rôles des Sulfs en situation pathologique et notamment dans les cancers. Les données contradictoires rapportées dans la littérature montrent une altération de l'expression de ces enzymes. Une augmentation ou une diminution d'expression des Sulfs peut en effet être associée à un même type de cancer. Ainsi l'expression de Sulf-1 est augmentée dans certains cancers comme les cancers de l'ovaire, les leucémies, le cancer de la tête et du cou, le cancer gastrique, du pancréas, du sein, du côlon, de l'œsophage et des poumons (Nawroth *et al.*, 2007 ; Rosen et Lemjabbar-Alaoui, 2010 ; Bret *et al.*, 2011 ; Hur *et al.*, 2012), illustrant plutôt un rôle oncogénique des Sulfs dans ces contextes pathologiques. D'autres études ont montré, à l'inverse, que l'expression de Sulf-1 est fortement réduite dans les mêmes types de cancers (au niveau des tissus comme les ovaires, sein, rein, estomac, vessie) (Lai *et al.*, 2003, 2004 ; Chen *et al.*, 2009). Dans ce contexte de diminution de son expression, Sulf-1 aurait alors un rôle suppresseur de tumeur. Concernant Sulf-2, son expression est généralement globalement augmentée dans les cancers ce qui serait plutôt en faveur d'un rôle oncogénique de cette enzyme (Morimoto-Tomita *et al.*, 2005 ; Lui *et al.*, 2012). Selon les auteurs, une activité oncogénique ou suppresseur de tumeur a donc été associée à chacune des deux Sulfs en fonction du contexte tissulaire et/ou cellulaire. Ces variations mettent en évidence un mécanisme d'action cancer-dépendant laissant le champ ouvert à d'autres études pour comprendre le rôle exact de ces enzymes en situation pathologique.

D. Focus sur les 3-O-sulfotransférases (3-OSTs ou HS3STs)

1. Implication des 3-OSTs dans la maturation des chaînes de HS

Les 3-*O*-sulfotransférases (3-OSTs) catalysent la réaction de 3-*O*-sulfatation qui permet le transfert d'un groupement sulfate à partir du PAPS sur l'hydroxyle en position 3 des résidus glucosamine porteurs des groupements sulfates ajoutés par les précédentes réactions de maturation de la chaîne de HS. La 3-*O*-sulfatation est une modification relativement rare (De Agostini *et al.*, 2008) et terminale qui intervient en dernier dans la voie de maturation des chaînes de HS (Zhang *et al.*, 2001). Du fait de son intervention finale dans la voie de maturation, les substrats des 3-OSTs sont des oligosaccharides sulfatés précédemment modifiés par les *N*-, les 2-*O*- et les 6-*O*-sulfotransférases, ainsi que par la C5 épimérase (Kusche *et al.*, 1988). Cette modification est réalisée par la plus grande famille de sulfotransférases impliquées dans la maturation des chaînes de HS puisqu'elle est composée de sept isoformes chez l'Homme (les 3-OST1, 2, 3A, 3B, 4, 5 et 6). Une isoforme supplémentaire est présente chez le poisson zèbre (3-OST7) (Cadwallader et Yost, 2006).

2. Proportion de groupements 3-O-sulfates au sein des chaînes de HS

Historiquement, les groupements 3-*O*-sulfatés ont été mis en évidence en cherchant des enzymes capables d'enlever les groupements sulfates de l'héparine (Lindahl *et al.*, 1980). La présence de ces groupements a été confirmée par des études de spectrométrie de masse, de RMN (résonance magnétique nucléaire) montrant la capacité de l'héparine à lier l'antithrombine III (Meyer *et al.*, 1981 ; Yamada *et al.*, 1993) dans des préparations de HS d'origine murine et bovine (Pejler *et al.*, 1987 ; Edge et Spiro, 1990).

Appliquées aux HS, ces études ont permis de révéler que la proportion de groupements 3-*O*-sulfatés au sein des HS variait selon l'origine tissulaire. Ainsi les HS des cellules endothéliales contiennent environ 1% de groupements 3-*O*-sulfatés (Marcum *et al.*, 1986). Dans le même sens, 5 à 10% de HS 3-*O*-sulfatés sont retrouvés dans les cellules de la membrane de Reichert chez la souris, une fine membrane basale présente dans le tissu pariétal et étudiée en tant que source de glycoprotéines membranaires (Pejler *et al.*, 1987). Une étude plus récente a montré que les HS du liquide folliculaire humain contiennent environ 6% de résidus glucosamine 3-*O*-sulfatés (De Agostini *et al.*, 2008). Cependant la fréquence de la 3-*O*-sulfatation au sein des chaînes de HS reste une donnée méconnue en raison de la difficulté à obtenir de grande quantité de HS pour des analyses structurales et du manque de techniques

d'analyse pour identifier et quantifier les groupements 3-*O*-sulfatés des GAGs (Thacker *et al.*, 2014).

3. Pourquoi existe-t-il autant d'isoformes dans la famille des 3-OSTs ?

La famille des 3-OSTs est la plus vaste famille de sulfotransférases impliquées dans la maturation des chaînes de HS. Sept isoformes ont été identifiées à ce jour chez les mammifères. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette diversité :

-leur localisation tissulaire : toutes les isoformes ne sont pas exprimées dans les mêmes tissus (Tableau 6). Ainsi, pour assurer une 3-*O*-sulfatation efficace sur les HS qui sont ubiquitaires, plusieurs isoformes sont nécessaires.

-leur fonctionnalité : une classification basée sur l'homologie de séquence du domaine sulfotransférase des 3-OSTs a été établie. Cette classification met parallèlement en évidence une similarité de spécificité de substrats dans chaque famille de 3-OSTs, et de ce fait une capacité variable, mais propre à chaque isoforme, à générer des motifs de reconnaissance spécifique pour des ligands. Sont ainsi distinguées, les isoformes appelées « *AT-type* » qui vont générer un motif de reconnaissance pour l'antithrombine (AT) et les isoformes appelées « *gD-type* », créant un site de liaison pour la glycoprotéine D de l'enveloppe virale de l'*Herpes simplex virus* de type I (HSV-1) (Tableau 6, partie 3.a).

-leur spécificité de substrat : d'une isoforme à l'autre la spécificité de substrat est différente et un groupement sulfate à une position particulière d'un résidu peut être discriminant, ce qui montre la finesse de la régulation du fonctionnement de ces enzymes.

Tableau 6. Classification et expression tissulaire des 3-OSTs

(AT : antithrombine, gD : glycoprotéine D)

Isoforme des 3-OSTs	Type	Expression tissulaire	Références bibliographiques
3-OST1	AT	Cœur, cerveau, poumons, reins, rate, estomac, intestin grêle, côlon, testicules	Shworak <i>et al.</i> , 1999; Mochizuki <i>et al.</i> , 2008
3-OST2	gD	Cerveau	Shworak <i>et al.</i> , 1999; Mochizuki <i>et al.</i> , 2008
3-OST3A	gD	Cœur, placenta, poumons, foie, reins, rate, estomac, intestin grêle, côlon, testicules	Shworak <i>et al.</i> , 1999; Mochizuki <i>et al.</i> , 2008
3-OST3B	gD	Cœur, placenta, poumons, foie, reins, rate, estomac, côlon, testicules, pancréas, muscles squelettiques	Shworak <i>et al.</i> , 1999; Mochizuki <i>et al.</i> , 2008
3-OST4	gD	Cerveau	Shworak <i>et al.</i> , 1999; Mochizuki <i>et al.</i> , 2008
3-OST5	AT et gD	Cerveau, moelle épinière, muscles squelettiques	Xia <i>et al.</i> , 2002 Mochizuki <i>et al.</i> , 2003, 2008
3-OST6	gD	Foie, reins	Xu <i>et al.</i> , 2005

a) Deux sous familles d'isoformes des 3-OSTs : « AT-type » et « gD-type »

Les isoformes des 3-OSTs sont divisées en deux groupes en raison de leur homologie de séquences protéiques et leur spécificité de substrat. Ces propriétés assurent la création de motifs polysaccharidiques de liaison pour des facteurs spécifiques et sont responsables d'une distinction supplémentaire entre les isoformes des 3-OSTs. Ainsi, le premier groupe contient les 3-OST1 et 3-OST5 qui présentent 71% d'identité de séquences au niveau de leur domaine sulfotransférase. Elles sont de plus toutes les deux capables de générer un site de liaison pour l'antithrombine III (AT-III), en sulfatant un substrat de type [GlcNS-GlcA-GlcNS6S-GlcA-**GlcNS6S**-GlcA] (glucosamine cible en gras) (Xia *et al.*, 2002 ; Xu *et al.*, 2008)). De ce fait, elles sont dénommées « AT-type », la terminologie « AT » se référant à l'antithrombine

(Tableau 6). Le second groupe est composé des isoformes 3-OST2, 3A, 3B, 4 et 6 qui présentent 80% d'identité de séquences dans leur domaine sulfotransférase. La séquence du domaine sulfotransférase est identique entre la 3-OST3A et la 3-OST3B (Peterson *et al.*, 2009). Ces enzymes ont la capacité de générer un site de liaison pour la glycoprotéine D de l'enveloppe virale de l'*Herpes simplex virus* de type I (HSV-1) et sont ainsi appelées « *gD-type* » (Shukla *et al.*, 1999 ; Xia *et al.*, 2002 ; Xu *et al.*, 2005 ; Tiwari *et al.*, 2005 ; O'Donnell *et al.*, 2006) (Tableau 6). Il existe 60% d'identité de séquences protéiques au niveau du domaine sulfotransférase entre les deux groupes d'enzymes ce qui permet d'expliquer qu'elles ont des fonctions biologiques distinctes en relation avec les motifs saccharidiques de reconnaissance qu'elles génèrent (Lawrence *et al.*, 2007).

b) Spécificité de substrat des 3-OSTs

La plupart des études fonctionnelles relatives aux 3-OSTs se sont intéressées à la spécificité de substrat des isoformes 3-OST1 et 3-OST3. Pour ce faire, des banques d'oligosaccharides accepteurs ont été synthétisées et testées vis-à-vis des ces deux isoformes. La structure de base des accepteurs testés est la suivante : [HexA – GlcNS6S – HexA \pm 2S] – où la glucosamine cible est au centre du trisaccharide, avec l'acide uronique (GlcA ou IdoA) de part et d'autre en position (-1) à l'extrémité non réductrice et en position (+1) du côté réducteur. Les activités des 3-OST1 et 3-OST3, représentatives des deux sous-familles, ont été mesurées en présence des différents oligosaccharides et de PAPS (marqué au soufre 35) en suivant la production des produits de réaction radiomarqués par CLHP (Nguyen *et al.*, 2012). Cette étude a permis d'identifier les substrats accepteurs de la 3-OST3A (Figure 15). Ainsi, un substrat accepteur contenant un résidu d'acide iduronique en position (+1), voisin de la glucosamine cible, est actif mais la présence d'un acide glucuronique ou de l'IdoA 2-*O*-sulfaté à cette même position empêche la prise en charge de ce substrat par la 3-OST3A. Cependant, dans le cas où la glucosamine présente du côté non réducteur en amont de la glucosamine cible est déjà 3-*O*-sulfatée, alors la présence d'un acide glucuronique en position (+1) n'est plus inhibitrice pour la 3-OST3A. Ce phénomène suggère la capacité de la 3-OST3A à identifier les résidus cibles tout au long de la chaîne polysaccharidique et à poursuivre ainsi la 3-*O*-sulfatation (Nguyen *et al.*, 2012). Dans cette étude, il a également été montré que les 3-OST3A et 3-OST3B ont la même spécificité de substrat, ce qui était prévisible dans la mesure où leur site catalytique sont identiques (Peterson *et al.*, 2009).

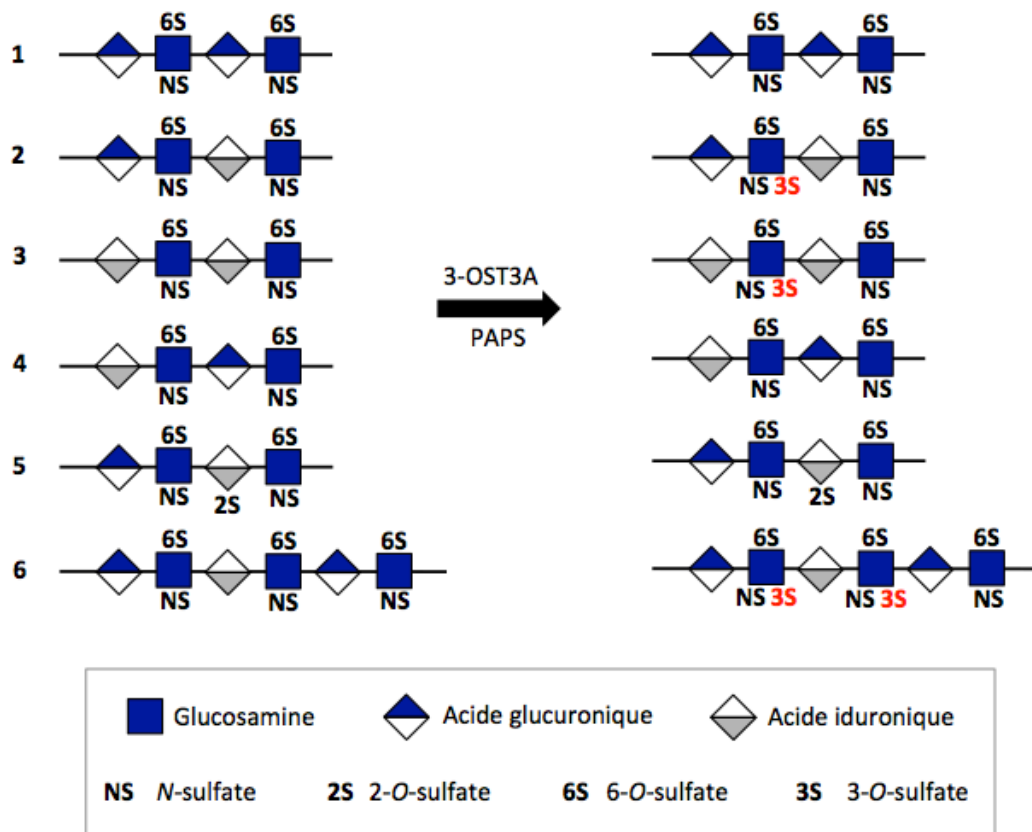


Figure 15. Structure des substrats accepteurs spécifiques de la 3-OST3A et leurs produits

Les oligosaccharides accepteurs sont 3-O-sulfatés par la 3-OST3A seulement quand ils comportent un acide iduronique en position (+1) voisin de la glucosamine cible GlcNS6S (substrats 2 et 3). Cependant la 2-O-sulfatation de ce résidu IdoA est inhibitrice pour la 3-OST3A (substrat 5). La présence d'un acide glucuronique à cette position ne permet pas la reconnaissance du substrat par la 3-OST3A (substrats 1 et 4) sauf lorsque la glucosamine du coté non réducteur est déjà 3-O-sulfatée (substrat 6). Modifié d'après Nguyen *et al.*, 2012.

A l'inverse de l'isoforme 3-OST3A, la 3-OST1 peut modifier les oligosaccharides ayant un résidu IdoA2S en position (+1). De plus, elle agit préférentiellement sur les GlcNS6S possédant un GlcA en position (-1). Comme pour la 3-OST3A, la présence d'un GlcA en position (+1) est inhibitrice pour l'activité de la 3-OST1 (Nguyen *et al.*, 2012). Une étude avait déjà montré que la 3-OST1 agissait préférentiellement sur des résidus glucosamine internes de la chaîne de HS alors que les glucosamines les plus proches des extrémités réductrice et terminale non réductrice ne sont pas modifiées par cette isoforme (Kuberan *et al.*, 2003). La 3-OST1 est également active sur les structures de HS ne comportant pas de résidus IdoA (Chen *et al.*, 2007). En résumé, les isoformes 3-OST1 et 3-OST3A ont des spécificités de substrat différentes et précises, conditionnées par la présence d'un certain type de résidus (modifiés ou non) au voisinage du résidu qui doit être sulfaté. Leur activité distincte sur les motifs de HS dépend en particulier de la 2-O-sulfatation du résidu IdoA en position (+1) par

rapport à la glucosamine cible. Cependant, les deux isoformes modifient préférentiellement les glucosamines déjà *N*- et 6-*O*-sulfatées (GlcNS6S) et avec un IdoA en position (+1) (Nguyen *et al.*, 2012).

D'autres travaux se sont également intéressés à la spécificité de substrats des autres isoformes de la famille des 3-OSTs. Il a été montré que les 3-OST2, 3, 4 et 6 modifient préférentiellement les glucosamines possédant un IdoA2S en position (-1) (Xu *et al.*, 2005 ; Lawrence *et al.*, 2007 ; Mochizuki *et al.*, 2008). La 3-OST5, quant à elle, modifie les glucosamines indépendamment de la 2-*O*-sulfatation des acides uroniques voisins (Duncan *et al.*, 2004 ; Mochizuki *et al.*, 2003 et 2008 ; Xu *et al.*, 2008).

4. Données structurales des 3-OSTs

Les structures cristallographiques des isoformes 3-OST1, 3-OST3 (Figure 16) et 3-OST5 ont été résolues (Edavettal *et al.*, 2004 ; Moon *et al.*, 2004 ; Xu *et al.*, 2008). Ces données structurales ont permis de mettre en évidence les résidus des enzymes importants pour la spécificité de substrat, le transfert du groupement sulfate à partir du substrat donneur (PAPS) et la fixation des oligosaccharides accepteurs.

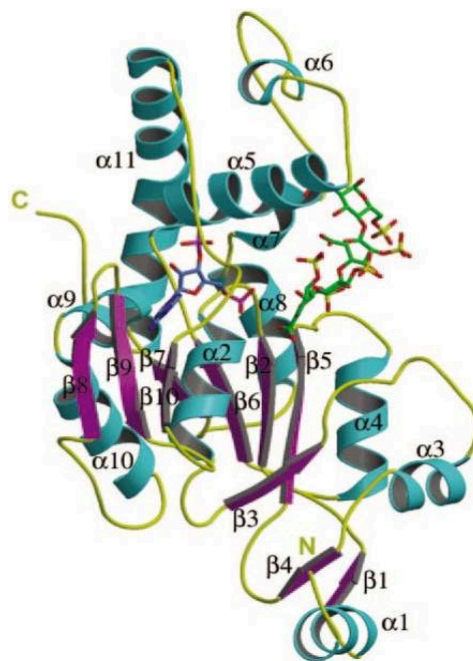


Figure 16. Structure cristallographique du complexe ternaire 3-OST3 / PAPS / tétrasaccharide

L'isoforme 3-OST3 est organisée en feuillets β (en violet) et en hélices α (en turquoise). Le substrat PAPS, donneur de sulfate, est représenté en bleu et le tétrasaccharide accepteur de structure -HexA2S-GlcNS6S-IdoA2S-GlcNS6S- est représenté en vert. D'après Moon *et al.*, 2004

a) Mise en évidence des acides aminés importants pour la spécificité de substrat oligosaccharidique accepteur des 3-OSTs

La spécificité de substrat des 3-OSTs est gouvernée par l'orientation spatiale des acides aminés clés du site actif. La résolution tridimensionnelle de la structure de ces protéines a été un élément majeur dans l'identification de ces résidus (Peterson *et al.*, 2009). La superposition des structures cristallines des 3-OST1, 3-OST3 et 3-OST5 a permis de mettre en évidence des résidus clé au sein de leur site catalytique et impliqués dans la spécificité de substrat (Thacker *et al.*, 2014). Il a ainsi été montré que les résidus His271 et Glu88 de la 3-OST1 génèrent une ouverture étroite au niveau du site de fixation du substrat accepteur, favorisant l'interaction avec le substrat tétrasaccharidique accepteur [HexA2S-GlcNS6S-IdoA2S-GlcNS6S] et régulant la spécificité de cette interaction (Moon *et al.*, 2012 ; Xu *et al.*, 2008). Les résidus correspondant au sein de la 3-OST3 sont des acides aminés de plus petite taille, Gly182 et Gly365, et dans la 3-OST5 les résidus Ser120 et Ala306. En d'autres termes, la nature de ces résidus de part et d'autre du site de fixation du substrat accepteur gouverne la spécificité de substrat des 3-OSTs. En effet, il a été montré que les mutations des résidus His271 et Glu88 (de la 3-OST1) en glycine n'ont pas d'effet sur l'activité catalytique, mais un effet considérable sur la spécificité de substrat. En effet, la 3-OST1 sauvage (WT) reconnaît le substrat [GlcNS-GlcA-GlcNS6S-GlcA-**GlcNS6S**-GlcA] (la glucosamine cible est en gras) alors que le 3-OST1 mutée (E88G/H271G) reconnaît à la fois le même substrat que la 3-OST1 WT et le substrat [GlcNS-IdoA2S-GlcNS6S-IdoA2S-**GlcNS6S/GlcNH₂6S**-GlcA], ce qui correspond à la spécificité de substrat de la 3-OST5. De façon intéressante, lorsque les résidus Ser120 et Ala306 de la 3-OST5 sont remplacés par leurs homologues de la 3-OST1 (3-OST5 mutée S120E/A306H), la spécificité de substrat de la 3-OST5 mutée est modifiée et similaire à celle de la 3-OST1 (Xu *et al.*, 2008). Ces données indiquent que la fixation du substrat accepteur est conditionnée par la nature des résidus situés de part et d'autre du site de fixation du substrat accepteur et que la mutation de ces résidus entraîne un changement de spécificité de substrat (Thacker *et al.*, 2014).

Des études de mutagenèse dirigée ont permis de mettre en évidence que les acides aminés Lys259, Thr256, et Trp283 de la 3-OST3 et l'Arg268 de la 3-OST1 jouent un rôle très important dans la spécificité de substrat, c'est-à-dire dans la reconnaissance des motifs structuraux spécifiques et de ce fait, ils sont également déterminants dans la fixation du substrat. De la même façon, les acides aminés Arg370, Gln255 et Lys259 de la 3-OST3 ont été identifiés comme ayant un rôle clé dans la reconnaissance du groupement 2-*O*-sulfate du résidu IdoA2S en position (+1) de la glucosamine (cible de la 3-OST3) et influence ainsi de

façon majeure l'activité de cette isoforme. En effet, la 2-*O*-sulfatation de l'IdoA se révèle être inhibitrice pour la 3-OST3 car l'enzyme ne peut plus reconnaître le motif oligosaccharidique cible si l'IdoA est 2O-sulfaté. Il est intéressant de remarquer que les résidus Arg370 et Gln255 sont conservés entre les isoformes 3-OST1 et 3 mais que le résidu Lys259 de la 3-OST3 est remplacé par une asparagine en position 167 dans la 3-OST1. Cependant, la reconnaissance du substrat accepteur par les 3-OSTs ne dépend pas seulement de la structure d'une unité saccharidique, il s'agit d'un mécanisme de reconnaissance complexe entre les informations portées par la séquence du substrat oligosaccharidique et la conformation active de l'enzyme (Moon *et al.*, 2012).

b) Mise en évidence des acides aminés importants pour la fixation du substrat donneur (PAPS) et le transfert du groupement sulfate

Les études cristallographiques ont révélé que les domaines sulfotransférases des 3-OSTs sont similaires à ceux des NDSTs (décrites en partie II.C.2) et présentent 30% d'identité de séquence protéique. La structure du site de fixation du PAPS est identique dans ces deux familles de sulfotransférases. Elles présentent toutes les deux un résidu glutamate conservé, Glu642 dans NDST-1 et Glu90 dans 3-OST1, dans leur site catalytique et nécessaire au transfert du groupement sulfate sur l'accepteur (Kakuta *et al.*, 1999 ; Kakuta *et al.*, 2003 ; Edavettal *et al.*, 2004). L'étude de Moon *et al.*, (2012) a, quant à elle, mis en évidence l'importance des acides aminés Ala277 et Val281 de la 3-OST1 dans la fixation du PAPS mais la nature des liaisons n'a pas été précisée.

c) Mise en évidence des acides aminés impliqués dans la fixation du substrat accepteur

La co-cristallisation de la 3-OST3 avec le PAPS et un substrat tétrasaccharidique [HexA2S-GlcNS6S-IdoA2S-GlcNS6S] a permis de mettre en évidence l'importance des résidus Lys161, Arg166, Lys215, Gln255, Lys368 et Arg370 dans la liaison au substrat accepteur en formant des liaisons hydrogènes avec la glucosamine cible du tétrasaccharide et les acides uroniques adjacents (du côté non réducteur et réducteur) (Moon *et al.*, 2004). Les similarités structurales entre les isoformes des 3-OSTs permettent d'identifier les résidus importants et correspondant à chacune d'entre elles dans les 3-OST1 et 3-OST5 (Tableau 7) (Peterson *et al.*, 2009). Les six résidus mentionnés précédemment (Lys161, Arg166, Lys215,

Gln255, Lys368 et Arg370) sont conservés parmi toutes les isoformes des 3-OSTs, ce qui ne permet pas de les différencier en termes de spécificité de substrats. De façon intéressante, trois de ces six résidus (Lys161, Arg166 et Gln255) sont absents chez les NDSTs suggérant qu'ils contribuent à la reconnaissance de substrats spécifiques des 3-OSTs (Thacker *et al.*, 2014).

Tableau 7. Résidus d'acides aminés homologues du site catalytique des 3-OSTs impliqués dans la liaison du substrat oligosaccharidique accepteur

(Modifié d'après Peterson *et al.*, 2009)

3-OST1	3-OST3	3-OST5
Arg67	Lys161	Arg99
Arg72	Arg166	Arg104
Lys123	Lys215	Lys155
Gln163	Gln255	Gln195
Lys274	Lys368	Lys309
Arg276	Arg370	Arg311

L'ensemble de ces données démontre la finesse de la régulation de l'activité de ces enzymes puisqu'un seul groupement sulfate suffit à inhiber ou à promouvoir l'activité d'une isoforme en particulier vis-à-vis d'un motif de HS. Les 3-OSTs sont à ce titre considérées comme une famille multigénique codant des enzymes clés régulant la production de structures très précises de HS (Shworak *et al.*, 1999).

Ce travail de thèse sera focalisé sur la 3-O-sulfatation catalysée par l'isoforme 3-OST3A et son implication physiopathologique, en particulier dans le cancer du sein de sous-type HER2+, points qui seront plus précisément développés dans les parties III et IV respectivement.

III. LA 3-O-SULFATATION : IMPLICATIONS BIOCHIMIQUE, PHYSIOLOGIQUE ET PHYSIOPATHOLOGIQUE

Les fonctions biologiques des HSPGs sont en partie associées à la présence des groupements sulfates ajoutés à différentes positions des résidus osidiques au cours de la maturation des chaînes de GAGs. En effet, ces groupements confèrent à ces macromolécules une forte charge négative leur permettant d'interagir avec une variété de protéines à la surface des cellules et dans les MEC. Les interactions mises en jeu impliquent majoritairement (i) des interactions électrostatiques entre les acides aminés positivement chargés des protéines et les groupements sulfates (négativement chargés) localisés à différentes positions le long de la chaîne polysaccharidique (Thacker *et al.*, 2016), (ii) des liaisons hydrogènes entre les groupements sulfates et des groupements donneurs d'hydrogène des protéines cibles et (iii) dans une moindre mesure, des interactions hydrophobes entre les domaines protéiques des effecteurs et les HS (Capila et Linhardt, 2002). De très nombreuses protéines se liant aux HS et à l'héparine (Hep), appelées HBP (*Heparin Binding Proteins*) ont été identifiées, incluant des facteurs de croissance (FGFs par exemple), des cytokines (ILs par exemple), des chimiokines (MIP *Macrophage Inflammatory Proteins* par exemple), des facteurs morphogènes (shh *Sonic Hedgehog* par exemple) et des protéines de la MEC (comme les collagènes par exemple) (Dreyffus *et al.*, 2009). Bien que de nombreuses HBP aient été décrites, quelques unes seulement présentent une liaison préférentielle aux HS contenant des résidus glucosamines 3-O-sulfatés (Thacker *et al.*, 2016).

A. Description des différents ligands des HSPGs

1. Les HBP (*Heparin Binding Proteins*)

Il est aujourd'hui établi qu'il existe une spécificité d'interaction entre les HS et leurs protéines cibles. Cette spécificité est régie d'une part par la présence de motifs structuraux très précis au sein de la chaîne polysaccharidique des HS et d'autre part, par des acides aminés spécifiques au sein des HBP (Dreyfuss *et al.*, 2009). La reconnaissance de ces motifs sulfatés par les HBP permet de réguler la biodisponibilité et les activités biologiques des protéines impliquées dans l'interaction (Figure 17).

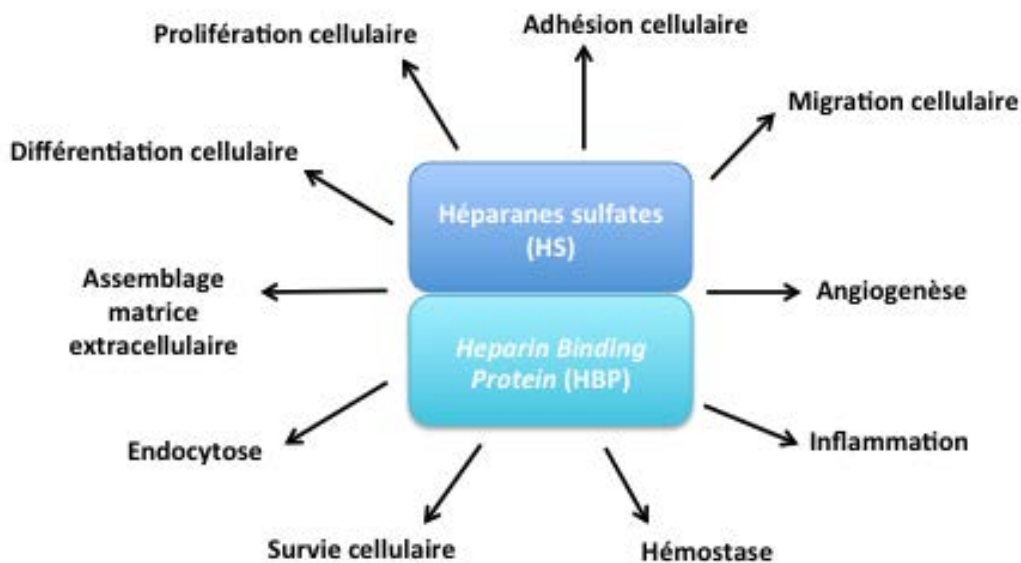


Figure 17. Activités biologiques modulées par les interactions HS / HBP

L'interaction des HBP (*Heparin Binding Proteins*) avec les chaînes de HS permet de réguler de nombreux processus physiologiques : la prolifération, l'adhésion, la migration, l'angiogenèse, l'inflammation, l'hémostase, la survie cellulaire, l'endocytose, l'assemblage des matrices extracellulaires et la différenciation. Modifié d'après Dreyffus *et al.*, 2009

Les HSPGs sont ainsi impliqués dans la régulation de processus physiologiques très variés tels que la croissance cellulaire, la différenciation, l'adhésion et la migration (Peterson *et al.*, 2009). Ces interactions HS/ligands sont également mises en jeu en situation pathologique, en régulant notamment différents aspects de la biologie du cancer, incluant la progression tumorale et la formation de métastases (Sasisekharan *et al.*, 2002).

Le Tableau 8 recense certaines des HBP (et leurs fonctions biologiques associées) régulées par leur interaction avec les HS.

Tableau 8. HBP (*Heparin Binding Proteins*) et fonctions biologiques associées

Modifié d'après Dreyfuss *et al.* 2009 ; Capila et Linhardt, 2002

Familles de ligands protéiques interagissant avec les HS (HBP)	Fonctions biologiques associées
Protéines de surface cellulaire	
L-sélectine et P-sélectine	Inflammation
N-CAM (<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>)	Adhésion cellulaire
PECAM (<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>)	
MAC-1 (<i>Monocyte Adhesion Molecule</i>)	
FGFR (<i>Fibroblast Growth Factor Receptor</i>)	Signalisation cellulaire du FGF : prolifération et survie cellulaire
Protéines de la matrice extracellulaire	
Collagènes	Assemblage matrice extracellulaire, adhésion cellulaire
Fibronectine	
HB-GAM (<i>Heparin Binding – Growth Associated Molecule</i>)	
Laminine	
Tenascine	
Vitronectine	
Facteurs de croissance	
HB-EGF (<i>Heparin Binding – Epidermal Growth Factor</i>)	Prolifération cellulaire, différenciation cellulaire, survie cellulaire, migration cellulaire, angiogénèse
FGFs (<i>Fibroblast Growth Factors</i>)	
VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)	
PDGF (<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>)	
TGF- β (<i>Transforming Growth Factor-β</i>)	
HGF (<i>Hepatocyte Growth Factor</i>)	
Cytokines / chimiokines / morphogènes	
BMP (<i>Bone Morphogenetic Protein</i>)	Développement, embryogénèse
ILs (<i>Interleukines</i>)	Inflammation, angiogénèse
TNF- α (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)	
MIP-1 (<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>)	
Shh (<i>Sonic Hedgehog</i>)	Développement, embryogénèse, cancer
Wnt (<i>Wingless Wg</i>)	

2. Implication des motifs sulfatés des chaînes de HS dans la formation d'un complexe ternaire HS / FGF / FGFR

Une classe très étudiée d'HBP interagissant avec les HS à la surface des cellules et dans les MEC est représentée par les FGFs et leurs récepteurs qui appartiennent à la famille des récepteurs enzymatiques portant une activité tyrosine kinase, les FGFRs. Les HS situés au niveau de la membrane plasmique, peuvent jouer un rôle de corécepteurs pour stabiliser la fixation des FGFs sur leurs récepteurs et permettre la formation d'un complexe ternaire HS / FGF / FGFR (Figure 18). Bien que le facteur de croissance (FC) se fixe à son récepteur en l'absence de HS, la formation du complexe ternaire incluant les HS est nécessaire à l'activation de la voie de signalisation associée et donc primordiale pour l'obtention d'une réponse cellulaire.

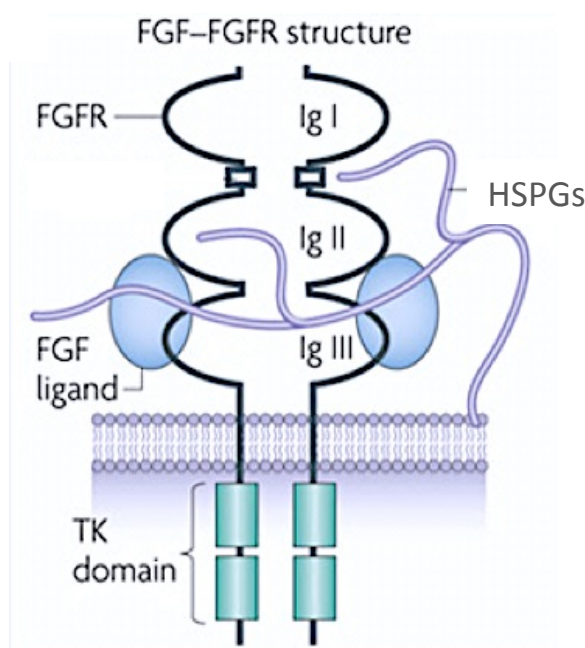


Figure 18. Représentation schématique du complexe ternaire HS / FGF / FGFR

Les récepteurs des FGFs (FGFR) sont des récepteurs organisés en trois régions : une région extracellulaire composée de trois domaines de type immunoglobulines (Ig I, Ig II et Ig III) ; une région transmembranaire et une région intracellulaire composée de deux domaines portant une activité tyrosine kinase (TK). Les FGFs se lient à leur récepteur ce qui entraîne une dimérisation du récepteur et son activation par autophosphorylation des domaines intracellulaires portant une activité TK. Dans ce contexte, les chaînes de HS permettent de stabiliser la liaison du FGF à son récepteur et jouent alors le rôle de corécepteur, permettant la formation d'un complexe ternaire HS/FGF/FGFR biologiquement actif. Modifié d'après Turner et Grose., 2010.

Des études se sont portées sur la compréhension du mécanisme de reconnaissance entre les FGFs et les HS et ont permis de mettre en évidence le rôle déterminant des motifs sulfatés des chaînes de HS dans la formation de ce complexe ligand-récepteur.

a) Rôle des motifs *N*-, 2-*O* et 6-*O* sulfatés dans la fixation du FGF-2 à son récepteur et dans l'activation de la voie de signalisation associée

Les études des interactions HBP / HS ont permis la mise en évidence du rôle des HSPGs comme corécepteur du FGF-2. En effet, les travaux de Rapraeger (1991) ont montré que le FGF-2 se lie à la fois à son récepteur et aux HS situés à la surface cellulaire puisqu'un traitement par une solution saline de chlorate de sodium ou par les héparinases (qui digèrent spécifiquement les chaînes de HS) diminue cette interaction. Cette diminution d'interaction du FGF-2 et des HS par les différents traitements réduit considérablement la liaison du facteur de croissance à son récepteur, bloque sa capacité à induire la prolifération des fibroblastes en culture et induit la différenciation des cellules musculaires squelettiques en culture, normalement réprimée par le FGF-2. Ces résultats ont ainsi permis de montrer que les HSPGs situés à la surface cellulaire sont impliqués dans la régulation de la signalisation cellulaire induite par le FGF-2 (Rapraeger *et al.*, 1991).

Suite à cette découverte, des efforts importants ont été réalisés afin de d'identifier précisément les motifs des chaînes de HS responsables de la fixation et de l'activation du FGF-2. Des expériences de chromatographie d'affinité ciblant le FGF-2 ont été réalisées en utilisant des oligosaccharides de douze et quatorze unités de type Hep / HS et ont ainsi pu mettre en évidence que les groupements glucosamine *N*-sulfatés et les résidus IdoA 2-*O*-sulfatés sont essentiels pour l'interaction du FGF-2 et des HS (Turnbull *et al.*, 1992). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de l'interaction du FGF-2 avec des oligosaccharides de type Hep / HS de taille comprise entre quatre et quatorze unités et ayant subi de traitements spécifiques de *N*-, 2-*O* et 6-*O* désulfatation. Ces expériences ont ainsi montré que la 6-*O*-sulfatation n'est pas nécessaire pour cette interaction (Maccarana *et al.*, 1993). Ce n'est que quelques années plus tard que le rôle de la 6-*O*-sulfatation dans ce contexte a été mis en évidence. En effet, une étude réalisée en utilisant une banque d'oligosaccharides de type Hep / HS a montré une corrélation entre l'activité du FGF-2, estimée par un test de prolifération cellulaire, et le nombre de groupements 6-*O*-sulfates au sein des polysaccharides. Ce travail a permis de révéler l'importance de la 6-*O*-sulfatation du résidu glucosamine du disaccharide

IdoA(2S) α 1,4GlcNSO₃(6S) dans la capacité d'activation du facteur de croissance FGF-2 (Pye *et al.*, 1998).

D'une façon générale, le complexe ternaire HS / FGF / FGFR est biologiquement actif et exerce diverses fonctions cellulaires (Meneghetti *et al.*, 2015). La formation de ce complexe permet l'activation des récepteurs et celles des voies de signalisation intracellulaires impliquées, entre autres, dans la régulation du développement dans un contexte physiologique, mais également dans un contexte pathologique, lors d'une dérégulation des voies de signalisation impliquant les FGFs pour promouvoir le développement tumoral par exemple (Turner et Grose, 2010).

b) Rôles physiologiques du complexe ternaire HS / FGF / FGFR

Comme nous l'avons vu précédemment, les FGFs sont capables d'engendrer de nombreuses réactions biologiques par l'intermédiaire de leur fixation à leurs récepteurs (FGFRs) et leurs corécepteurs (HS). La fixation du FGF sur son récepteur induit un changement conformationnel permettant la dimérisation du récepteur. Celle-ci entraîne une activation du récepteur par transphosphorylation des résidus tyrosines intracellulaires aboutissant à l'activation de multiples voies de signalisation dont la voie des MAP-kinase impliquée dans la prolifération et la voie PI3K-AKT impliquée dans la survie cellulaire (Turner et Grose, 2010).

Il est maintenant établi que l'activation des voies de signalisation induites par les FGFs contrôle des événements physiologiques tels que le développement, en contribuant à la structuration du mésoderme au début de l'embryogénèse par exemple (Kimelman et Kirschner, 1987). Plus récemment, le rôle des FGFRs, et notamment de l'isoforme IIIb, récepteur spécifique du FGF-7, a été mis en évidence dans le développement de multiples organes tels que les membres et les poumons (De Moerlooze *et al.*, 2000). D'autre part, la signalisation du FGF a également une implication dans de nombreuses fonctions physiologiques de l'organisme adulte, y compris la régulation de l'angiogenèse et la réparation des plaies (Turner et Grose, 2010).

Dans le contexte de la formation du complexe ternaire HS / FGF / FGFR, nous avons détaillé précédemment l'importance des *N*-, 2-*O* et 6-*O* sulfatation des HS pour la fixation et l'activation du FGF-2. D'autres travaux se sont intéressés aux conséquences cellulaires de la 6-*O*-désulfatation des HS par les endosulfatases (Sulf1 et Sulf2, voir partie II-C-7). Les

travaux de Wang (2004) ont ainsi montré que l'expression de Sulfl est associée à une diminution de l'activation du FGFR et a pour conséquence une inhibition de la formation du mésoderme lors de l'embryogénèse chez le xénope, ainsi qu'une inhibition de l'angiogenèse dans les embryons de poulet. Ces travaux ont permis de montrer que Sulfl, responsable de la 6-O-désulfatation des HS, régule négativement la signalisation du FGF-2 dans la mesure où les motifs 6-O-sulfatés avec lesquels interagit le FGF-2 ne sont plus présents. Sulfl empêche par conséquent la formation du complexe ternaire actif HS / FGF / FGFR (Wang *et al.*, 2004). Une autre étude a confirmé ces données en montrant qu'une diminution des groupements 6-O-sulfates des HS freine la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo*. Ces résultats montrent que les HS 6-O-sulfatés régulent des processus physiologiques importants tels que l'angiogenèse en relation avec l'activation des voies de signalisation impliquant le FGF-2 (Ferrerias *et al.*, 2012).

c) Implications pathologiques du complexe ternaire HS / FGF / FGFR

De part leur expression ubiquitaire, les FGFRs régulent des processus physiologiques essentiels, tels que la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Autant de processus qui rendent les voies de signalisation du FGF susceptibles d'être dérégulées dans des conditions pathologiques, en particulier dans les cellules cancéreuses (Turner et Grose, 2010).

Dans un contexte pathologique, il a été montré que la dégradation spécifique des HS membranaires par des héparinases conduit à l'inhibition des voies de signalisation activées par le FGF, et aboutit à une diminution importante de la prolifération des cellules tumorales de pancréas (Xu *et al.*, 2007). De plus, des travaux réalisés sur des coupes de tissus tumoraux de chondrosarcomes ont révélé une augmentation de l'expression des 6-O-sulfotransférases au cours de la progression tumorale, renforçant l'implication de ces motifs dans la fixation des FGFs à leurs récepteurs et dans leur capacité à activer des voies de signalisation associées. Une corrélation négative a ainsi été établie entre les patients présentant un fort taux d'expression des 6-OSTs au sein des tumeurs de chondrosarcomes et leur survie. Des expériences complémentaires réalisées sur des cellules de chondrosarcomes de stade III, avec envahissement des ganglions lymphatiques, ont mis en évidence l'augmentation de la 6-O-sulfatation des HS au cours de la progression tumorale. Le rôle déjà décrit de la 6-O-

sulfatation dans l'activation du FGF-2 a permis de faire le lien entre la forte expression des 6-OSTs et la progression tumorale (Waijjer *et al.*, 2012).

Cependant, aucune réponse claire ne permet d'expliquer comment l'action du FGF peut être pro-tumorale dans certains contextes ou avoir un rôle suppresseur de tumeur dans d'autres.

Dans le cadre du développement tumoral, la sénescence cellulaire est considérée comme un important mécanisme suppresseur de tumeur dans la mesure où des cellules quiescentes ne prolifèrent pas. Les travaux récents de Jung (2016) se sont intéressés au rôle des HS et de leurs motifs sulfatés dans ce contexte. Dans un premier temps il a été montré que l'inhibition de l'expression de la PAPSS2 (3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate 2 synthétase), par un siRNA conduit à la diminution de la prolifération des cellules MCF-7 d'adénocarcinome mammaire. Pour rappel, la PAPSS2 est une enzyme qui synthétise le PAPS, substrat donneur de toutes les sulfotransférases impliquées dans la maturation des HS (détaillée dans la partie II). Les cellules MCF-7 n'exprimant plus la PAPSS2 présentent une morphologie typique des cellules sénescents c'est-à-dire élargies et aplaties avec une activité accrue de la SA- β -Gal (*Senescence-Associated β -Galactosidase*) caractéristique de la sénescence cellulaire. L'inhibition de l'expression de la PAPSS2 induit donc une sénescence cellulaire en relation avec la diminution du niveau de sulfatation des HS. Suite à l'extinction de la PAPSS2, les auteurs ont également mis en évidence une augmentation de l'activation du FGFR1 en quantifiant la forme active du récepteur à savoir phospho-FGFR1 (pFGFR1), la forme active d'AKT, phospho-AKT (p-AKT) et une accumulation des protéines pro apoptotiques p53 et p21. Les mêmes résultats ont été obtenus en traitant les cellules au chlorate de sodium qui est un inhibiteur chimique de la sulfatation des HS. Cela signifie que la sénescence induite par l'inhibition de l'expression de la PAPSS2 est liée à l'augmentation de la signalisation du FGFR1 et à la diminution de sulfatation des HS. L'utilisation d'un siRNA ciblant FGFR1 ou d'un siRNA ciblant AKT empêche l'accumulation de p53 et p51 et conduit à un phénomène apoptotique au lieu d'une sénescence. Ainsi l'extinction de la PAPSS2 stimule la cascade de transduction du signal impliquant FGFR1 – AKT – p53 – p51 et induit la sénescence des cellules tumorales MCF-7.

Pour déterminer quel type de sulfatation des HS est impliquée dans la régulation de la sénescence cellulaire, les cellules MCF-7 ont été transfectées par des siRNA ciblant la 2-OST1 ou la 6-OST1, connues pour avoir un rôle dans l'activation de FGFR1. Seules les cellules transfectées par le siRNA 2-OST1 présentent un phénotype de sénescence associé à une augmentation de pFGFR1, pAKT et une accumulation de p53 et p21. Ces résultats

indiquent que la 2-*O*-sulfatation des HS est critique dans la régulation de la signalisation du FGFR1, empêche la sénescence et favorise ainsi la progression tumorale (Jung *et al.*, 2016). Cette étude montre qu'une diminution de la 2-*O*-sulfatation des HS augmente la signalisation du FGFR. Par conséquent, ceci suggère que la 2-*O*-sulfatation des HS réduit l'activation du FGFR. En effet, les auteurs ont montré, par des expériences de co-immunoprécipitation, que la diminution de la sulfatation des HS conduit à une augmentation de la liaison des FGF-1 et 2 à leur récepteur FGFR1 induisant une activation excessive de FGFR responsable de la sénescence.

3. Interaction des HS 3-*O*-sulfatés avec les FGFs

Bien que l'implication de la 3-*O*-sulfatation des HS dans la liaison aux FGFs ne soit pas encore à ce jour une fonction biologique majeure attribuée aux HS 3-*O*-sulfatés, elle a tout de même fait l'objet de nombreuses études et a été la thématique centrale de mes travaux de thèse.

a) Rôle de la 3-*O*-sulfatation dans la liaison aux FGF-1 et -2

Des travaux ont étudié l'affinité des FGFs et de leurs récepteurs respectifs pour les structures oligosaccharidiques de type HS et Hep portant des motifs 3-*O*-sulfatés. C'est ainsi que McKeehan *et al.*(1999) ont évalué la liaison du FGFR1 sur des fractions d'Hep présentant une affinité variable pour l'antithrombine (AT). De façon intéressante, seule la fraction de l'Hep liant l'AT était capable de lier le FGFR1, indiquant la nécessité de la présence des motifs 3-*O*-sulfatés dans cette interaction. En effet, l'AT se lie à une structure oligosaccharidique de type HS contenant un motif 3-*O*-sulfaté (voir partie III-B). Ce résultat a mis en évidence le rôle des HS aux propriétés anticoagulantes dans la formation d'un complexe avec le FGFR1. D'autre part, cette étude a également montré que les FGF-1 et -2 sont capables de former des complexes aussi bien avec des fractions d'Hep liant l'AT qu'avec des fractions ne la liant pas, suggérant que la liaison des FGF-1 et 2 aux HS et à l'Hep ne nécessite pas forcément la présence de groupements 3-*O*-sulfatés à l'inverse du FGFR1. Ce résultat a été confirmé par les travaux de Ye *et al.*, 2001 qui ont montré que les fragments d'Hep liant les FGF-1 et -2 n'ont pas la capacité d'inhiber le facteur Xa qui est par contre inhibé par l'antithrombine (voir partie III-B, Figure 19).

b) Rôle de la 3-O-sulfatation dans la liaison au FGF-7

Ye *et al.* (2001) se sont intéressés aux caractéristiques de la liaison du FGF-7 aux HS, et en particulier aux caractéristiques structurales des oligosaccharidiques liant ce facteur de croissance. Ainsi dans un premier temps, il a été montré que le FGF-7, *a contrario* des FGF-1 et 2, se lie à des fractions d'Hep ayant le même pouvoir d'inhibition du facteur Xa que les fragments liant l'AT. Cette observation suggère une implication de la 3-O-sulfatation des oligosaccharides issus des HS vis-à-vis de la liaison au FGF-7. Dans un deuxième temps, l'affinité de liaison du FGF-7 pour ces structures oligosaccharidiques (sulfatées) a été évaluée en mesurant l'index dit « de protection » du FGF-7 contre la dégradation par la protéase pronase. La protection contre la protéolyse témoigne de l'interaction du FGF-7 avec les oligosaccharides au niveau de ces motifs, ce qui bloque l'action de la pronase vis-à-vis du FGF-7. Deux structures oligosaccharidiques ont été testées dans ce contexte : une structure décasaccharidique (AT10) et une structure tétradecasaccharidique (AT14). 3-O-sulfatées à leurs extrémités réductrices. Les résultats ont montré une augmentation de 1.5 fois de l'index de protection du FGF-7 avec l'AT14 par rapport à l'AT10, mettant en évidence qu'une augmentation de la taille de l'oligosaccharide sulfaté améliore la liaison du FGF-7. Dans un troisième temps, pour confirmer l'hypothèse de l'importance de la 3-O-sulfatation dans la liaison du FGF-7 aux HS et à l'Hep, l'index de protection du FGF-7 a été mesuré en utilisant les mêmes structures oligosaccharidiques que précédemment mais sans groupements 3-O-sulfates, ces structures sont respectivement appelées 10 et 14. En l'absence des groupements 3-O-sulfatés, l'index de protection du FGF-7 chute de 3 et 2 fois respectivement pour les structures oligosaccharidiques 10 et 14. Ce résultat confirme donc l'importance de la 3-O-sulfatation dans la liaison du FGF-7 aux HS et à l'Hep (Ye *et al.*, 2001).

Ces données fournissent des informations importantes sur la structure des HS interagissant avec le FGF-7, mettant en évidence des caractéristiques communes avec les HS anticoagulants, en particulier l'importance de la taille du motif reconnu et sa 3-O-sulfatation, cruciale pour l'établissement de l'interaction. Ces caractéristiques sur la composition et la longueur de la chaîne d'HS sont donc nécessaires pour comprendre la formation du complexe FGF-7 avec son récepteur FGFR2IIIb, en relation avec la présence des HS 3-O-sulfatés, afin d'activer la signalisation cellulaire (Ye *et al.*, 2001).

Dans le même contexte, les travaux de Luo *et al.*, (2006) se sont intéressés à la formation du complexe HS / FGF-7 / FGFR2IIIb. Dans un premier temps, le FGF-7 recombinant de rat a été couplé à la GST (Glutathion-S-Transférase) et immobilisé sur une colonne d'affinité contenant du glutathion. Des fragments de HS de taille définie ont ensuite été ajoutés dans la colonne. Une étape d'éluion des fragments de HS liés au FGF-7 recombinant (avec des concentrations croissantes de sels) a permis d'établir un classement des fractions d'éluion des fragments en fonction de leur affinité pour le FGF-7. Il a ensuite été montré que les fragments de HS ayant une forte affinité pour le FGF-7 sont ceux qui permettent la plus forte liaison du FGF-7 au niveau du récepteur FGFR2IIIb présent à la surface des cellules d'insectes Sf9 préalablement infectés par un baculovirus recombinant permettant l'expression du récepteur couplé à la GST dans les cellules infectées. Pour connaître les caractéristiques structurales des fragments de HS présentant une forte affinité pour le FGF-7, des tests de liaison du FGF-7 au FGFR2IIIb ont été réalisés en utilisant des oligosaccharides de taille définie et en mesurant le pourcentage de ¹²⁵I-FGF-7 lié. Il a ainsi été montré que l'interaction entre le facteur de croissance et son récepteur ne se fait pas lorsque les oligosaccharides comportent moins de huit monosaccharides et qu'au delà de huit unités, cette interaction augmente en fonction de la taille de l'oligosaccharide (de 10 à 14 unités). Ces résultats indiquent qu'un octasaccharide est la taille minimale pour permettre la formation du complexe HS / FGF-7 / FGFR2IIIb. Finalement, pour déterminer la nature de l'octasaccharide qui présente la plus forte affinité pour le FGF-7, des analyses en chromatographie échangeuse d'ions, par spectrométrie de masse et par analyse de la composition disaccharidique ont été réalisées. Ces études ont permis de montrer que l'octasaccharide reconnu par le FGF-7 contient une unité disaccharidique bisulfatée (HexA2S – GlcN6S), une unité disaccharidique trisulfatée (GlcA – GlcNS-3S-6S) et les autres unités sont variablement monosulfatées ou non-sulfatées. Ces données mettent en évidence le très haut degré de spécificité structurale des HS vis-à-vis de leur interaction avec le FGF-7 et démontrent à nouveau le rôle crucial de la 3-O-sulfatation dans cette reconnaissance et dans la formation du complexe ternaire HS / FGF-7 / FGFR2IIIb (Luo *et al.*, 2006).

Ces travaux ont permis de fournir des données structurales très précises sur les motifs d'interaction et de mettre en évidence le rôle crucial de la 3-O-sulfatation des HS dans la liaison au FGF-7 et à son récepteur FGFR2-IIIb. Cependant, il est important de noter que ces données fournissent des preuves indirectes du rôle de la 3-O-sulfatation dans la liaison du

FGF-7 aux HS, puisque les différentes études sont réalisées *in vitro* avec des fractions d'oligosaccharides plus ou moins sulfatés.

B. Implication de la 3-O-sulfatation dans l'activité anticoagulante de l'antithrombine III (AT-III)

L'interaction Hep (ou HS de synthèse) / protéine cible la plus étudiée et la mieux caractérisée à ce jour est la liaison de l'antithrombine III (AT-III) avec l'Hep, qui nécessite la présence des groupements 3-O-sulfates sur la chaîne de GAG (Marcum *et al.*, 1983 ; Princiville *et al.*, 2001). Dans la cascade de coagulation sanguine, l'AT-III est un inhibiteur naturel des facteurs IXa et Xa, ainsi que de la thrombine, et joue un rôle central dans l'hémostase (voir Figure 19). Cet effet inhibiteur peut être augmenté en présence d'Hep. A ce titre, l'Hep, ou ses oligosaccharides analogues de synthèse, sont utilisés en routine en clinique en tant qu'anticoagulant pour leur capacité à activer l'antithrombine (Peterson *et al.*, 2009 ; Thacker *et al.*, 2014).

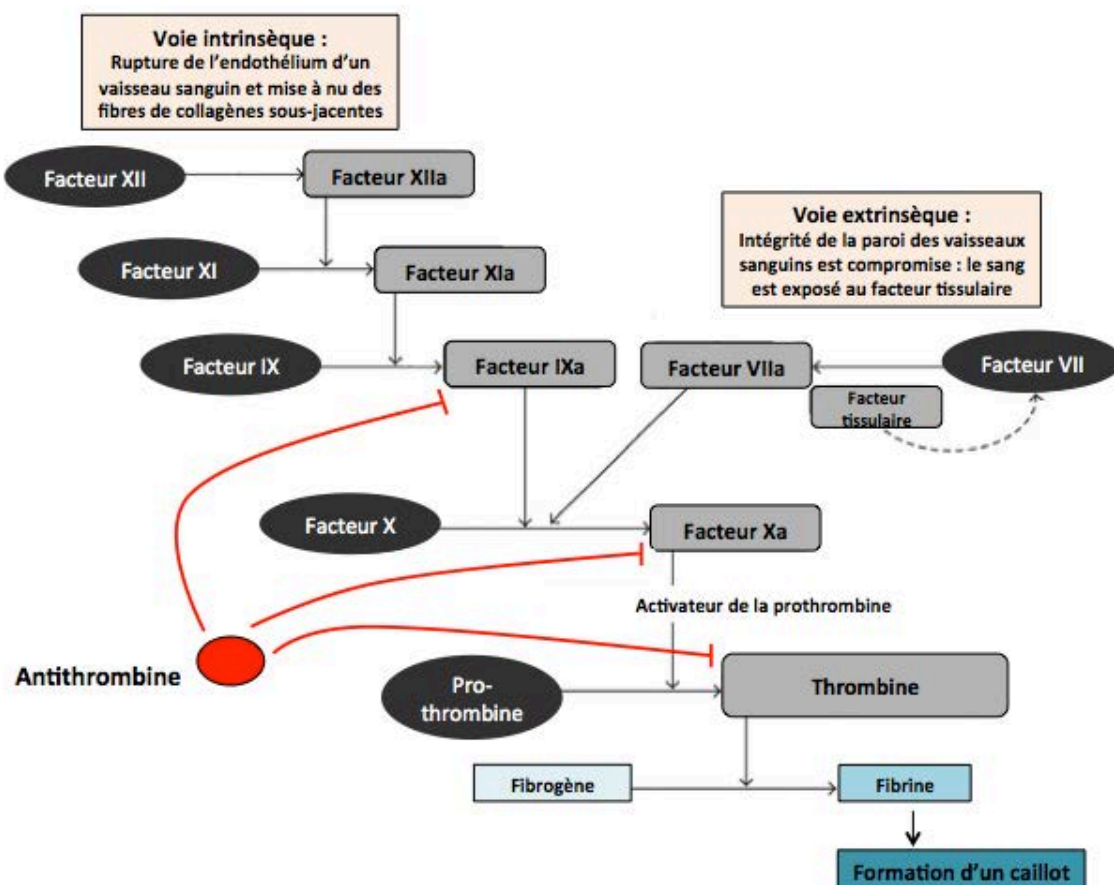


Figure 19. L'antithrombine : un inhibiteur de la cascade de la coagulation sanguine

Suite à une brèche au niveau de la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins, la cascade de coagulation se met en place. Elle est constituée de deux voies qui mènent à la production de fibrine permettant la formation d'un caillot. Ces deux voies sont la voie extrinsèque, dépendante du facteur tissulaire, et la voie intrinsèque. Les facteurs de coagulation sont des protéases à sérine qui sont activées par clivage. Dans ce contexte l'antithrombine joue un rôle d'inhibiteur des facteurs IXa et Xa et de la thrombine empêchant ainsi la coagulation sanguine. Modifié d'après Friedman, 2010.

1. Mécanisme de liaison de l'antithrombine à l'héparine

La liaison de l'AT-III à l'Hep induit un changement de conformation protéique, se traduisant en particulier par l'exposition de la boucle réactive de la protéine, phénomène qui est à l'origine de son activité physiologique (Rosenberg et Damus, 1973 ; Bourin et Lindahl, 1993) (Figure 20). Ce changement conformationnel induit par la liaison à l'Hep, permet à l'AT-III d'interagir avec la thrombine et le facteur Xa et d'augmenter son activité inhibitrice de 9,000 et 17,000 fois respectivement vis à vis de ces protéases (Whisstock *et al.*, 2000). Il est important de noter que l'antithrombine joue également un rôle d'inhibiteur de la croissance tumorale en empêchant la prolifération des cellules de cancer du poumon non à petites cellules *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo* dans un modèle de xénogreffes de souris (O'Reilly *et al.*, 1999).

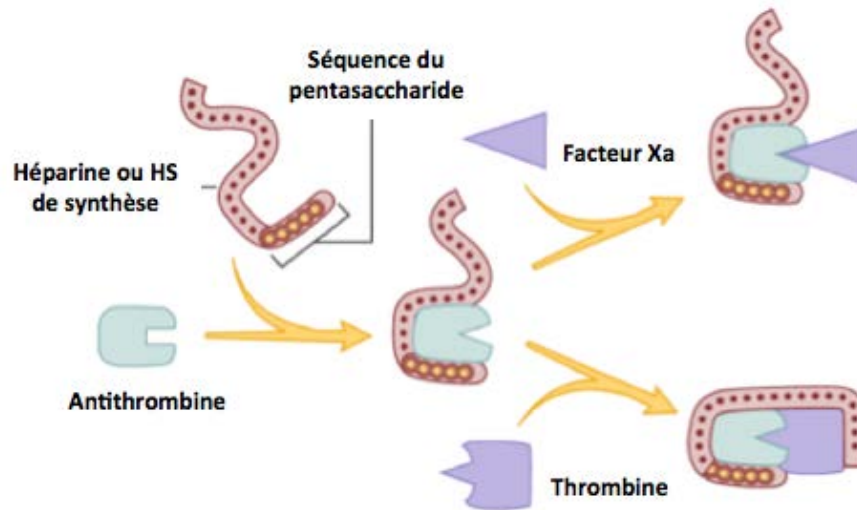


Figure 20. Mécanisme d'action de la liaison de l'antithrombine à l'héparine et aux chaînes de HS

La liaison de l'antithrombine III (AT-III) à l'héparine est médiée par la reconnaissance d'une séquence pentasaccharidique possédant une glucosamine centrale 3-O-sulfatée. Cette liaison induit un changement conformationnel de l'AT-III et facilite son interaction avec le facteur Xa et la thrombine afin d'inhiber la cascade d'activation des facteurs de coagulation. Modifiée d'après Cronenwett et Johnston, 2014, *Rutherford's Vascular Surgery 8th edition*, Chapter 35, page 555.

2. Le motif pentasaccharidique 3-O-sulfaté de type HS impliqué dans la liaison à l'antithrombine

Les interactions Hep (ou HS) / ligands sont médiées par la reconnaissance d'une séquence polysaccharidique bien définie d'un point de vue structural et fonctionnel. Dans ce cas, l'antithrombine reconnaît un motif pentasaccharidique de type HS $\text{GlcNAc/NS6S-GlcUA-GlcNS}\pm\text{6S3S-I doUA2S-GlcNS6S}$ contenant un résidu glucosamine central dont la 3-

O-sulfatation est indispensable à la fixation de l'AT-III (Thunberg *et al.*, 1982 ; Choay *et al.*, 1983) (Figure 21). L'absence du groupement 3-*O*-sulfate sur la glucosamine diminue dramatiquement l'affinité de l'AT-III ($K_d = 30 \text{ nM}$ *versus* $500 \text{ }\mu\text{M}$) et réduit à la fois le changement conformationnel de l'AT-III et donc, son pouvoir d'inhibition sur le facteur Xa (Atha *et al.*, 1987). Il s'agit de la relation structure-fonction la mieux connue attribuée aux HS, montrant l'importance des groupements 3-*O*-sulfates dans la formation de motifs oligosaccharidiques biologiquement actifs au niveau des chaînes de GAGs (Lindhal *et al.*, 1980 ; Thacker *et al.*, 2014).

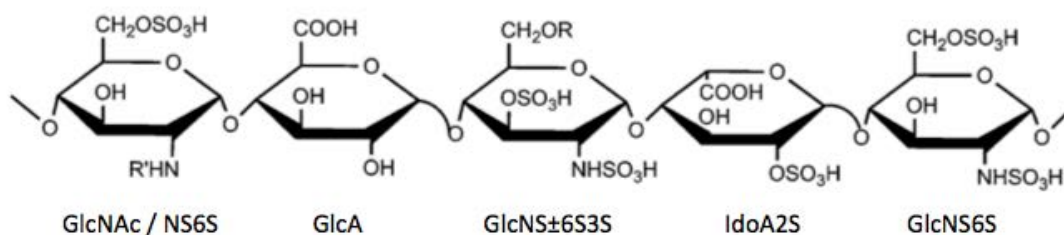


Figure 21. Motif pentasaccharidique de fixation à l'antithrombine III

La fixation de l'AT-III à l'Hep est médiée par la reconnaissance d'un motif pentasaccharidique présentant une structure bien définie. À l'extrémité non réductrice se trouve un résidu glucosamine pouvant être *N*-acétylé ou *N*- et 6-*O*-sulfaté (GlcNAc / NS6S) alors que la glucosamine à l'extrémité réductrice est invariablement *N*- et 6-*O*-sulfatée (GlcNS6S). La 3-*O*-sulfatation de la glucosamine centrale est cruciale pour la reconnaissance de l'Hep par l'AT-III, ce résidu est également invariablement *N*-sulfaté et peut être 6-*O*-sulfaté (GlcNS±6S3S). Le résidu central est bordé par un acide glucuronique (GlcA) et un acide iduronique 2-*O*-sulfaté (IdoA2S) dont la présence est également essentielle à l'interaction Hep/AT-III. D'après Peterson *et al.*, 2009

Bien que la littérature décrive le plus fréquemment une structure précise du motif pentasaccharidique de liaison de l'AT-III à l'Hep, d'autres structures sont capables de la même fonction et présentent même une affinité plus élevée vis-à-vis de l'AT-III, en lien avec une activité biologique de l'AT-III plus intense qu'en présence du motif pentasaccharide seul (Thacker *et al.*, 2014). En effet, des études ont mis en évidence qu'une structure octasaccharidique de séquence UA-GlcNAc / NS6S-GlcUA-GlcNS±6S3S-IdoUA2S-GlcNS±6S3S-IdoUA2S-GlcNS6S possédant un groupement 3-*O*-sulfate en plus sur la glucosamine du côté réducteur, permet une augmentation de l'interaction avec l'antithrombine de 40% par rapport à celle obtenue avec le pentasaccharide (Guerrini *et al.*, 2013). Ce résultat confirme l'importance cruciale de la 3-*O*-sulfatation du motif oligosaccharidique interagissant avec l'Hep dont l'affinité augmente avec le nombre de résidus glucosamine 3-*O*-sulfatés.

3. Rôle des 3-OSTs dans la production de HS coagulants

La production de HS dits anticoagulants (HS(act)) par les cellules endothéliales vasculaires est régulée par le niveau d'expression de la 3-OST1. Par conséquent, il a longtemps été proposé que les niveaux d'expression des HS(act) pouvaient réguler l'hémostase. Ce potentiel rôle des HS(act) a été évalué en générant des souris déficientes n'exprimant pas la 3-OST1. De façon surprenante, ces souris ne présentent pas de défaut de coagulation, bien qu'elles présentent un retard de croissance intra-utérine et une diminution considérable de la synthèse de HS dits « *AT-type* ». Ces résultats ont suggéré que les HS(act) ne sont pas essentiels à la régulation de la cascade de coagulation et que d'autres structures de type HS 3-*O*-sulfatés par exemple, peuvent servir d'alternative pour compenser ce rôle biologique et assurer une hémostase normale en absence de 3-OST1 (Shworak *et al.*, 2002 ; Haj Mohammadi *et al.*, 2003).

Deux explications ont été proposées à ce sujet. La première s'expliquerait par un phénomène de compensation par les autres sulfotransférases. En effet, la 3-OST5 pourrait créer suffisamment de HS de type AT pour compenser la perte de 3-*O*-sulfatation lié à l'absence de la 3-OST1. D'autres 3-OSTs dites « *gD-type* » semblent également être de bons candidats pour générer des HS de type AT, notamment la 3-OST3A, la 3-OST3B et la 3-OST6, dont l'expression des ARNm a été mise en évidence dans les cellules de reins de souris déficientes en 3-OST1 (Girardin *et al.*, 2005). La deuxième explication vient du fait que d'autres types cellulaires que les cellules endothéliales sont capables de produire des HS(act), notamment les fibroblastes et les cellules épithéliales, de façon suffisante au maintien de l'hémostase (Marcum *et al.*, 1986 ; Pejler et David, 1987).

Des travaux effectués chez des patients présentant un excès de coagulation ont mis en évidence des mutations de l'AT-III au niveau de son site de liaison à l'Hep. Ceci a permis de montrer l'importance de ces GAGs dans l'activation de l'AT-III *in vivo*. Ces mutations ont révélé une coopération entre les résidus Lys125, Arg129, Lys136 et Arg47 de l'AT-III, résidus exposés à la surface de la protéine, pour permettre sa fixation spécifique au pentasaccharide de l'Hep (Gandrille *et al.*, 1990). Une autre étude a mis en évidence la mutation du résidu Arg47 en cystéine qui a pour conséquence une diminution de la charge positive de l'AT-III et de son affinité pour l'Hep. Ces données montrent le rôle essentiel de l'Arg47 de l'AT-III dans sa liaison à l'Hep (Koide *et al.*, 1984). En conséquence, des souris porteuses d'une mutation ponctuelle de l'Arg48 en cystéine, correspondant au variant Arg47 chez l'Homme, souffrent d'une thrombose spontanée sévère dès la naissance et ne répondent pas aux traitements anticoagulants contenant des dérivés d'Hep. Ce résultat démontre que

l'effet anti thrombotique de l'Hep est lié à sa capacité à lier l'AT-III au niveau de ce domaine protéique (Dewerchin *et al.*, 2003).

Ces différentes études se sont focalisées sur la structure de la séquence saccharidique impliquée dans l'interaction à l'AT. Elles mettent en évidence le rôle majeur de la 3-*O*-sulfatation médiée par la 3-OST1 dans la production des HS(act). Cependant, tous les HS maturés par la 3-OST1 n'ont pas une grande affinité de liaison pour l'AT et le rôle de la 3-*O*-sulfatation catalysée par la 3-OST1 reste mal caractérisée si elle est considérée dans un autre contexte que la formation de sites de liaison à l'AT. Ainsi, en absence de leur implication dans la fixation à l'AT-III, ces motifs 3-*O*-sulfatés ne sont, à ce jour, pas encore caractérisés d'un point de vue fonctionnel (Thacker *et al.*, 2014).

C. Implication de la 3-*O*-sulfatation dans l'infection par l'*Herpes Simplex virus* de type 1 (HSV-1)

1. Mécanisme d'infection par l'HSV-1 : rôle des HS 3-*O*-sulfatés

La glycoprotéine D (gD) est une protéine de l'enveloppe virale de l'*Herpes Simplex virus* de type 1 (HSV-1) qui reconnaît spécifiquement les cellules cibles pour permettre la fusion de l'enveloppe du virus avec la membrane plasmique lors de l'infection. Cette étape de fusion est médiée par une interaction entre la gD et les HSPGs de surface présentant des motifs 3-*O*-sulfatés. Les premières isoformes des 3-OSTs identifiées comme étant impliquées dans la génération de sites de fixation de la gD de l'HSV-1 ont été les 3-OST3A et 3B (Shukla *et al.*, 1999). Par la suite, d'autres études ont également mis en évidence l'implication des 3-OST2, 4, 5 et 6 dans ce mécanisme (Xia *et al.*, 2002 ; Tiwari *et al.*, 2005 ; Xu *et al.*, 2005 ; O'Donnell *et al.*, 2006). Il a été montré que les cellules CHO sont naturellement résistantes à l'infection par l'HSV-1, mais l'introduction dans ces cellules de vecteurs d'expression contenant la séquence codant les 3-OSTs de type gD rend l'infection possible. Ce résultat permet de faire le lien entre la 3-*O*-sulfatation et la capacité du virus à infecter les cellules. (Thacker *et al.*, 2014).

Des expériences de co-immunoprécipitation de la glycoprotéine D avec les HS purifiés à partir de cellules CHO transfectées de façon à surexprimer la 3-OST3A ont permis de quantifier l'affinité de la gD pour les HS 3-*O*-sulfatés. Ainsi, l'affinité de la gD pour les HS est augmentée par la 3-*O*-sulfatation médiée par la 3-OST3A ($K_d = 43 \mu\text{M}$ en présence de HS 3-*O*-sulfatés contre $2 \mu\text{M}$ en présence de HS non sulfatés). Par conséquent, la 3-*O*-sulfatation

permet une augmentation considérable de la susceptibilité à l'infection virale (Shukla *et al.*, 1999). Ces résultats montrent que la 3-*O*-sulfatation peut avoir un effet biologique important sans pour autant générer des sites de fixation de haute affinité pour la protéine cible (Thacker *et al.*, 2014). Des études de co-cristallisation seraient cependant nécessaires pour déterminer comment la 3-*O*-sulfatation améliore la liaison de la gD aux HS et faciliterait la fusion membranaire pour l'infection cellulaire (Thacker *et al.*, 2014).

2. Le motif octasaccharidique 3-*O*-sulfaté de type HS impliqué dans l'infection par l'HSV-1

Il a été établi que le motif d'interaction de la protéine gD avec HS correspond à un octasaccharide de séquence UA-GlcNS-IdoA2S-GlcNAc-UA2S-GlcNS-IdoA2S-GlcNH₂3S6S contenant un résidu glucosamine 3-*O*-sulfaté au niveau de l'extrémité réductrice et liée à un résidu IdoA2S (Figure 22).

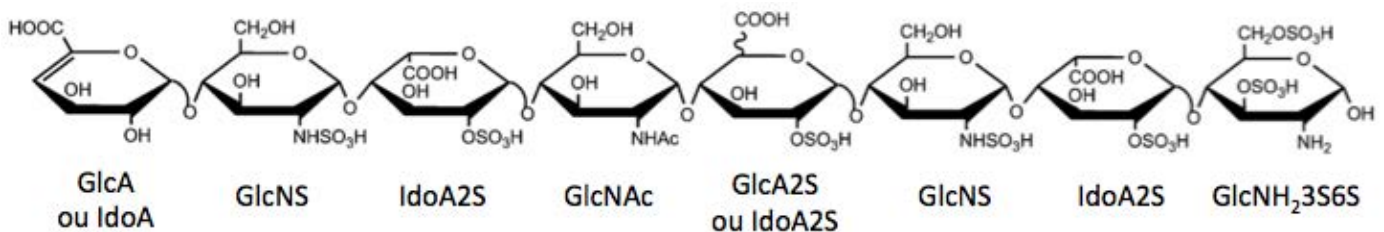


Figure 22. Motif octasaccharidique de fixation à la glycoprotéine D (gD) de l'enveloppe virale de l'Herpes Simplex virus de type 1 (HSV-1)

Le site de liaison de la gD de l'HSV-1 à l'héparine et aux HS est un octasaccharide présentant une glucosamine 3-*O*-sulfatée également 6-*O*-sulfatée et *N*-non substituée (GlcNH₂3S6S) liée à un acide iduronique 2-*O*-sulfaté (IdoA2S) à l'extrémité réductrice de l'oligosaccharide. D'après Peterson *et al.*, 2009.

Des études ont montré que d'autres octasaccharides dérivés de l'Hep peuvent également interagir avec la gD, c'est le cas de l'octasaccharide de séquence UA2S-GlcNS6S-IdoUA2S-GlcNS6S-IdoUA2S-GlcNS3S6S-IdoUA2S-GlcNS6S par exemple (Copeland *et al.*, 2008). L'identification précise de la structure de ces octasaccharides permet de fournir des informations précieuses pour la découverte de nouvelles drogues anti-HSV-1 et d'envisager ces octasaccharides comme potentiels inhibiteurs de l'infection par le HSV-1 pour s'opposer à l'entrée du virus dans les cellules (Hu *et al.*, 2011).

D. La 3-O-sulfatation dans le développement

En dehors de ses rôles les plus connus dans la fixation de l'AT-III et l'entrée de l'HSV-1 dans les cellules, des données tendent à montrer que la 3-O-sulfatation peut moduler divers processus impliqués dans le développement d'organismes modèles tels que l'embryogenèse, l'organogenèse, le développement neuronal ou encore la prolifération cellulaire (Thacker *et al.*, 2014).

a) Etudes du développement chez le Poisson Zèbre

Chez le Poisson Zèbre, il a été montré que les cellules DFCs (*Dorsal Forerunner Cells*) sont capables de former un épithélium cilié au sein d'un organe appelé vésicule de Kupffer (KV), une structure impliquée dans la mise en place de l'asymétrie gauche-droite dans cet organisme au cours des étapes précoces du développement. L'ablation de la KV a montré un rôle direct des cellules DFCs durant les stades précoces du développement, en participant à la mise en place de l'asymétrie gauche-droite du cerveau, du cœur et de l'intestin. (Essner *et al.*, 2005). Le lien avec les 3-O-sulfotransférases a été établi quelques années plus tard lors de l'identification de l'implication de deux isoformes de cette famille d'enzymes dans des voies de signalisation distinctes pour réguler la mise en place de l'asymétrie gauche-droite *via* le contrôle de la taille et de la motilité des cils de la KV (Neugebauer *et al.*, 2013). Des expériences d'inactivation génique par un oligonucléotide *morpholino* spécifique ont montré que la 3-OST5 joue un rôle dans le contrôle de la longueur des cils, en activant les facteurs de transcription ciliogéniques *foxj1* et *rfx2*. Les auteurs ont émis l'hypothèse que cette régulation dépendait des voies de signalisation activées par le FGF-8 et le FGF-24, dont le rôle dans l'expression des facteurs ciliogéniques avait été précédemment démontré (Neugebauer *et al.*, 2009). Bien que le FGF-8 soit une HBP connue dont la fixation aux HS dépend de motifs 6-O et N-sulfatés, l'implication de la 3-O-sulfatation dans sa fixation n'a pas encore été mise en évidence (Li *et al.*, 2016). De la même façon, l'inactivation génique de la 3-OST6 a permis qu'à l'inverse de la 3-OST5, l'isoforme 6 ne semble pas impliquée dans la régulation de la longueur des cils, mais dans la régulation de leur motilité. En effet, la 3-OST6 active la transcription du gène *kif3b*, la kinésine 3b (Kif3b) étant une protéine motrice dotée d'une capacité de déplacement le long des cils (Neugebauer *et al.*, 2013).

Une autre étude a montré l'implication de la 3-OST7 dans le développement cardiaque du Poisson Zèbre. Dans ce contexte, l'inactivation génique de la 3-OST7 par un oligonucléotide *morpholino* a entraîné une désorganisation du cœur associée à une réduction de la contraction ventriculaire (Samson *et al.*, 2013). Sachant que lors du développement

cardiaque normal chez le Poisson Zèbre, la 3-OST7 restreint l'expression de la BMP4 (*Bone Morphogenetic Protein 4*) au niveau de la jonction auriculo-ventriculaire, les auteurs ont émis l'hypothèse qu'une dérégulation de l'expression tissulaire de la BMP4 en absence de 3-OST7, conduisait à une diminution de la contractilité cardiaque. Cette étude a permis de comprendre que les HS 3-O-sulfatés sont des régulateurs de l'activité des BMPs *via* la reconnaissance entre ces morphogènes et les GAGs sulfatés, permettant un développement cardiaque normal chez le Poisson Zèbre.

En considérant que chaque membre de la famille des 3-OSTs exerce la même fonction biologique, à savoir la sulfatation en position 3 des résidus glucosamine de la chaîne de HS, le nombre important d'isoformes (7 chez les Mammifères et 8 chez le Poisson Zèbre), reste aujourd'hui encore surprenant, d'autant plus la 3-*O*-sulfatation est une modification rare représentant seulement 0.5% de la sulfatation globale des chaînes de HS. Nous pouvons donc nous interroger sur le nombre important d'enzymes présentes dans notre organisme pour catalyser une réaction enzymatique si occasionnelle (bien qu'importante). Ces travaux apportent un élément de réponse à cette diversité en émettant l'hypothèse que chaque membre de la famille de 3-OSTs agit dans un contexte spécifique en modulant des voies de signalisation distinctes avec notamment une fonction différentielle et non-redondante dans le développement. Ces travaux démontrent que chaque isoforme des 3-OSTs peut potentiellement créer des séquences uniques 3-*O*-sulfatées avec des propriétés biologiques distinctes. Cette capacité à moduler une fonction biologique grâce à la création de motifs de reconnaissance précis sur les chaînes polysaccharidiques des GAGs est dénommée « glycode » (Neugebauer *et al.*, 2013 ; Thacker *et al.*, 2014).

b) Etudes du développement chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*)

Un autre organisme modèle illustrant l'implication de la 3-*O*-sulfatation dans le développement est *C. elegans*. Il exprime deux 3-*O*-sulfotransférases, appelées 3-OST1 et 3-OST2, apparentées aux types AT et gD respectivement (voir partie II.D.4).

Une étude a identifié une fonction de la 3-*O*-sulfatation des HS dans la ramification de certains neurones, comme celle du neurone HSN (*Hermaphrodite Specific Neuron*) et celle de l'interneurone AIY qui dépendent d'une surexpression de la molécule matricielle d'adhésion kal-1 (Tecele *et al.*, 2013). Les auteurs ont montré que les 3-OST1 et 3-OST2 sont toutes les deux nécessaires au branchement de l'HSN puisque l'inhibition de leur expression par des

ARN interférents est associée à un branchement aberrant de ce neurone. Ces résultats démontrent que les 3-OSTs jouent des rôles très spécifiques au cours du développement neuronal chez *C. elegans*. La 3-*O*-sulfatation des chaînes de HS régulent en effet les phénomènes de branchements neuronaux et présentent la protéine kal-1 comme une HBP potentielle dont la fixation serait influencée par les motifs 3-*O*-sulfatés.

c) Etudes du développement chez la Drosophile

Comme *C. elegans*, la Drosophile exprime deux 3-*O*-sulfotransférases, la 3-OSTA et la 3-OSTB. La 3-OSTA présente près de 65% d'homologie de séquences protéique avec les 3-OST1 et 3-OST5 des mammifères, et la 3-OSTB près de 80% avec les 3-OST2, -3A, -3B, -4 et -6 des mammifères permettant de les caractériser comme des 3-OSTs de type AT et gD respectivement (Kamimura *et al.*, 2004).

Une étude a montré que l'absence d'expression de l'une ou l'autre de ces deux isoformes (3A ou 3B) entraîne une forte létalité pendant les stades embryonnaire et larvaire, indiquant le rôle déterminant de la 3-*O*-sulfatation dans le développement embryonnaire dans cet organisme (Kamimura *et al.*, 2004). Il a été observé que les défauts de développement causés par la perte de la 3-OSTB sont similaires à ceux observés par l'inactivation du récepteur Notch et de ses gènes cibles, suggérant une implication de la 3-OSTB dans la régulation de la signalisation associée à Notch. Notch est un récepteur transmembranaire activé par la liaison avec l'un de ses ligands. L'affinité du récepteur pour ses ligands dépend des modifications post-traductionnelles subies dans l'appareil de Golgi, notamment, la *O*-fucosylation suivie de l'addition de groupements N-acétylglucosamines sur les résidus fucosylés, mécanisme très proche des réactions de synthèse et de maturation des GAGs chez les mammifères. La signalisation de Notch est essentielle au développement embryonnaire. Toutefois, l'implication de la 3-OSTB dans la régulation de la signalisation médiée par Notch est surprenante puisque aucune étude n'a montré, jusqu'alors, un rôle de la 3-*O*-sulfatation dans l'interaction des ligands de Notch et les HS. Une étude a même montré un résultat contradictoire, puisque des mutants n'exprimant pas la 3-OSTB chez la Drosophile se sont tout de même montrés viables et ne présentaient pas de défaut de signalisation associées à Notch. Il semble donc, au vu des résultats les plus récents, que la 3-*O*-sulfatation (catalysée par la 3-OST3B) ne soit pas indispensable à l'activation des voies de signalisation médiées par Notch (Guo *et al.*, 2014a).

Les mêmes auteurs ont montré le rôle des 3-OSTA et 3-OSTB, dans la régulation de l'homéostasie intestinale chez la drosophile. Une inhibition de l'expression de la 3-OSTA

dans les entérocytes conduit à une augmentation de la prolifération des cellules souches intestinales et à une perte de l'homéostasie tissulaire. Il a alors été suggéré que la 3-OSTA a un rôle protecteur anti-tumorigène en contrôlant la prolifération cellulaire. La régulation de l'expression de la 3-OSTA semble donc essentielle au maintien de l'homéostasie dans l'intestin. Les mêmes observations ont été faites chez les mutants n'exprimant pas la 3-OSTB, seule ou en combinaison avec l'inhibition de l'expression de la 3-OSTA. Il a été montré que ce mécanisme d'augmentation de la prolifération est associé à une augmentation de la signalisation médiée par le récepteur à l'EGF (EGFR, *Epidermal Growth Factor Receptor*) dans lequel les HS 3-*O*-sulfatés renforceraient l'interaction de l'EGF avec son récepteur. Ces données suggèrent donc que les 3-OSTs sont impliquées dans la régulation de la prolifération des cellules souches intestinales et le maintien de l'homéostasie intestinale en relation avec la signalisation associée à l'EGFR (Guo *et al.*, 2014b).

E. La 3-*O*-sulfatation en situation pathologique

Nous avons précédemment précisé l'implication de la 3-*O*-sulfatation dans divers processus physiologiques, comme le développement la prolifération cellulaire, la migration cellulaire ou encore l'angiogenèse. Une modification des réactions de 3-*O*-sulfatation, peut parallèlement conduire à la mise en place de situations pathologiques ayant pour origine une modification des interactions entre les HS 3-*O*-sulfatés et les HBP, comme nous allons le décrire maintenant dans le cas des phénomènes inflammatoires et au cours du processus tumoral.

1. La 3-*O*-sulfatation dans l'inflammation

Wood *et al.* (2001) se sont intéressés au rôle de l'interleukine 6 (IL-6) en cas d'infection des voies urinaires et ont montré une production d'IL-6 dans l'urothélium de vessies de chien infectées par *E.Coli*. Une approche utilisant des puces à ADN a pu mettre en évidence qu'un traitement par l'IL-6 des vessies infectées stimule l'expression de cinq gènes cibles, dont celui codant la 3-OST3A. Or, les HSPGs favorisent le recrutement des leucocytes au niveau d'un site d'inflammation en mettant en place un gradient de chimiokines à la surface des cellules et en interagissant avec les L- et P-sélectines. De façon intéressante, parallèlement à cette augmentation d'expression de la 3-OST3A suite à la stimulation par l'IL-6, les auteurs ont observé une réparation accrue de l'urothelium. Les auteurs ont alors suggéré un rôle de la 3-*O*-sulfatation des HS dans ce mécanisme de réparation tissulaire. Ces résultats montrent que la sécrétion d'IL-6 pendant une infection aiguë des voies urinaires peut

jouer un rôle biologique double en initiant la réponse inflammatoire et en stimulant les mécanismes de réparation urothéliales dépendants des HS 3-*O*-sulfatés, mécanismes qui ne sont pas encore clairement établis à ce jour (Wood *et al.*, 2011).

Une autre étude s'est intéressée au lien entre les HS 3-*O*-sulfatés et les macrophages en situation inflammatoire. Les macrophages sont l'un des premiers types de cellules qui interviennent au cours du processus inflammatoire. Selon l'environnement tissulaire, ils peuvent être activés ou « polarisés » en macrophages de type M1, produisant principalement des cytokines pro-inflammatoires, permettant l'activation dite « classique », ou en macrophages de type M2, produisant principalement des facteurs anti-inflammatoires correspondant à la voie d'activation dite « alternative ». L'activation des macrophages M1 ou M2 est gouvernée par des stimuli par des cytokines produites en particulier par les lymphocytes T *helper* (Th) de type Th1 (interferon-gamma IFN- γ , IL-1 β , lipopolysaccharide LPS) ou de type Th2 (IL-4/IL-13) respectivement. Les auteurs ont montré que l'activation des macrophages M1 et M2 modifie de façon considérable l'expression de plusieurs 3-*O*-sulfotransférases. En effet, la polarisation des macrophages induite par des cytokines de type Th1 conduit à une augmentation de l'expression de la 3-OST3B et à une diminution de l'expression des 3-OST1 et 3-OST2. Le résultat inverse est obtenu lors d'une stimulation des macrophages par des cytokines de type Th2 (Martinez *et al.*, 2015). Cette étude a permis de montrer que les différentes isoformes des 3-OSTs ne répondent pas de la même façon aux stimuli pro-ou anti- inflammatoire. Leur expression est dépendante du contexte cellulaire et elles ont des fonctions distinctes et spécifiques en fonction du contexte physiopathologique. Cette observation peut constituer un élément de réponse supplémentaire pour expliquer pourquoi il existe autant d'isoformes des 3-OSTs (voir partie III.D et partie II.D.4.).

Sur la base de ces travaux, une étude réalisée sur une culture primaire de monocytes et sur une lignée cellulaire de monocytes humains s'est intéressée à l'expression des 3-OSTs suite à la stimulation par des facteurs pro-inflammatoires. Il a ainsi été montré que parmi les sept isoformes des 3-OSTs, seule l'expression de la 3-OST3B est augmentée suite à l'exposition au LPS. Le mécanisme moléculaire par lequel la stimulation par le LPS conduit à l'augmentation de l'expression de la 3-OST3B a été étudié. Les auteurs ont ainsi proposé un modèle dans lequel l'induction de la transcription du gène *3-OST3B* est dépendante de l'activation des voies de signalisation du facteur de transcription NF- κ B et des *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK). Cette induction se fait très rapidement suite aux stimuli

pro-inflammatoires et les résultats indiquent que le gène *3-OST3B* est un élément précoce dans la mise en place de la réponse inflammatoire (Sikora *et al.*, 2015).

2. La 3-O-sulfatation dans les cancers

a) Les HSPGs et le processus cancéreux

L'implication des HSPGs dans le processus tumoral fait l'objet de nombreuses études. Ces GAGs sont en effet capables de réguler de nombreux aspects de la biologie du cancer tels que la tumorigenèse, la progression tumorale et la formation de métastases. Les HSPGs de l'environnement tumoral, plus précisément ceux qui sont ancrés à la surface des cellules et ceux qui sont présents dans la MEC, sont impliqués dans la régulation du processus tumoral en relation avec leur capacité d'interaction avec les HBP dont ils peuvent contrôler les activités biologiques (Sasisekharan *et al.*, 2002).

(1) Implication des HSPGs ancrés à la surface des cellules dans le processus tumoral

L'implication des HSPGs ancrés à la surface des cellules dans le cancer a été détaillée précédemment (dans la partie III-A-2-c). Pour rappel, les HSPGs ancrés à la surface des cellules tumorales sont capables de réguler des processus divers de la tumorigenèse grâce à leur capacité à interagir avec des ligands tels que les facteurs de croissance dont ils régulent la biodisponibilité en particulier. Comme nous l'avons vu, les HSPGs peuvent jouer le rôle de co-récepteurs pour les facteurs de croissance, en particulier les FGFs, pour former un complexe ternaire HS / FGF / FGFs biologiquement actif, qui va exercer ses fonctions cellulaires pour réguler la prolifération cellulaire, l'angiogenèse ou encore la formation de métastases (voir partie A-2).

(2) Implication des HSPGs présents dans la matrice extracellulaire dans le processus tumoral

En plus de leur localisation membranaire, les HSPGs sont également produits sous forme soluble dans l'environnement tumoral et sont capables d'influencer le comportement des cellules cancéreuses en régulant notamment la prolifération et la différenciation cellulaire en interagissant avec les facteurs de croissance, comme le FGF-2 (Figure 23, Knelson *et al.*, 2014a).

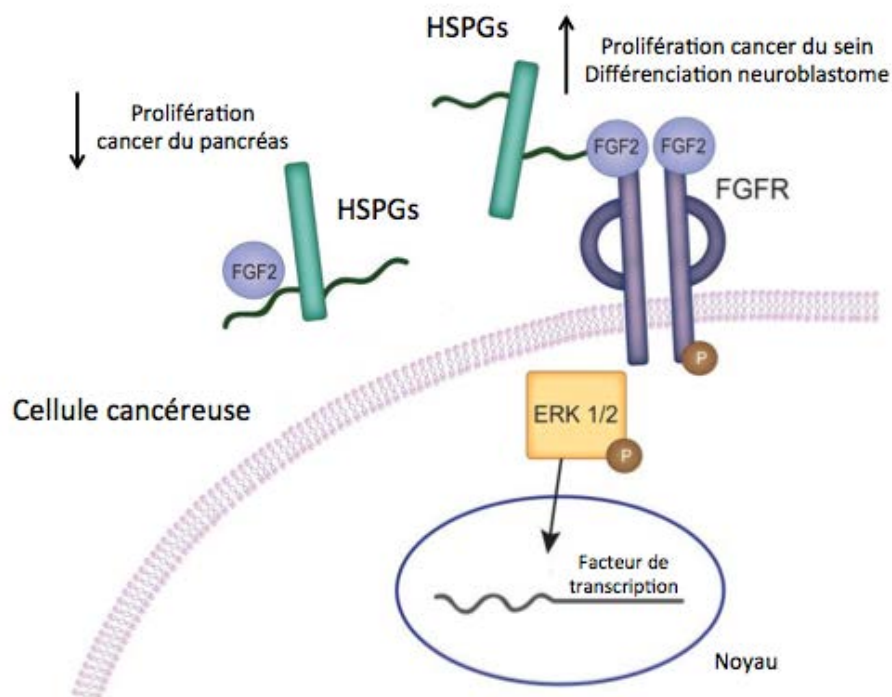


Figure 23. Les HSPGs présents sous forme soluble dans l'environnement tumoral influencent le comportement des cellules cancéreuses

Les HSPGs présents sous forme soluble dans l'environnement tumoral sont capables de lier notamment le facteur de croissance FGF-2 et de contrôler ainsi la réponse cellulaire. En effet, l'interaction du FGF-2 avec les HSPGs solubles permet de le séquestrer dans les matrices en empêchant ainsi son action activatrice vis-à-vis de son récepteur, ce qui entraîne la diminution de la prolifération des cellules de cancer de pancréas par exemple. Cependant, à l'inverse, le FGF-2 lié aux HSPGs solubles peut également être « présenté » à son récepteur de surface cellulaire (FGFR) et induire son activation. Cette activation conduit à la phosphorylation de la protéine ERK qui va à son tour activer les facteurs de transcription et permettre l'expression de gènes qui vont augmenter la prolifération des cellules de cancer de sein et la différenciation des cellules de neuroblastome par exemple. Modifié d'après Knelson *et al.*, 2014a.

La combinaison des résultats de plusieurs études a permis de révéler la dualité de fonctions des HSPGs en situation tumorale. En effet, des études ont mis en évidence un rôle pro-tumoral des HSPGs tandis que d'autres leur ont conféré un rôle anti-tumoral.

Une étude a montré que la présence d'HSPGs solubles dans le microenvironnement tumoral peut promouvoir la prolifération des cellules de cancer de sein et l'angiogenèse *via* la présentation du FGF-2 au niveau de son récepteur (Figure 23), lui permettant d'activer une voie de signalisation cellulaire pro-tumorale (Maeda *et al.*, 2006). Il est important de souligner le rôle primordial des sheddases et héparinases dans la présence des HSPGs solubles dans le microenvironnement tumoral. Une étude a en effet montré que les héparinases potentialisent le clivage des chaînes de HS du syndécan-1 (membranaire) pour les

libérer sous forme soluble dans la MEC. Ces chaînes se retrouvent donc en grande quantité dans le microenvironnement tumoral et vont pouvoir séquestrer des facteurs de croissance qui seront présentés à d'autres cellules, permettant ainsi la stimulation de la prolifération des cellules de cancer de sein *in vitro* et la formation de métastases dans les myélomes humains *in vivo* (Yang *et al.*, 2007).

D'autre part, des études ont montré que les formes solubles des HSPGs relarguées dans le microenvironnement tumoral sont impliquées dans la différenciation des cellules de neuroblastome. En effet, le traitement des lignées cellulaires de neuroblastomes par des HSPGs solubles active la différenciation des neuroblastomes en neuroblastes *via* la présentation du FGF-2 à son récepteur permettant la phosphorylation de ERK (voir Figure 23). Ce mécanisme conduit à la diminution de la prolifération des cellules de neuroblastomes et va donc à l'encontre du développement tumoral (Knelson *et al.*, 2014b). Il est important de remarquer que dans ce contexte précis, la présentation du FGF-2 à son récepteur active des voies de signalisation impliquant ERK et conduit à la différenciation des cellules de neuroblastomes et non pas à leur prolifération, conséquence cellulaire classiquement attribuée à la phosphorylation de ERK. Il semble donc que la régulation de la réponse biologique des cellules tumorales aux HSPGs soit complexe et dépende du contexte cellulaire.

De la même manière, il a également été montré que les formes solubles et membranaires d'un même type d'HSPG peuvent avoir des effets opposés dans la régulation du processus tumoral. Par exemple, une surexpression du glypican-3 membranaire a été mise en évidence au niveau de carcinome hépatocellulaire. L'augmentation de la croissance tumorale *implique* l'activation des voies de signalisation impliquant le facteur Wnt et l'IGF-R1 (*Insulin-like growth factor 1 receptor*) conduisant à la phosphorylation de ERK (Cheng *et al.*, 2008). Une autre étude a quant à elle montré que la forme soluble du glypican-3 a un effet anti-prolifératif *in vitro* sur un panel de lignée de carcinome hépatocellulaire et un effet anti-tumoral *in vivo* en diminuant la croissance des tumeurs chez des souris xénotransplantées. D'un point de vue mécanistique, les auteurs ont expliqué cet effet anti-tumoral de la forme soluble du glypican-3 par sa capacité à réduire la liaison de Wnt à la surface cellulaire et donc à inhiber la croissance tumorale dépendante de Wnt. De plus, ils ont également mis en évidence une diminution de la phosphorylation de ERK qu'ils ont expliqué par une inhibition de l'activité pro-tumorigène de plusieurs facteurs de croissance tels que le VEGF (Zittermann *et al.*, 2010).

L'expression des syndécans et des glypicans est ainsi modulée de façon positive et/ou négative dans de nombreux cancers. En lien avec cette variabilité d'expression et de localisation des HSPGs (solubles ou membranaires), des travaux ont montré que l'expression des enzymes de biosynthèse et de maturation des HS est également souvent impactée lors du développement tumoral. Le rôle des modifications épigénétiques dans un contexte tumoral est de plus en plus mis en évidence. Dans le cadre de mes travaux de thèse, je me suis en partie intéressée aux modifications épigénétiques régulant l'expression des 3-OSTs dans ce contexte.

b) Implication de la 3-O-sulfatation dans différents types de cancers : rôle des modifications épigénétiques

Il est aujourd'hui établi que les modifications épigénétiques jouent un rôle majeur dans la survenue d'un cancer et dans le développement tumoral. En effet, les modifications post-traductionnelles des histones et la méthylation de l'ADN affectent la structure de la chromatine et altèrent l'expression des gènes en empêchant l'accessibilité de la chromatine aux facteurs de transcription. Une expression génique aberrante et la présence de modifications épigénétiques sont les caractéristiques majeures de la survenue d'un cancer. Ces modifications incluent l'acétylation / déacétylation des histones, la méthylation des histones et la méthylation de l'ADN et sont aujourd'hui connues pour jouer un rôle clé dans l'apparition et la progression de nombreux cancers tels que les cancers du colon du sein et de la prostate (Ellis *et al.*, 2009).

Dans ce contexte, plusieurs études ont montré que les gènes codant les 3-OSTs sont soumis à des régulations épigénétiques dans différents types de cancers. L'expression aberrante des 3-OSTs causée par une hyperméthylation de l'ADN est depuis un concept émergent dans la biologie du cancer (Thacker *et al.*, 2014). En effet, une hyperméthylation du gène *3-OST2* a été mise en évidence au niveau du premier exon et de la région promotrice proximale en amont du site d'initiation de la transcription dans des cellules de cancers du sein, du côlon, du poumon et du pancréas. Dans les échantillons étudiés, il a été montré que cette hyperméthylation était associée à une diminution de l'expression de la 3-OST2. De façon complémentaire, un traitement par un inhibiteur des DNA-méthyltransférases, la 5-aza-2'-déoxycytidine, a permis de restaurer l'expression du gène, confirmant l'implication d'un mécanisme de régulation épigénétique dans ce contexte (Miyamoto *et al.*, 2003).

D'autres études ont mis en évidence l'hyperméthylation du gène *3-OST2* dans un contexte tumoral. Une étude réalisée sur des tissus de cancers du col de l'utérus a montré une hyperméthylation du gène *3-OST2* dans 93% des échantillons tumoraux, alors que cette

observation n'a été faite dans aucun tissu sain. Les auteurs ont alors envisagé la 3-OST2 comme un potentiel marqueur prédictif de ce type de cancer (Shivapurkar *et al.*, 2007). Une hyperméthylation du gène *3-OST2* a également été détectée dans des lymphocytes B et T cancéreux et en cas d'hémopathies myéloïdes (Martin-Subero *et al.*, 2009). Des travaux plus récents ont mis en évidence une hyperméthylation du gène *3-OST2* dans six lignées cellulaires de cancers du poumon non à petites cellules (CPNPC) et également dans des tissus tumoraux de patients atteints de CPNPC. Un traitement par la 5-aza-2'-deoxycytidine (inhibiteur des DNA-méthyltransférases) a également permis la restauration de l'expression de la 3-OST2, confirmant la régulation épigénétique de ce gène. L'étude s'est ensuite intéressée aux conséquences fonctionnelles de l'absence d'expression de la 3-OST2 sur le comportement de ces cellules. Il a ainsi été montré que l'inhibition de la 3-OST2 est associée à une induction de la migration, de la prolifération et de l'invasion cellulaires *in vitro*, ce qui correspond à ce qui est observé dans un contexte tumoral dans lequel l'expression de la 3-OST2 est réprimée par des marques épigénétiques. La surexpression de la 3-OST2 produit l'effet inverse, ce qui confirme l'implication spécifique de ce gène dans le développement tumoral et en fait un potentiel marqueur prédictif de ce type de tumeur. Ce point est renforcé par le fait que chez les patients atteints de cancers du sein, l'hyperméthylation de la 3-OST2 est corrélée négativement à leur survie. Ces données permettent d'envisager l'hyperméthylation de la 3-OST2 comme un indicateur prédictif de la survie des patients atteints de CPNPC (Hwang *et al.*, 2013).

De la même manière, des travaux réalisés au sein de notre équipe ont pu mettre en évidence une hyperméthylation des gènes codant les 3-OST1, 2, 3A et 6 dans des cellules de chondrosarcomes, un type de cancer rare et très agressif touchant le cartilage. L'extinction de l'expression des gènes *3-OSTs* (associée à leur hyperméthylation) a pu être levée en utilisant la 5-aza-2'-déoxycytidine, qui permet la restauration de l'expression de ces gènes dans les lignées tumorales. D'un point de vue fonctionnel, il a été montré que la surexpression de ces 3-OSTs permet de diminuer la prolifération et la migration cellulaire et d'augmenter l'adhésion cellulaire (Bui *et al.*, 2010). Ces données montrent que la restauration de l'expression des 3-OSTs inhibe la croissance tumorale suggérant qu'elles pourraient être une cible thérapeutique potentielle chez les patients atteints de ce type de cancer.

Toutes ces études tendent vers l'hypothèse d'un rôle anti-tumoral des 3-OSTs. Toutefois, des études montrent des résultats contradictoires. Il a été montré que le traitement des cellules de cancer de pancréas par la trichostatine A (TSA) active l'expression du gène *3-OST3B*. La TSA est un inhibiteur des histones déacétylases qui régulent la structure de la

chromatine en déacétylant les histones et en empêchant ainsi l'accès des facteurs de transcription à la chromatine. Les résultats ont révélé que l'augmentation du niveau d'expression de la 3-OST3B suite au traitement à la TSA est impliquée dans l'initiation du processus de TEM (transition épithélio-mésenchymateuse), un événement clé dans la tumorigenèse dans certains types de cancers. En effet, la surexpression de la 3-OST3B dans les cellules de cancer de pancréas est à l'origine de l'apparition d'un phénotype dit « TEM-like », illustré par l'augmentation de l'expression protéique du facteur de transcription Snail et de sa translocation nucléaire. Une fois dans le noyau, Snail active l'expression de facteurs impliqués dans la migration cellulaire, l'une des caractéristiques du phénomène de TEM. Les résultats de cette étude ont montré une fonction inductrice de la TEM de la 3-OST3B dans le cancer du pancréas et montre le lien entre la régulation épigénétique des 3-OSTs et le processus tumoral (Song *et al.*, 2011).

Aujourd'hui le rôle des 3-OSTs dans les cancers est clairement établi. Cependant si les données de la littérature sont plutôt en faveur d'un rôle suppresseur de tumeur, d'autres les envisagent plutôt comme des protéines oncogéniques. C'est pourquoi le rôle des 3-OSTs en situation pathologique dans le contexte du cancer reste aujourd'hui à élucider et offre de grandes possibilités d'investigation thérapeutiques et cliniques.

Nous allons maintenant nous intéresser, dans une dernière partie, à l'implication des HS 3-O-sulfatés dans le cancer du sein sur laquelle s'est focalisée une partie de mes travaux de thèse.

IV. LE CANCER DU SEIN : FOCUS SUR LE SOUS-TYPE HER2+ ET IMPLICATION DES HÉPARANES SULFATES DANS CE CONTEXTE

A. Généralités sur le cancer du sein

1. Incidence, diagnostic et traitements

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde et représente 16% de l'ensemble des cancers féminins (Organisation Mondiale de la Santé (OMS), *Global Burden of Disease*, 2004). En France, le cancer du sein représente près d'un tiers des nouveaux cas de cancer diagnostiqués chez la femme en 2012 et environ une femme sur dix sera confrontée à un cancer du sein au cours de sa vie (Le ligue contre le cancer, https://www.ligue-cancer.net/sites/default/files/docs/observatoire_societal_des_cancers_rapport_2014.pdf).

D'après les données de l'Institut National du Cancer, près de 54 000 nouveaux cas de cancers du sein ont été diagnostiqués en 2015 et près de 12 000 femmes en sont décédées cette même année faisant de ce cancer la première cause de mortalité féminine en France.

Lorsqu'une anomalie est révélée par une mammographie, plusieurs examens doivent être réalisés pour identifier les caractéristiques histologiques et moléculaires de la tumeur. C'est l'examen anatomopathologique des tissus prélevés au niveau de cette anomalie potentiellement tumorale qui établit le diagnostic de cancer du sein. La détermination du sous-type de cancer de sein est ensuite déterminée par des analyses immunohistochimiques et par FISH (*Fluorescent In Situ Hybridation*).

Les thérapies actuelles telles que la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie sont souvent complétées par l'hormonothérapie (traitement par des anti-œstrogènes comme le tamoxifène ou par des inhibiteurs d'aromatases, qui bloquent la biosynthèse des œstrogènes) et/ou par des thérapies ciblées en utilisant notamment l'Herceptin[®] (ou trastuzumab, un anticorps monoclonal humanisé anti-HER2 (*Human Epidermal Growth Factor Receptor-2*)). Cependant, ces traitements ciblés ne sont indiqués que dans certains sous-types de cancers, comme lors de la surexpression du récepteur HER2, cible de l'Herceptin[®]. De plus, des phénomènes de résistance à ces traitements ciblés peuvent apparaître, rendant l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques primordiale pour améliorer l'efficacité des traitements du cancer du sein.

2. Classification des cancers du sein

L'étude anatomopathologique montre qu'il existe différents types de cancers du sein et plusieurs classifications sont possibles :

- la **classification histologique**, établie selon l'OMS qui différencie les tumeurs épithéliales non infiltrantes dites *in situ*, qu'elles soient canalaire ou lobulaire, des tumeurs épithéliales infiltrantes pour lesquelles il y a formation de métastases.

- la **classification TNM** (T=taille de la tumeur primaire, N=atteinte éventuelle des ganglions lymphatiques, M=présence éventuelle de métastases) permettant un classement des cancers selon leur extension anatomique.

- la **classification moléculaire** basée sur l'existence de sous-types tumoraux en fonction de leur signature moléculaire : quatre sous-types de cancers de sein sont ainsi décrits.

a) Les quatre sous-types de cancers du sein

En 2011, au cours de la douzième Conférence Internationale du Cancer du Sein de St Gallen, une nouvelle classification des patientes atteintes de cancer du sein a été adoptée. Elle est basée sur l'identification de sous-types biologiques présentant des caractéristiques moléculaires distinctes et permettant potentiellement une orientation thérapeutique (Goldhirsch *et al.*, 2011). Quatre sous-types de cancers du sein ont été définis selon l'expression du récepteur aux œstrogènes (ER), du récepteur à la progestérone (PR) et du récepteur HER2 (voir Tableau 9).

Tableau 9. Classification moléculaire des sous-types de cancers du sein

(Modifié d'après Goldhirsch *et al.*, 2011)

Sous-types de cancers du sein	Signature moléculaire
Luminal-A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻
Luminal-B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺
HER2+	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺
Triple Négatif (TN)	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻

Le terme *luminal* se rapporte à l'origine cellulaire du sous-type de cancer. Les cellules lumineuses sont des cellules de l'épithélium mammaire qui bordent la lumière des canaux et des lobules et sont responsables de la production de lait.

b) Le sous-type HER2+

Le sous-type HER2+ est observé dans 15 à 20% des cas de cancers du sein. Il est caractérisé par une surexpression du récepteur HER2, conférant un caractère très agressif à ces tumeurs, et par conséquent un mauvais pronostic pour la patiente (Figueroa-Magalhães *et al.*, 2014).

La surexpression du récepteur HER2 est liée majoritairement à une amplification génique (Baselga et Swain, 2009). Cependant, d'autres mécanismes peuvent être responsables de l'augmentation du niveau d'expression de HER2. Par exemple, une étude a montré que la protéine FOXP3 régule négativement l'expression du récepteur HER2. Dans des tissus de cancers du sein, la faible expression de FOXP3 est associée à une surexpression de HER2 alors que son extinction par un siRNA dans des cellules mammaires saines HMEC (*Human Mammary Epithelial Cells*) est corrélée à une augmentation de l'expression de HER2. Une surexpression de FOXP3 dans les cellules de cancer de sein SKBR3, qui ont la particularité de surexprimer le récepteur HER2, a pour conséquence une diminution de la croissance cellulaire. Le gène FOXP3 a ainsi été considéré comme un gène suppresseur de tumeur permettant le maintien d'une faible expression de HER2, et donc un moyen de limiter la prolifération des cellules tumorales (Zuo *et al.*, 2007).

La surexpression du récepteur HER2 a également été détectée dans le cancer gastrique (Chen *et al.*, 2016), le cancer des glandes salivaires (Cornolti *et al.*, 2007), le cancer colorectal (Richman *et al.*, 2016), le cancer du poumon non à petites cellules (Shen *et al.*, 2015) et le cancer de l'ovaire (Stewart *et al.*, 2015). La mise en évidence de la surexpression de HER2 dans le cancer du sein a conduit au développement du premier anticorps monoclonal humanisé ciblant ce récepteur, le trastuzumab (Herceptin®, Roche) mis sur le marché en 1998 (Slamon *et al.*, 2001) et reconnaissant spécifiquement la partie extracellulaire du récepteur HER2 pour en bloquer l'activation.

B. Les récepteurs HERs et leurs ligands

1. Description des récepteurs HERs

Les récepteurs du facteur de croissance épidermique humain ou HERs (*Human Epidermal growth factor Receptors*) font partie des premiers oncogènes identifiés. Ils

appartiennent à la superfamille des récepteurs enzymes portant une activité tyrosine kinase. La famille des récepteurs HERs comporte quatre membres appelés HER1 (ou EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) / ErbB1), HER2 (ou ErbB2 / Neu), HER3 (ou ErbB3) et HER4 (ou ErbB4) (Hervent et De Keulenaer, 2012).

a) Structure des récepteurs HERs

Chaque récepteur est composé de trois régions (Figure 24) : (i) une région extracellulaire avec quatre domaines numérotés I, II, III et IV. Les domaines I et III sont les domaines de liaison des ligands et les domaines II et IV assurent la dimérisation des récepteurs (voir partie IV-B-2), (ii) une région transmembranaire hydrophobe constituée de 19 à 25 acides aminés et (iii) une région intracellulaire qui porte l'activité tyrosine kinase (Baselga et Swain, 2009, Roskoski, 2014).

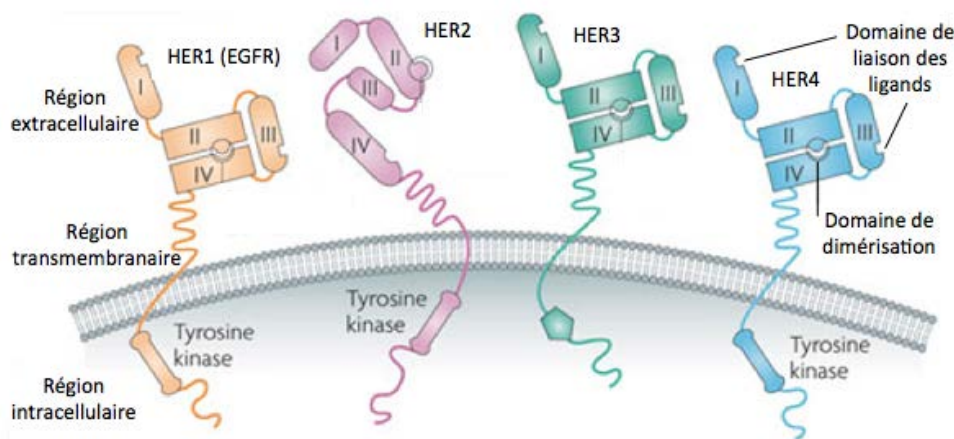


Figure 24. Structure des récepteurs HERs

La famille des récepteurs HERs est composée de quatre membres : HER1, HER2, HER3 et HER4. Ils sont organisés en trois régions : une région extracellulaire, une région transmembranaire et une région intracellulaire porteuse de l'activité tyrosine kinase (à l'exception du récepteur HER3), permettant la transphosphorylation des récepteurs et l'activation de cascades de signalisation intracellulaires. La région extracellulaire comporte quatre domaines (notés de I à IV) : les domaines I et III sont les domaines de fixation des ligands (à l'exception du récepteur HER2 qui n'a pas de ligand connu à ce jour), et les domaines II et IV assurent la dimérisation des récepteurs suite à la fixation du ligand. Modifié d'après Baselga et Swain, 2009.

b) Rôles des récepteurs HERs

A l'état physiologique, les récepteurs HERs sont exprimés dans les tissus d'origine épithéliale, mésenchymateuse et neurale (Oliyoye *et al.*, 2000). Ils jouent un rôle crucial dans la transmission de signaux intracellulaires, régulant le développement, la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et l'apoptose (Holbro et Hynes, 2004).

L'expression des récepteurs HERs peut être dérégulée dans des situations pathologiques, notamment celle de HER1 et de HER2. Cette dérégulation peut être impliquée dans le développement et la propagation de plusieurs types de cancers. La surexpression de HER1 (EGFR) est observée dans les cancers du sein, de la tête et du cou et du poumon, et très fréquemment dans les gliomes. La surexpression de HER2 est quant à elle majoritairement observée dans les cancers du sein et de l'ovaire où elle est corrélée à un mauvais pronostic et souvent associée à des phénomènes de chimiorésistance (Marmor *et al.*, 2004). La surexpression de HER2 semble être le mécanisme principal par lequel ce récepteur promeut l'oncogenèse dans ces types de cancers de par son hyperactivation conduisant notamment à une prolifération cellulaire incontrôlée (Sergina et Moasser, 2007).

L'hyperactivation des récepteurs HERs se produit par l'intermédiaire d'une boucle de sécrétion autocrine impliquant une surproduction de ligands et/ou de récepteurs par les cellules tumorales elles-mêmes ou par une sécrétion juxtacrine dépendante de la production de ligands des récepteurs HERs par les cellules adjacentes du micro-environnement tumoral (Salomon *et al.*, 1995). De plus, l'activité aberrante des récepteurs HERs peut résulter de leur activation constitutive (Lonardo *et al.*, 1990) pouvant être expliqué par l'action de métalloprotéases (voir partie IV-C-III). Pour ces raisons, les récepteurs HERs constituent des cibles thérapeutiques de choix pour lutter contre la tumorigenèse.

2. Mécanisme d'activation des récepteurs HERs

La dimérisation des récepteurs est une condition essentielle à leur fonction biologique et à leur rôle dans l'activation de la signalisation cellulaire. Elle est consécutive à la fixation d'un ligand qui provoque un changement de conformation permettant la stabilisation du domaine extracellulaire. Ce dernier se trouve ainsi dans une conformation favorable à sa dimérisation avec un second monomère. La dimérisation peut se produire entre deux récepteurs HERs différents (hétérodimérisation) ou entre deux récepteurs HER identiques (homodimérisation) (Figure 25). Ce système d'homo- et d'hétérodimérisation confère aux récepteurs HER un haut degré de complexité fonctionnelle de part la multiplicité des voies de signalisation activées. Il est important de préciser que les récepteurs HER1, 3 et 4 existent sous formes de monomères inactifs et adoptent dans ce cas une conformation dite fermée due à une interaction intramoléculaire des domaines II et IV de façon à empêcher la dimérisation du récepteur en l'absence de ligand (Sergina et Moasser, 2007). Le récepteur HER2, n'ayant pas de ligand connu, existe toujours sous une conformation dite ouverte et est disponible en permanence pour la dimérisation avec un autre partenaire (Burgess *et al.*, 2003).

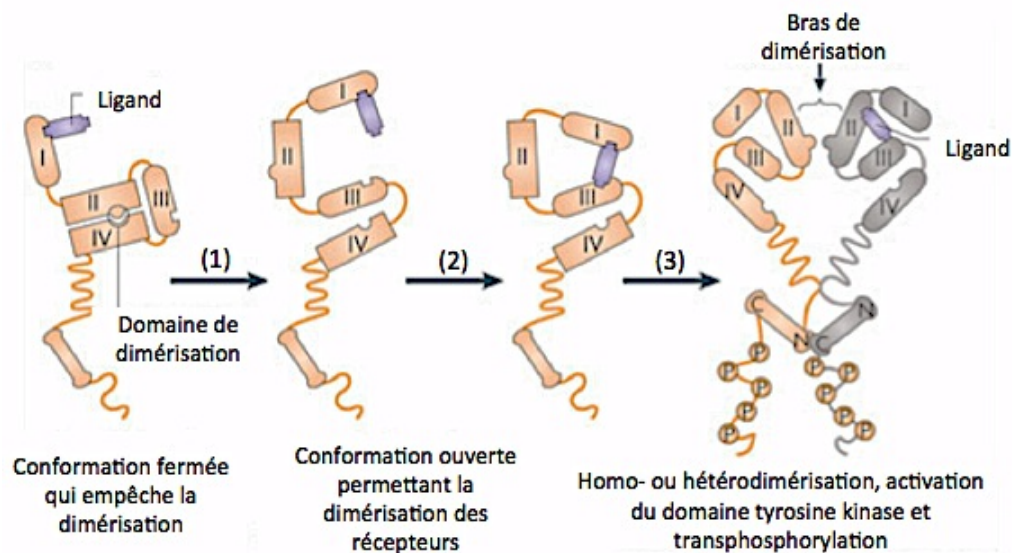


Figure 25. Mécanisme d'activation des récepteurs HERs

En l'absence de ligand, les récepteurs HER1,3 et 4 existent sous forme monomériques dans une configuration fermée par interaction entre les domaines II et IV empêchant la dimérisation. (1) La fixation d'un ligand au niveau du domaine I induit un changement de conformation du récepteur qui passe alors en conformation ouverte. (2) Les domaines de liaison I et III interagissent permettant l'exposition du domaine II de dimérisation. (3) Par l'intermédiaire de leur domaine de dimérisation, deux récepteurs s'homo- ou s'hétérodimérisent. Il en résulte l'activation du domaine tyrosine kinase par transphosphorylation des résidus tyrosine du domaine catalytique du récepteur. Modifié d'après Baselga et Swain, 2009.

La dimérisation stimule l'activité tyrosine kinase intrinsèque des récepteurs et déclenche une transphosphorylation des résidus tyrosine spécifiques (et conservés) du domaine cytoplasmique (Figure 25). Les récepteurs phosphorylés sont alors activés et peuvent activer à leur tour par phosphorylation des protéines effectrices à l'origine des cascades de signalisation intracellulaire. Les effets observés sur l'expression des gènes sont associés à la phosphorylation terminale de facteurs de transcription, qui peuvent migrer dans le noyau (sous leur forme active phosphorylée) et interagir avec des éléments de réponses spécifiques au niveau de l'ADN par exemple, déterminant ainsi la réponse biologique à l'activation du récepteur (Olayioye *et al.*, 2000).

3. Ligands des récepteurs HERs

La transduction du signal pour activer les voies de signalisation intracellulaire est initiée par la fixation d'un ligand extracellulaire induisant l'homo- ou l'hétérodimérisation des récepteurs HERs et leur transphosphorylation grâce à l'activité tyrosine kinase du domaine cytoplasmique du récepteur (voir paragraphe 2.). La diversité des ligands capables d'activer

les récepteurs HERs a augmenté au fil des recherches. Sont décrits à l'heure actuelle, sept ligands pour HER1 (EGF, EPG, TGF- α , AR, HB-EGF, BTC et EPR), deux pour HER3 (NRG1 et NRG2) et sept pour HER4 (HB-EGF, BTC, EPR, NRG1, NRG2, NRG3 et NRG4). Aucun ligand de HER2 n'est connu à ce jour (Roskoski, 2014, Figure 26). La fixation de l'amphiréguline et de l'HB-EBF à leur récepteur HER1 nécessite les HSPGs membranaires comme co-récepteurs (Piepkorn *et al.*, 1998).

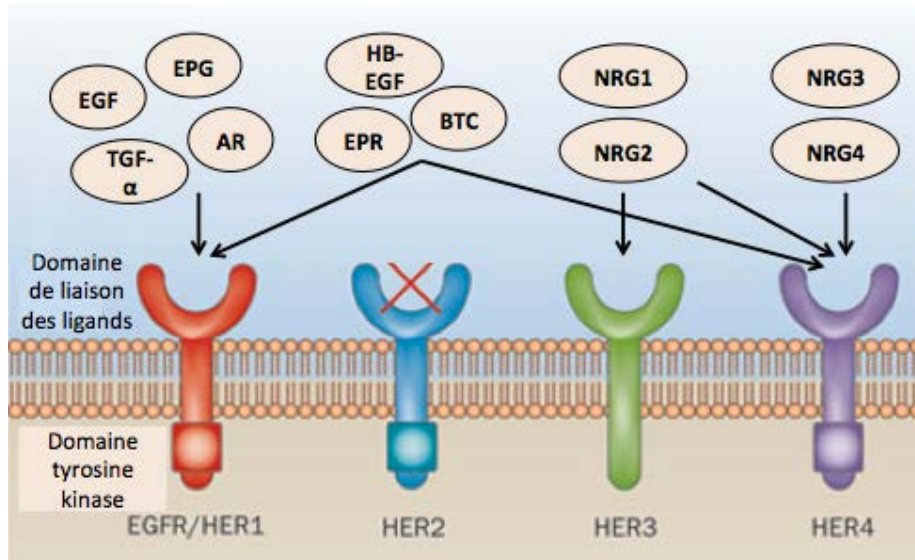


Figure 26. Les principaux ligands des récepteurs HERs

L'activation des récepteurs HERs est dépendante de la fixation d'un ligand au niveau de leur domaine extracellulaire, à l'exception de HER2 qui n'a pas de ligand connu. Abréviations: AR, amphiréguline; BTC, bétacelluline; EPG, épigène; EPR, épiréguline; HB-EGF, *heparin-binding epidermal growth factor*; NRG, neuréguline; TGF- α , *transforming growth factor*. Modifié d'après Arteaga *et al.*, 2011.

L'ensemble des ligands de la famille des récepteurs HERs sont synthétisés sous forme de précurseurs (ou pro-ligands) ancrés dans la membrane (Gullick, 2001). Ces pro-ligands sont des protéines transmembranaires présentant une topologie de type I et organisées en plusieurs régions : (i) une région extracellulaire de 130 acides aminés en moyenne, (ii) un domaine transmembranaire de 20 à 30 acides aminés, (iii) une queue cytoplasmique de 30 acides aminés environ (Harris *et al.*, 2003). Leur activation est consécutive au clivage de leur partie extracellulaire par les métalloprotéases de la famille des ADAMs (*a disintegrin and metalloproteases*) permettant leur libération sous formes de ligands solubles. Parmi les nombreux membres de la famille des ADAMs, ce sont principalement les protéases ADAM10 et ADAM17 qui sont à l'origine de la production de ligands fonctionnels pour les récepteurs

HER (Blobel, 2005). Ce clivage protéolytique est considéré comme un mécanisme de régulation post-traductionnelle pour le contrôle de l'activité des ligands des récepteurs HERs.

Ces ligands agissent généralement à proximité de leurs sites de libération et ont différents modes d'action : (i) une action autocrine en se fixant sur les récepteurs portés par la cellule à partir de laquelle ils ont été libérés, (ii) une action juxtacrine en se fixant sur les récepteurs d'une cellule adjacente ou (iii) une action paracrine, sur une cellule située à proximité de leur site de libération (Roskoski, 2014, Figure 27).

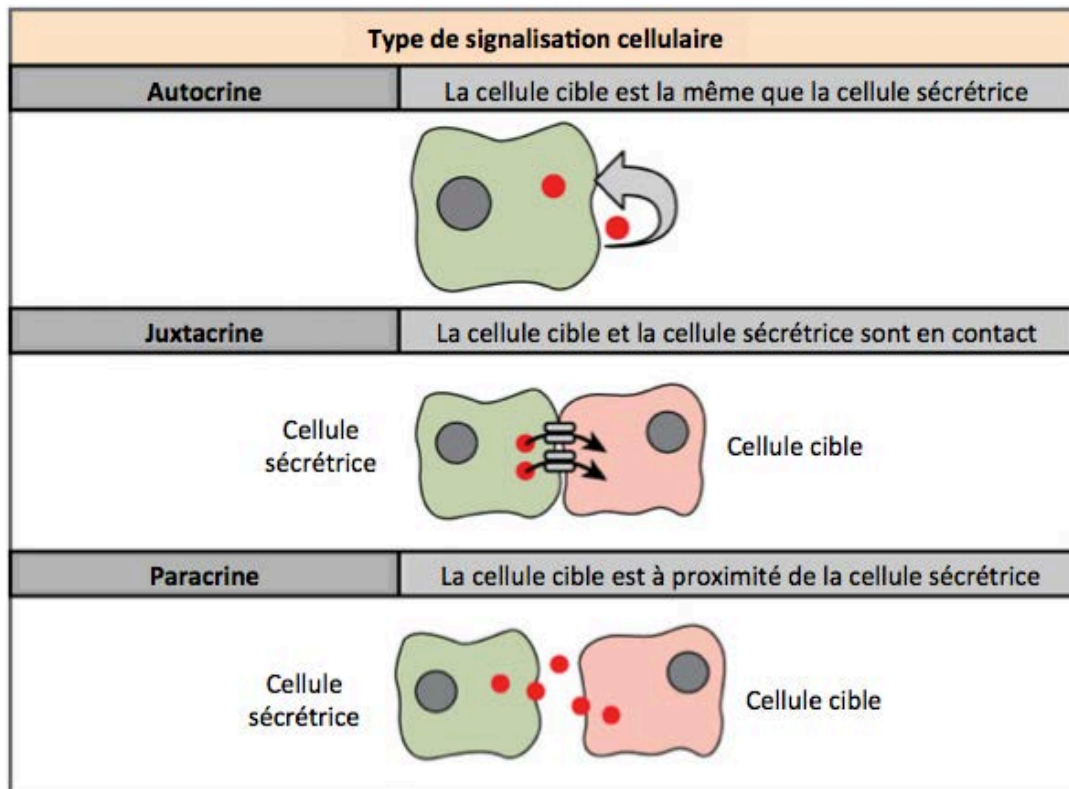


Figure 27. Les différents types de signalisation cellulaire

Les cellules communiquent entre elles par l'intermédiaire de médiateurs moléculaires produits par une cellule dite sécrétrice qui va agir sur une cellule. Différents types de signalisation cellulaire sont possible : une action autocrine où la cellule cible est identique à la cellule sécrétrice ; une action juxtacrine lorsque la cellule sécrétrice et la cellule cible sont en contact physique, le médiateur est alors transmis par les jonctions cellulaires ; une action paracrine où la cellule cible est située à proximité de la cellule sécrétrice mais elles ne sont pas en contact. Modifié d'après : <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/cell-communication-9/signaling-molecules-and-cellular-receptors-83/forms-of-signaling-380-11606/>.

4. Le récepteur HER2 : activation et signalisation

a) Activation du récepteur HER2

A la différence des autres récepteurs de la famille HERs, HER2 n'a pas de ligand connu, et de ce fait son activation nécessite une hétérodimérisation avec un autre récepteur

HER. De part sa conformation dite ouverte, le récepteur HER2 est continuellement disponible pour la dimérisation. Il est d'ailleurs le partenaire préférentiel d'hétérodimérisation de tous les autres membres de la famille des récepteurs HERs (Graus-Porta *et al.*, 1997). La formation d'hétérodimères HER2-HER1 ou HER2-HER3 est responsable d'une intense activation des voies de signalisation intracellulaires, notamment les voies des MAP-Kinase et de la PI3-Kinase impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire (Pinkas-Kramarski *et al.*, 1996).

Cependant une homodimérisation de HER2 indépendante de la présence de ligand est possible. En effet, une mutation ponctuelle (V664E) dans le domaine transmembranaire de HER2 a été décrite. Elle induit la formation de liaisons hydrogènes entre deux récepteurs HER2 conduisant à une dimérisation et une activation constitutive (Smith *et al.*, 1996). Cette mutation augmente la dimérisation du récepteur HER2 (Bargmann et Weinberg, 1988), son activité tyrosine kinase (Stern *et al.*, 1988) et son aggrégation mimant la conformation induite par la fixation d'un ligand (Weiner *et al.*, 1989) suggérant un mécanisme en faveur de l'oncogénèse. Deux mécanismes d'activation de HER2 sont donc possibles : une homodimérisation indépendante de la présence de ligand ou une hétérodimérisation avec les autres HERs induite par un ligand de HER1, HER3 ou HER4.

b) La signalisation de HER2

La surexpression de HER2 en cas de cancer du sein augmente considérablement le nombre de ces récepteurs à la surface des cellules tumorales par rapport à des cellules saines et facilite la formation d'hétérodimères ainsi que la formation spontanée d'homodimères de HER2 (voir partie IV-B-4-a). Une hyperactivation de la signalisation cellulaire induite par HER2 est observée, favorisant, entre autres, la prolifération cellulaire et donc le développement tumoral (Yarden et Sliwkowski, 2001). Les tyrosines du domaine intracellulaire phosphorylées constituent des sites de fixation pour des protéines effectrices qui vont pouvoir activer des voies de signalisation intracellulaire, comme par exemple les voies PI3K/AKT et RAS/RAF/MAPK qui seront décrites plus loin. Ces cascades de signalisation contrôlent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la survie, la mobilité cellulaire et la formation de métastases ainsi que la production de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) impliqué dans la néo-angiogenèse (Hudis, 2007, voir Figure 28).

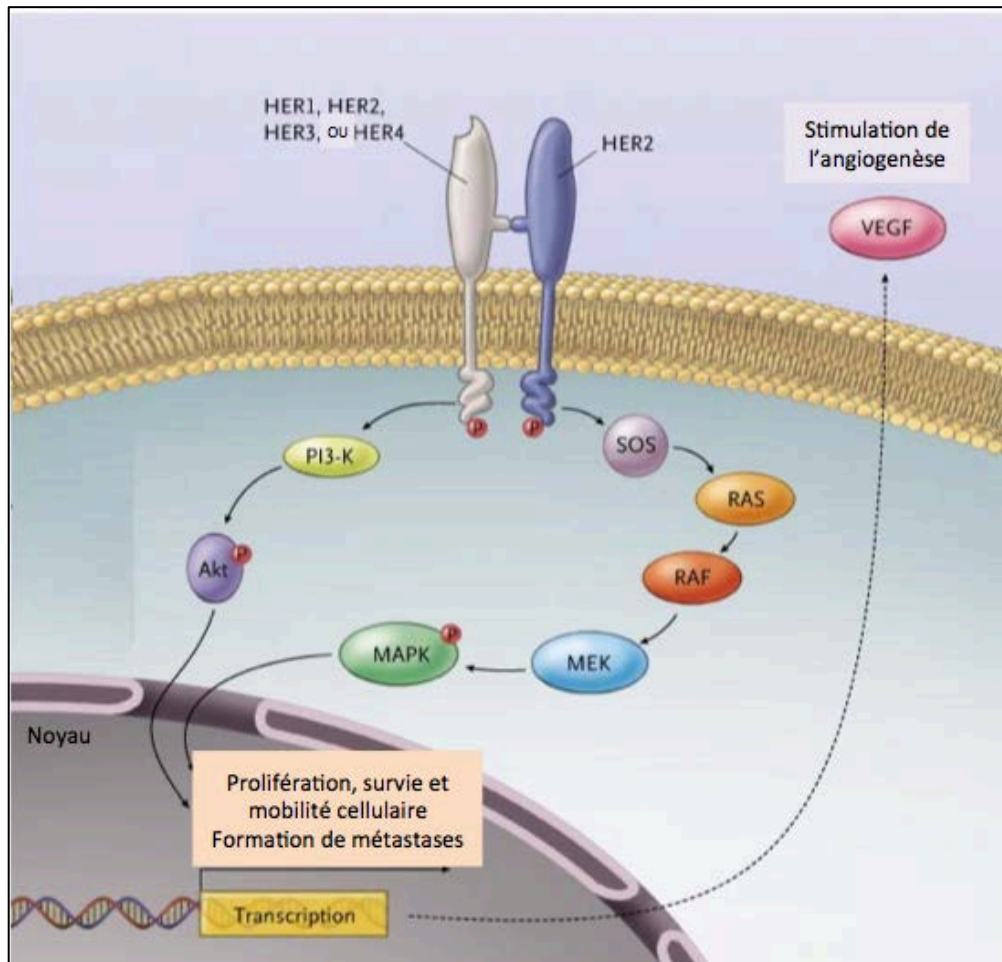


Figure 28. Les voies de signalisation associées à HER2

L'activation de HER2 induit la transphosphorylation du domaine tyrosine kinase intracellulaire permettant l'activation des voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT. Ces voies sont impliquées dans la régulation de la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération, la survie et la mobilité cellulaire ainsi que la formation de métastases. L'activation de ces voies stimule la production de VEGF qui est le facteur clé de la néo-angiogenèse. Tous ces processus concourent à la promotion du développement tumoral. Modifié d'après Hudis, 2007.

(1) La voie PI3K/AKT

La phosphorylation des résidus tyrosines du domaine intracellulaire du récepteur HER2 permet l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), responsable de la transformation des phosphoinositides en phosphatidylinositol-3-phosphate (PIP3). La PIP3K va à son tour phosphoryler AKT qui a la capacité à réguler l'activité d'un grand nombre de cibles moléculaires impliquées dans le contrôle de la survie cellulaire. En effet, la forme phosphorylée d'AKT peut activer le facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) qui induit la transcription de gènes cibles anti-apoptotiques tels que Bcl-2. D'autre part, AKT est capable de recruter la protéine mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) responsable de la synthèse de protéines pro-angiogéniques, telles que le VEGF, et de facteurs impliqués dans

la progression du cycle cellulaire, telles que la cycline D1 (Cheaib *et al.*, 2015). L'activation d'AKT, consécutive à celle du récepteur HER2, entraîne ainsi la mise en place de nombreux mécanismes de survie cellulaire en faveur de la progression du cancer du sein (Hervent et De Keulenaer, 2012).

(2) La voie RAS/RAF/MAPK

En parallèle, la phosphorylation des tyrosines intracellulaires de HER2 permet le recrutement du facteur d'échange de nucléotide guanine SOS (*Son Of Sevenless*), permettant l'activation successive des protéines RAS (*Rat Sarcoma*), RAF (*Receptor Activation Factor*) et MEK (*Mitogen Extracellular signal Kinase*). Les protéines RAS-RAF-MEK activées phosphorylent les enzymes MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) et ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*). La translocation nucléaire de la forme phosphorylée de ERK permet d'induire la transcription de gènes cibles tels que *Jun/Fos* et *Myc* impliqués dans la prolifération cellulaire et la progression du cycle cellulaire respectivement (Emde *et al.*, 2012).

c) Le trastuzumab : un anticorps anti-HER2

Le trastuzumab (Herceptin®) est un anticorps monoclonal humanisé (constitué d'une partie constante humaine et de domaines variables incluant des fragments d'origine murine) qui inhibe l'activation du récepteur HER2 en se fixant sur le domaine IV de la partie extracellulaire du récepteur (Figure 29). Le trastuzumab a été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1998 pour le traitement du cancer du sein métastatique avec surexpression de HER2 (Slamon *et al.*, 2001). Depuis 2006, son utilisation a été étendue au traitement du cancer du sein précoce en addition aux traitements standard (voir partie IV-A-1). Une étude regroupant cinq essais cliniques avec un total de 9748 patientes a montré que l'addition de trastuzumab à la chimiothérapie augmente la survie sans rechute, la survie globale des patientes et diminue le risque de récurrence locorégionale et à distance du foyer tumoral initial (Dahabreh *et al.*, 2008).

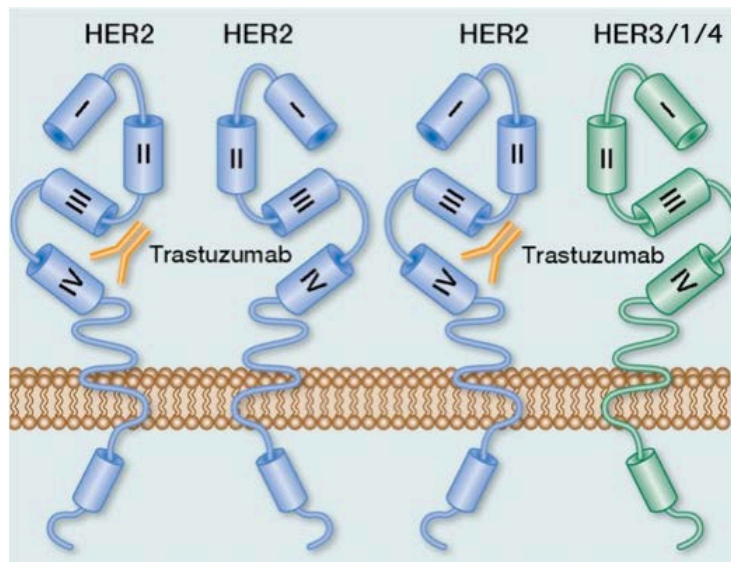


Figure 29. Représentation schématique de la fixation du trastuzumab sur le récepteur HER2

Le trastuzumab est un anticorps monoclonal qui reconnaît spécifiquement le domaine IV de la partie extracellulaire du récepteur HER2. Il empêche ainsi la formation d'homodimères de récepteurs HER2, ainsi que la formation d'hétérodimères HER2–HER3, HER2–HER1 et HER2–HER4 dépendante de ligands. Modifié d'après Metzger-Filho *et al.*, 2013.

Plusieurs mécanismes possibles par lesquels le trastuzumab diminue la signalisation cellulaire ont été décrits (Figure 30). Ces mécanismes comprennent (1) la capacité du trastuzumab à bloquer le clivage de la partie extracellulaire du récepteur HER2, responsable de l'apparition d'une forme tronquée de HER2 constitutivement active, déletée de ses 95 acides aminés N-terminaux (p95HER2) et (2) le blocage de son homodimérisation par encombrement stérique au niveau du domaine impliqué dans la dimérisation du récepteur. Ces deux processus permettent d'inhiber l'activation des récepteurs HER2 et des voies de signalisation intracellulaires associées.

D'autre part, (3) le trastuzumab permet le recrutement des cellules immunitaires effectrices qui reconnaissent la partie constante (Fc) du trastuzumab et mettent en place une réponse cellulaire cytotoxique conduisant à la lyse des cellules tumorales. (4) La fixation du trastuzumab favoriserait également l'endocytose du récepteur HER2 et sa dégradation. Tous ces mécanismes rendent le récepteur HER2 inactif et empêcheraient la progression tumorale. (Hudis, 2007).

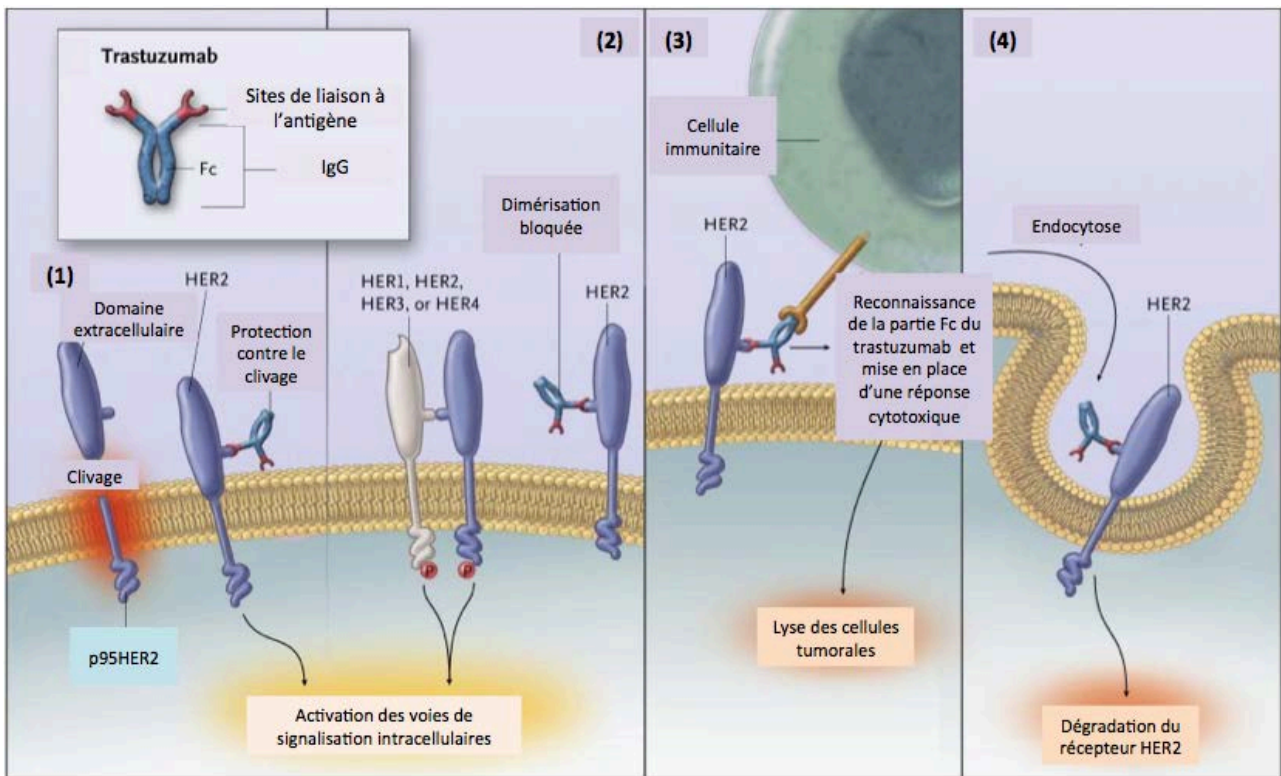


Figure 30. Les différents modes d'action du trastuzumab

Le trastuzumab comporte une partie variable possédant deux sites de fixation spécifiques sur le domaine IV de la partie extracellulaire du récepteur HER2 et une partie constante humaine conservée. La fixation du trastuzumab sur le récepteur HER2 empêche l'activation de la signalisation intracellulaire selon différents mécanismes : (1) il protège du clivage de la partie extracellulaire et ainsi de la formation de la forme tronquée du récepteur (p95HER2) constitutivement active ; (2) il empêche la dimérisation avec les autres membres de la famille des récepteurs HERs, (3) il active le recrutement de cellules immunitaires et de cellules cytotoxiques conduisant à la lyse des cellules tumorales, (4) il permet l'endocytose du récepteur HER2 inactivé. Modifié d'après Hudis, 2007.

C. Implication des héparanes sulfates dans le cancer du sein

Au cours des trente dernières années, des études se sont portées sur la compréhension de la biologie du cancer du sein et sur l'amélioration des traitements pour augmenter le taux de survie des patientes atteintes de ce type de cancer. Ces études se sont principalement focalisées sur les éléments génétiques impliqués dans la progression tumorale et le micro-environnement de la tumeur. Celui-ci est composé de plusieurs types cellulaires tels que les fibroblastes, les macrophages, les cellules épithéliales et les cellules tumorales qui sont entourées d'une MEC contenant des molécules de collagènes, des PGs, des métalloprotéases matricielles et des héparanases, le tout étant très irrigué par de nombreux vaisseaux sanguins (Gomes *et al.*, 2013). Ainsi au sein du micro-environnement tumoral, les HSPGs membranaires et matriciels tiennent une place centrale de part leur implication dans l'adhésion des cellules, l'assemblage de la MEC, le stockage et relargage de facteurs de

croissance, permettant de réguler le comportement cellulaire et la progression tumorale (Sarrazin *et al.*, 2011).

1. Les PGs à héparanes sulfates membranaires régulent la progression tumorale dans le cancer du sein

L'expression des HSPGs membranaires au niveau des cellules de cancer du sein peut être modifiée de façon importante (augmentée ou diminuée). Cette différence d'expression à la surface des cellules a des conséquences physiopathologiques majeures, en particulier sur la progression tumorale (Gomes *et al.*, 2013).

Le syndécan-1 a ainsi été décrit comme un agent pro-tumorigène au cours du développement du cancer du sein. En effet, un fort taux d'expression du syndécan-1 au sein des tumeurs de patientes a été détecté. Cette forte expression a été associée à un haut grade histologique, à une grande taille de tumeur, à un index mitotique élevé, à une surexpression de HER2 et à un statut ER et PR négatif. Autant de facteurs qui témoignent d'un phénotype tumoral agressif associé à un mauvais pronostic de survie chez les patientes (Barbareshi *et al.*, 2003).

D'autres HSPGs membranaires, les glypicans, présentent une grande variabilité d'expression associée à des activités opposées dans le développement du cancer du sein. Ainsi une surexpression du glypican-1 dans les tissus tumoraux mammaires de patientes en comparaison à des tissus mammaires sains a été décrite. La surexpression du glypican-1 a également été détectée dans les lignées cellulaires cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et MDA-MB-468. D'un point de vue moléculaire, un traitement des cellules tumorales par le PI-PLC (*Phosphatidylinositol-specific phospholipase C*) permettant de cliver spécifiquement l'ancre GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) par laquelle les glypicans sont accrochés à la membrane cellulaire, a permis de diminuer considérablement l'expression membranaires des glypicans et la prolifération des cellules induite par les facteurs de croissance HB-EGF et FGF-2. Ces données suggèrent que la surexpression du glypican-1 est essentielle pour induire une réponse mitogénique des cellules de cancer du sein aux facteurs de croissance et peut ainsi contribuer à la progression tumorale (Matsuda *et al.*, 2001). D'autre part, l'absence d'expression du glypican-3 inhibe la prolifération des cellules tumorales mammaires, suggérant que le glypican-3 agit plutôt comme un régulateur négatif du développement du cancer du sein (Xiang *et al.*, 2001).

En plus de la prolifération des cellules, les HSPGs sont capables de réguler d'autres

aspects de la progression tumorale mammaire. En effet, il a été montré que l'extinction de l'expression du syndécan-2 par un siRNA a permis de réduire les capacités d'invasion des cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et d'en augmenter les capacités d'adhésion. Le syndécan-2 serait ainsi un régulateur important de la progression du cancer du sein en contrôlant les propriétés invasives et l'adhérence cellulaire. D'autre part, une augmentation de l'expression du syndécan-2 a été observée dans les tissus tumoraux et sa présence a été détectée dans les ganglions lymphatiques suggérant que le syndécan-2 pourrait également être impliqué dans la migration et la formation de métastases (Lim *et al.*, 2015).

Toutes ces données montrent l'importance des HSPGs membranaires dans le développement du cancer du sein et soulignent la nécessité de poursuivre les études moléculaires pour explorer et comprendre les propriétés fonctionnelles de ces polysaccharides en tant qu'agents pro- ou antitumoraux.

2. Les héparanes sulfates solubles régulent la progression tumorale dans le cancer du sein : rôle des héparanases

Dans ce contexte, le rôle des héparanases, endoglycosidases qui digèrent spécifiquement les HS, est central pour libérer des formes solubles d'HSPGs dans les MEC du micro-environnement tumoral à partir des HSPGs membranaires et ainsi, réguler le développement du cancer du sein. Les héparanases exercent leur activité enzymatique en clivant les liaisons osidiques β 1-4 entre l'acide glucuronique et la glucosamine de l'unité disaccharidique répétitive des HS. Ce clivage a pour conséquences un remodelage de la MEC et la régulation de la libération de nombreuses HBP, tels que les facteurs de croissance et les cytokines impliqués dans les phénomènes d'inflammation et d'invasion tumorale. Un rôle pro-métastatique et pro-angiogénique de cette enzyme a été largement démontré dans de nombreuses tumeurs humaines notamment dans les cancers du pancréas, du sein et colorectaux (Arvatz *et al.*, 2016). Des niveaux élevés d'héparanase ont par ailleurs été détectés dans les ganglions lymphatiques et les métastases chez les patients atteints de ces types de cancers. Une augmentation de la densité des micro-vaisseaux sanguins a également été observée dans la même situation. Ces facteurs sont corrélés à une survie réduite des patients dans la mesure où ces différents paramètres favorisent la progression de la tumeur (Masola *et al.*, 2014a). Les mêmes auteurs ont montré de la même façon que la surexpression de l'héparanase dans les cellules glomérulaires et tubulaires rénales de patients atteints de diabète est associée à un relargage du FGF-2 qui agit alors comme un stimulus pro-fibrotique en induisant une augmentation de l'expression du TGF- β en association avec le mécanisme de

TEM des cellules tubulaires conduisant à la fibrose rénale. L'héparanase apparaît ainsi une molécule clé de la libération des HBP dans un contexte pathologique (Masola *et al.*, 2014b).

Des données ont rapporté que l'héparanase favorise le clivage du syndécan-1 exprimé à la surface des cellules de cancer de sein. La forme soluble du syndécan-1, libérée dans le micro-environnement tumoral, va pouvoir contrôler la croissance tumorale, la néo-angiogenèse et la formation de métastases, principalement en modulant l'activation de la signalisation induite par le relargage des facteurs de croissance, en particulier le FGF-2 et le VEGF, au voisinage de la tumeur (Yang *et al.*, 2007).

a) Le rôle pro-métastatique de l'héparanase dans le cancer du sein

En 2010, les travaux de Zhang ont montré que les sites métastatiques formés dans le cerveau à partir des cellules de cancer du sein présentent des niveaux élevés d'héparanase. Pour expliquer ce phénomène, il a été montré que les cellules métastatiques répondent à la stimulation à l'EGF, induisant une phosphorylation accrue des récepteurs HER1 (EGFR) et HER2. En réponse à cette activation des récepteurs HER1 et HER2 par l'EGF, une augmentation de l'expression de l'héparanase et sa translocation nucléaire dans ces cellules métastatiques a été observée. Ce résultat a été confirmé par l'utilisation de petits ARN interférants inhibant spécifiquement l'expression de HER1 et HER2. Dans ce cas, la translocation nucléaire de l'héparanase n'a pas lieu. Ceci montre que l'EGF, qui permet l'activation de HER1/HER2, est responsable de ce phénomène. Une corrélation positive entre la présence d'héparanase nucléaire et l'activité de la topoisomérase I, responsable de la réplication de l'ADN, a été mise en évidence. Par conséquent, il semble que l'héparanase nucléaire augmente la prolifération des cellules métastatiques cérébrales issues de cancer du sein. De façon intéressante, l'héparanase nucléaire est exprimée dans les cellules métastatiques qui surexpriment HER2. Ces données suggèrent que l'héparanase a une action pro-métastatique dans la propagation du cancer du sein et constitue une cible thérapeutique potentielle de la signalisation de HER2 (Zhang *et al.*, 2010).

b) Le rôle pro-angiogénique de l'héparanase dans le cancer du sein

L'angiogenèse est un processus physiologique permettant la production de nouveaux vaisseaux sanguins. Elle est indispensable à tout tissu en cours de développement, y compris le tissu tumoral. Elle représente ainsi une étape cruciale dans la progression du cancer dans un certain nombre de types de tumeurs, notamment dans le cancer du sein (Gomes *et al.*, 2013).

Plusieurs études ont montré l'implication des héparanases dans l'activation de l'angiogénèse dans différents types de cancers, mais le mécanisme moléculaire sous-jacent n'est pas encore clairement élucidé. Il a été proposé que le clivage des chaînes de HS par l'héparanase induisait une réponse angiogénique par le relargage des facteurs de croissance pro-angiogéniques (tels que le VEGF et le FGF-2) qui peuvent alors se lier aux récepteurs présents sur les cellules endothéliales et promouvoir l'invasion tumorale (Edovitsky *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, une surexpression de l'héparanase dans la lignée cellulaire cancéreuse mammaire MDA-MB-453 a été décrite, en association avec une augmentation du taux d'expression des ARNm du VEGF et de la protéine correspondante. De façon intéressante, le milieu de culture issu des cellules de cancer de sein surexprimant l'héparanase (milieu conditionné) permet d'augmenter la prolifération des cellules endothéliales HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), suggérant l'implication d'un facteur soluble qui serait relargué suite au clivage des HS par l'héparanase dans cette réponse. Afin d'identifier les facteurs présents dans le milieu conditionné responsables de l'augmentation de la prolifération cellulaire, la forme soluble du récepteur au VEGF a été ajoutée dans le milieu de culture des cellules afin de piéger le facteur de croissance. Dans ce cas, la prolifération cellulaire est inhibée, confirmant l'implication du VEGF dans la prolifération des cellules endothéliales.

Ces résultats suggèrent que l'héparanase permet d'augmenter le niveau d'expression du VEGF dans l'environnement extracellulaire des cellules cancéreuses pour assurer la vascularisation de la tumeur. La libération du VEGF dans le micro-environnement tumoral par l'héparanase renforce l'hypothèse que le clivage des chaînes de HS permet le relargage de facteurs de croissance pour stimuler la néo-angiogénèse et la progression tumorale (Zetser *et al.*, 2006).

L'héparanase est donc capable de réguler l'angiogénèse, la formation de métastase et la croissance tumorale ce qui contribue à un comportement agressif des cellules tumorales mammaires et a un mauvais pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein (Maxhimer *et al.*, 2005). Ainsi, l'héparanase peut être considérée comme une cible potentielle dans le traitement du cancer et potentiellement une cible de choix pour empêcher la progression du cancer du sein (Gomes *et al.*, 2013).

3. Rôle des HS dans l'activation de HER2 : un lien avec la voie de signalisation du FGF-7 ?

Comme nous l'avons vu précédemment, le rôle majeur des HSPGs dans le développement tumoral vient de leur capacité d'interaction avec de nombreux ligands, principalement les facteurs de croissance, pour réguler différents processus cellulaires physiopathologiques tels que la prolifération, l'angiogénèse et la formation de métastases.

Dans le cancer du sein, les HSPGs jouent un rôle dans la fixation et le relargage des FGFs, en particulier du FGF-2, pour promouvoir la cancérogenèse (Maeda *et al.*, 2006). Une étude réalisée sur des coupes histologiques de tissus mammaires a montré que la fixation du FGF-2 aux HS membranaires est plus forte dans les cellules cancéreuses mammaires que dans les cellules épithéliales saines. De plus, il a été décrit que la capacité de formation du complexe HS / FGF-2 / FGFR1 est plus importante dans les cellules cancéreuses mammaires (Mundhenke *et al.*, 2002). Pour expliquer ce phénomène, une étude avait mis en évidence une augmentation de la 6-*O*-sulfatation des chaînes de HS membranaires dans des lignées cellulaires d'adénocarcinome mammaire en supposant que la sulfatation pouvait augmenter la capacité d'interaction des HS avec le FGF-2 et/ou son récepteur (Rahmoune *et al.*, 1996). Des études complémentaires ont permis de mettre en évidence le rôle clé des motifs sulfatés des chaînes de HS dans la fixation et l'activité mitogénique du FGF-2, à savoir les *N*- et 2-*O* sulfatations puis la 6-*O*-sulfatation respectivement (Turnbull *et al.*, 1992; Pye *et al.*, 1998). Le groupement 6-*O*-sulfate des résidus glucosamine est considéré comme la caractéristique structurale clé des HS dans leur capacité de fixation au FGF-2 et dans l'induction de la prolifération cellulaire en réponse à ce facteur de croissance.

Dans le contexte de l'identification des motifs sulfatés impliqués dans la fixation des FGFs aux HS, les travaux de Ye *et al.* (2001) ont permis de mettre en évidence l'importance de la 3-*O*-sulfatation des HS membranaires dans la fixation du FGF-7 à son récepteur. De façon très intéressante, une étude a fait le lien entre (i) la fixation du FGF-7 à son récepteur FGFR2-IIIb en utilisant les HS comme co-récepteur, pour former un complexe ternaire FGF-7/FGFR2-IIIb/HS biologiquement actif et (ii) l'activation du récepteur HER2, qui est responsable du caractère agressif du sous type de cancer de sein HER2+ (Wei *et al.*, 2015, Figure 31). Cette étude a montré que la surexpression de FGFR2 est associée à une augmentation de la phosphorylation de HER2, témoin de son activation. L'activation de HER2 est d'autant plus forte lorsque les cellules sont stimulées par le FGF-7. En résumé, la stimulation des cellules de cancer du sein par le FGF-7 induit une augmentation de la phosphorylation de son récepteur FGFR2-IIIb, une augmentation de la phosphorylation de

HER2 et induit la phosphorylation (et donc l'activation) des protéines impliquées dans la signalisation de HER2, puisqu'une augmentation des formes phosphorylées de ERK et AKT a été également observée dans ces conditions. D'autre part, *in vivo*, les souris xénogreffées avec des cellules de cancer de sein surexprimant HER2 et FGFR2, présentent des tumeurs de plus grande taille que les souris xénogreffées avec des cellules surexprimant uniquement HER2. Ces données montrent que la formation du complexe HS / FGF-7 / FGFR2-IIIb dans les cellules de cancer du sein est capable de moduler l'activation de HER2, qui induit à son tour l'activation de sa signalisation intracellulaire et favorise ainsi la progression tumorale.

Parallèlement à l'augmentation de la phosphorylation de HER2 suite à la stimulation au FGF-7, l'expression de la métalloprotéase ADAM10 est augmentée. L'utilisation du batimastat, un inhibiteur spécifique d'ADAM10, empêche la phosphorylation de HER2, mais n'a pas d'effet sur la phosphorylation du FGFR2. Ce résultat permet de mettre en évidence une implication d'ADAM10 en aval de FGFR2 et en amont de HER2, et surtout témoigne d'un rôle indirect du FGF-7 sur l'activation de HER2 (Wei *et al.*, 2015).

Des travaux de Liu *et al.* (2006) avaient permis d'identifier la métalloprotéase ADAM10 comme l'acteur principal du clivage de la partie extracellulaire de HER2 dans les cellules de cancer de sein surexprimant HER2. De façon intéressante, les auteurs ont également observé l'augmentation de l'expression d'une forme tronquée de HER2, appelée p95HER2, délétée d'une partie de son domaine extracellulaire, la rendant insensible au trastuzumab. Associée à l'augmentation de l'expression de p95HER2, les auteurs ont mis en évidence une augmentation très rapide des niveaux d'expression des formes phosphorylées de ERK (pERK) et d'AKT (pAKT) suite à la stimulation par le FGF-7. Ceci montre que la présence de la forme tronquée p95HER2 stimule plus rapidement la signalisation intracellulaire de HER2 que sa forme phosphorylée non clivée et donc suggère un risque de propagation tumorale plus rapide. Ainsi ADAM10 semble être un acteur clé dans la connexion entre les voies de signalisation du FGFR2 et de HER2 dans un contexte tumoral. Il est important de préciser que le court domaine extracellulaire de HER2 restant après le clivage par ADAM10, contient cinq résidus cystéine, capables d'établir des ponts disulfures intermoléculaires, permettant la formation d'homodimères de p95HER2 constitutivement actifs. Dans cette configuration, le trastuzumab ne pouvant pas se fixer à la forme tronquée de HER2, il apparaît des phénomènes de résistance au traitement chez les patientes atteintes de cancer du sein de sous type HER2+. Cette activation constitutive du récepteur conduit à une hyperactivité intracellulaire, se traduisant par une stimulation de la signalisation intracellulaire ayant pour conséquence principale la progression du cancer du sein. C'est

pourquoi l'expression de la forme tronquée du récepteur HER2, p95HER2, est corrélée à un mauvais pronostic chez les patientes atteinte d'un cancer du sein de sous type HER2+ (Arribas *et al.*, 2011).

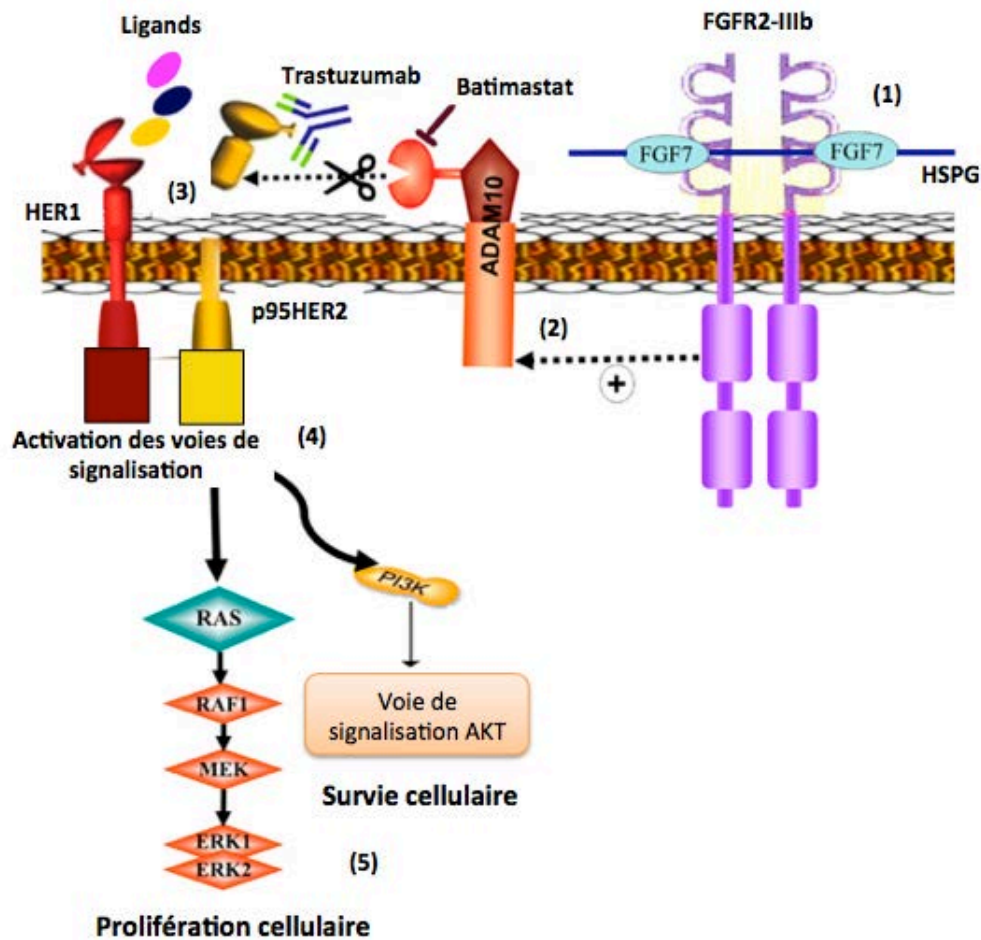


Figure 31. Modèle d'activation de HER2 médiée par le complexe HS / FGF-7 / FGFR2-IIIb

(1) Les HSPGs présents à la surface des cellules tumorales mammaires permettent la formation d'un complexe ternaire HS / FGF-7 / FGFR2-IIIb biologiquement actif. (2) La production d'ADAM10 est augmentée en réponse à la signalisation cellulaire induite par le FGFR2. (3) La métalloprotéase favorise le clivage de la partie extracellulaire du récepteur HER2 pour produire une forme tronquée p95HER2 insensible au trastuzumab et constitutivement active. Cette action peut être empêchée par l'utilisation de batimastat, un inhibiteur spécifique d'ADAM10. (4) La forme tronquée p95HER2 est capable d'homodimérisation, même en l'absence de ligand, et conduit à une hyperactivation des voies de signalisation associée à HER2, comme les voies RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT. (5) L'activation de ces voies de signalisation entraîne une prolifération et une survie cellulaire accrue des cellules tumorales et renforce le caractère agressif de la tumeur. Modifié d'après Wei *et al.*, 2015

Pour expliquer les mécanismes moléculaires impliqués et surtout quel peuvent être les acteurs biologiques faisant le lien entre les voies de signalisation du FGFR2 et de HER2, une étude s'est intéressée à la migration des kératinocytes en réponse à leur stimulation par le FGF-7 (Maretzky *et al.*, 2011). Un test de blessure (*wound healing assay*) a été réalisé dans

différentes conditions de traitements afin d'évaluer les capacités de migration des kératynocytes en réponse au facteur de croissance. Il a été montré que la stimulation des kératynocytes par le FGF-7 induit une migration des cellules plus prononcée qu'en absence de FGF-7 et que celle-ci est inhibée en présence de marimastat, un inhibiteur spécifique d'ADAM17. Ce résultat a permis de mettre en évidence que l'acteur indispensable à la migration des cellules induite par le FGF-7 est ADAM17. Or l'expression d'ADAM17 étant augmentée suite à la stimulation par le FGF-7, il a été suggéré que le rôle inducteur d'ADAM17 dans la migration des cellules s'exerce en aval de la stimulation par le FGF-7 (Figure 32). Les auteurs ont cherché à élucider la voie de signalisation activée par le FGF-7 qui pourrait alors stimuler l'expression d'ADAM17. Ils ont ainsi pu mettre en évidence le rôle de la MAP-kinase p38 et de la PI3 kinase. De façon complémentaire, la phosphorylation de ERK est augmentée suite à la stimulation par le FGF-7, mais inhibée en présence de l'inhibiteur d'ADAM17, le marimastat. Ce résultat montre que le complexe FGF-7/FGFR2-IIIb active ERK par l'intermédiaire d'une métalloprotéase membranaire, et non par l'intermédiaire d'une de ses voies de signalisation intracellulaire, suggérant à nouveau que le FGF-7 peut agir indirectement pour activer d'autres récepteurs dont les voies de signalisation impliquent ERK. Des études précédentes ayant mis en évidence le rôle d'ADAM17 dans la libération des ligands de HER1, des expériences ont été réalisées en utilisant le surnageant de culture des kératynocytes en culture stimulés par le FGF-7 (milieu conditionné), comme milieu de culture de cellules épithéliales d'épiderme (lignée A431) qui surexpriment HER1 (EGFR), afin de fournir des preuves de la libération des ligands de HER1 à partir des kératynocytes stimulés. Au contact du milieu conditionné, la phosphorylation de ERK est augmentée, indiquant que le milieu conditionné contient un ligand (de HER1) qui active le récepteur et la voie de signalisation associée (ici la voie ERK). Ce phénomène est annulé par l'ajout de cétuximab, un anticorps reconnaissant spécifiquement la partie extracellulaire de HER1, empêchant toute fixation de ligand et donc toute activation spécifique du récepteur. Ce résultat suggère donc un relargage extracellulaire de ligands de HER1 par les kératynocytes stimulés au FGF-7, ligands qui auraient la capacité de se fixer et d'activer les récepteurs HERs. De la même façon, l'ajout de CRM197, un mutant de la toxine diphtérique inactivant l'HB-EGF (un ligand de HER1), dans le milieu conditionné, permet de diminuer la phosphorylation de ERK indiquant que l'HB-EGF est responsable de l'activation de HER1. En replaçant ce résultat dans le contexte du cancer du sein, il est possible que l'HB-EGF, ligand de HER1, puisse être envisagé comme un candidat potentiel pour expliquer l'activation

de HER2 (suite à une hétérodimérisation avec HER1) après la stimulation initiale des cellules tumorales par le FGF7.

L'ajout d'HB-EGF dans le milieu de culture des cellules permet de lever l'inhibition de la migration provoquée par le marimastat (inhibiteur d'ADAM17), mais pas celle provoquée par le cétuximab (inhibiteur de HER1) montrant que l'HB-EGF est donc bien le ligand de HER1 nécessaire à l'activation de voies de signalisation intracellulaire induisant la migration des cellules. Pour expliquer le mécanisme faisant le lien entre ADAM17 et HB-EGF, la littérature reporte que l'HB-EGF est produit sous forme de pro-ligand membranaire inactif (proHB-EGF). Sa libération sous forme soluble dans la MEC se fait par clivage de la partie extracellulaire par la métalloprotéase ADAM17. Ce processus est décrit comme une étape clé de l'activation de son récepteur HER1 et donc potentiellement de son partenaire d'hétérodimérisation HER2 (Sahin *et al.*, 2004, figure 9).

Ces données ont permis de révéler l'existence d'une voie de signalisation impliquant une action coordonnée de ADAM17, HB-EGF et HER1, pour permettre l'activation des voies de signalisation induisant la migration des kératinocytes activée en amont par le complexe FGF-7 / FGFR2-IIIb.

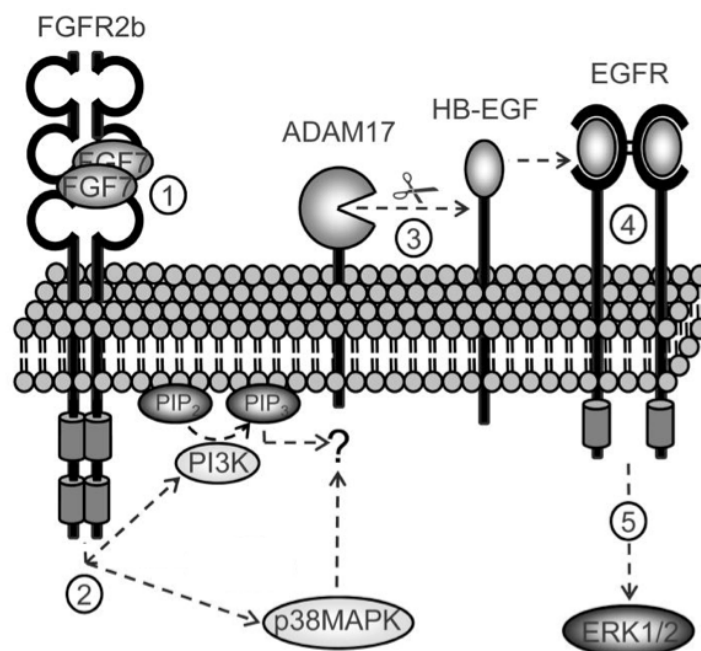


Figure 32. Implication d'ADAM17 dans la transactivation des récepteurs HERs médiée par le FGF-7

(1) La stimulation des kératinocytes par le FGF-7 permet la formation d'un complexe FGF-7 / FGFR2-IIIb. (2) Ce complexe va activer des voies de signalisation intracellulaire impliquant la MAP-kinase p38 et la PI3 kinase. (3) Ces effecteurs vont activer la métalloprotéase membranaire ADAM17 qui va libérer par clivage le ligand HB-EGF soluble. (4) L'HB-EGF peut alors se fixer sur son récepteur EGFR (HER1) et (5) activer les voies de signalisation impliquant ERK1/2, ce qui va induire la migration et la prolifération des cellules. Modifié d'après Maretzky *et al.*, 2011.

Il existe aujourd'hui des preuves d'une interconnexion entre les voies de signalisation du FGFR2 et des récepteurs HERs dans lequel le FGF-7 semblerait être le premier acteur de cet axe de signalisation. Or aujourd'hui, il est clairement établi que (i) les HSPGs agissent en tant que co-récepteur des FGFs pour former un complexe ternaire HS / FGF / FGFR (Turner et Grose, 2010) et que (ii) la 3-*O*-sulfatation des HS représente un motif structural clé dans la fixation du FGF-7 à son récepteur (Ye *et al.*, 2001, Luo *et al.*, 2006). Bien que cette donnée n'ait jusqu'à présent pu être mise en évidence que dans un système utilisant des oligosaccharides de synthèse, des travaux suggèrent que cette reconnaissance s'applique également *in vitro* et notamment dans les cellules de cancer du sein. Ainsi dans ce contexte, l'interconnexion entre le complexe HS / FGF-7 / FGFR2-IIIb et le récepteur HER2 a déjà été mise en évidence (Maretzky *et al.*, 2011 ; Wei *et al.*, 2015). Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu restent à élucider ainsi que le rôle de la 3-*O*-sulfatation dans ce contexte. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés dans ce travail à l'implication de la 3-*O*-sulfatation des HS par la 3-OST3A, dans la fixation du FGF-7 à son récepteur FGFR2-IIIb à la surface des cellules de cancer de sein conduisant à l'éventuelle transactivation du récepteur HER2.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE

Problématique et objectifs du travail de thèse

Les HSPGs sont des macromolécules ubiquitaires situées à la membrane plasmique des cellules et au sein des MEC jouant un rôle-clé dans le contrôle des interactions cellules-matrice et du micro-environnement tumoral. De par leur capacité à interagir avec de nombreux effecteurs protéiques, les HSPGs ont un rôle majeur dans la régulation de nombreux processus physiopathologiques. La biosynthèse de ces chaînes de GAGs et leur maturation font intervenir de façon séquentielle et coordonnée de nombreuses glycosyltransférases et sulfotransférases. Les différentes sulfatations des chaînes de GAGs sont à l'origine de motifs sulfatés spécifiques qui confèrent une grande diversité structurale et fonctionnelle aux chaînes de HS. Ces motifs sulfatés sont les éléments structuraux indispensables permettant aux chaînes de GAGs d'interagir avec une grande variété de ligands protéiques et cette interaction GAGs / ligands est à l'origine de la régulation de fonctions biologiques majeures.

Parmi l'ensemble des réactions que peuvent subir les GAGs en cours et en fin de synthèse, la 3-*O*-sulfatation est une modification rare et terminale de la maturation des chaînes de HS. Elle est catalysée par la famille des 3-OSTs composée de sept isoformes chez l'homme (1, 2, 3A, 3B, 4, 5 et 6). A ce jour, peu d'informations nous renseignent sur la raison pour laquelle autant d'isoformes sont présentes chez l'homme et quelles sont leurs fonctions biologiques associées. Plusieurs études ont pu montrer une implication des 3-OSTs dans les processus tumoraux en lien avec leur régulation épigénétique. Il apparaît aujourd'hui qu'une expression aberrante des gènes *3-OSTs* causée par des mécanismes de régulation épigénétique est un concept émergent dans la biologie du cancer et ces modifications épigénétiques constituent une potentielle cible thérapeutique (Thacker *et al.*, 2014). Ces travaux ont principalement mis en évidence l'hyperméthylation de la région promotrice proximale et du premier exon du gène codant l'isoforme 2 (3-OST2) associée à l'inhibition de son expression dans différentes formes de cancers tels que les cancers du sein, du côlon et du pancréas (Miyamoto *et al.*, 2003) et également dans des lignées cellulaires de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) pour lesquelles l'absence d'expression de la 3-OST2 est corrélée à un caractère pro-tumoral (Hwang *et al.*, 2013).

Des travaux précédents réalisés au sein de notre équipe avaient permis d'établir le profil de méthylation des gènes des différentes glycosyltransférases et sulfotransférases impliquées dans la biosynthèse et la maturation des chaînes de HS. Ces travaux avaient révélé une hyperméthylation spécifique des gènes *3-OSTs* (isoformes 3-OST1, 2, 3A et 6) dans des cellules de chondrosarcome associée à la répression de leur expression. D'un point de vue

fonctionnel, la surexpression des gènes *3-OST1* et *3A* par transfection avait permis de mettre en évidence une régulation du comportement cellulaire incluant une diminution de la prolifération, une diminution de la migration et une augmentation de l'adhésion suggérant un rôle anti-tumoral de ces 3-OSTs (Bui *et al.*, 2010).

Mon travail de thèse s'est ainsi inscrit dans le cadre de l'étude des modifications épigénétiques des voies de biosynthèse des GAGs dans les cancers. La question posée était de savoir si la dérégulation épigénétique des gènes *3-OSTs*, mise en évidence dans les cellules de chondrosarcome, pouvait être observée dans une autre forme de cancer plus répandue. Nous nous sommes intéressés en particulier au cancer du sein dont l'enjeu médical reste majeur en particulier dans ses formes les plus agressives et résistantes aux traitements conventionnels. L'objectif principal de ma thèse a été d'étudier le rôle fonctionnel de la 3-OST3A dans le cancer du sein. Nous nous sommes focalisés sur l'isoforme 3A puisqu'elle est la seule, entre les isoformes 1, 3A et 3B à présenter une hyperméthylation de son gène dans les lignées d'adénocarcinomes mammaires MCF-7 et MDA-MB-231.

Pour répondre à cet objectif, mes travaux de thèse ont été divisés en deux grandes parties.

La première partie a exploré le rôle de l'HS 3-O-sulfotransférase 3A (3-OST3A) comme nouveau régulateur tumoral. Nous avons pour ce faire étudié :

- (i) **Les mécanismes de régulation épigénétique de l'expression du gène 3-OST3A dans des lignées d'adénocarcinomes mammaires représentatives des différents sous-types de cancer du sein (LumA, LumB, HER2+, TN).** Pour cette étude, nous avons dans un premier temps établi le profil de méthylation du gène *3-OST3A* dans les différentes lignées en utilisant une technique de conversion au bisulfite de l'ADN génomique. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques des DNA méthyltransférases (Aza) et des histones déacétylases (TSA) avant de procéder à des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, afin de mettre en évidence les acteurs épigénétiques associés au gène d'intérêt et contrôlant potentiellement son expression.
- (ii) **L'influence du niveau d'expression de la 3-OST3A sur le comportement de cellules d'adénocarcinome mammaire par une approche de gain ou de perte de fonction.** Pour cela nous avons procédé à différents tests cellulaires (prolifération et

apoptose) en surexprimant la 3-OST3A ou en éteignant son expression dans les lignées MCF7, MDA-MB-231 et SKBR3. Le trastuzumab, anticorps monoclonal anti-HER2 (Herceptin®, Roche) a été utilisé comme un inhibiteur spécifique du récepteur HER2. Après avoir mis en évidence un effet pro-apoptotique de la 3-OST3A dans les cellules MCF-7, nous avons poursuivi l'investigation des mécanismes de survie cellulaire dans cette lignée afin de mettre en évidence les protéines pro-apoptotiques exprimées par ces cellules en réponse à la surexpression de la 3-OST3A.

- (iii) **L'expression de la 3-OST3A dans les tumeurs des patientes atteintes d'un cancer du sein en relation avec leur survie sans rechute.** Cette étude clinique réalisée sur une cohorte de 117 patientes atteintes de différents sous-types de cancer du sein a été menée par Jean-Christophe Bourdon et son équipe à l'Université de Dundee, Écosse (Collaboration LIA *SFGEN* CNRS-UL). Après avoir mis en évidence que le niveau d'expression de la 3-OST3A dans les tumeurs des patientes est statistiquement différent selon le sous-type, l'étude clinique s'est concentrée sur les patientes atteintes du cancer de sein de sous-type HER2+ pour lesquelles une corrélation a été mise en évidence entre l'expression de la 3-OST3A et la rechute.

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, je me suis attachée à comprendre la relation entre la forte expression de la 3-OST3A et le caractère agressif des tumeurs de sous-type HER2+. Le but était d'élucider les mécanismes moléculaires par lesquels la 3-OST3A renforce l'agressivité du cancer du sein de ce sous-type. Pour cette étude, nous avons travaillé sur un modèle cellulaire présentant les mêmes caractéristiques moléculaires que les patientes HER2+ de l'étude clinique précédente, à savoir les cellules SKBR3 (HER2+ ; ER- ; PR-) qui ont été transfectées de façon à moduler, c'est-à-dire surexprimer ou inhiber l'expression de la 3-OST3A. Ces études ont permis de montrer que la 3-O-sulfatation des HS induisait l'activation du récepteur HER2 dans les cellules de cancer du sein SKBR3 par un mécanisme qui reste encore à déterminer. Ont donc été étudiés dans cette partie :

- (i) **L'influence de la surexpression de la 3-OST3A sur l'activation du récepteur HER2 et ses effecteurs intracellulaires.** Après avoir montré, dans la première partie

de mon travail de thèse, que la surexpression de la 3-OST3A a un effet pro-prolifératif sur les cellules SKBR3, nous avons cherché à déterminer l'influence de cette enzyme sur l'expression et l'activation du récepteur HER2, responsable du caractère agressif de ce sous-type de cancer, et de ses voies de signalisation intracellulaires, notamment la voie PI3k-Akt. Après avoir mis en évidence que la 3-OST3A active le récepteur HER2, nos premiers résultats ont suggéré que la 3-OST3A induirait également l'activation de la protéine Akt, un effecteur de la signalisation intracellulaire de HER2. Le trastuzumab a été utilisé en tant qu'inhibiteur spécifique de l'activation de HER2.

- (ii) **Le mécanisme d'activation du récepteur HER2 suite à la surexpression de la 3-OST3A.** Deux pistes ont été explorées : la première impliquerait une activation du récepteur HER2 suite à son hétérodimérisation avec un autre récepteur HER. La deuxième impliquerait une transactivation de HER2 consécutive à l'activation du récepteur FGFR2IIIb par le FGF-7. La phosphorylation de HER2, témoin de son activation, a ainsi été étudiée en réponse à la stimulation des cellules par des facteurs de croissance comme l'HB-EGF (ligand du récepteur HER1), pour explorer notre première hypothèse. Une étude a parallèlement été menée en stimulant les cellules par le FGF-7, ligand spécifique du récepteur FGFR2IIIb, pour explorer notre deuxième hypothèse et savoir si une transactivation entre les voies impliquant HER2 et le FGFR2IIIb pouvait avoir lieu dans ce contexte.

MATERIELS ET METHODES

I. LIGNÉES CELLULAIRES ET CONDITIONS DE CULTURE

A. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires SKBR3, BT-474, T-47D, MDA-MB-231, MDA-MB-453 et MDA-MB-468 provenant d'adénocarcinomes humains de sein et la lignée de cellules épithéliales mammaires MCF-10A ont été obtenues auprès de la banque de cellules « *American Type Culture Collection* » (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France). La lignée MCF-7 d'adénocarcinome humain de sein a été obtenue auprès de la banque de cellules « *European Collection of Cell Cultures* » (ECACC, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Les caractéristiques des lignées cellulaires, en termes de classification et de sous-types moléculaires, sont présentées dans le Tableau 10.

Tableau 10. Classification des lignées cellulaires cancéreuses mammaires utilisées

Lignées cellulaires	Classification St Gallen (Goldhirsch <i>et al.</i> , 2011)	Sous types moléculaires
MCF-7	Luminale A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻
T-47D	Luminale A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻
BT-474	Luminale B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺
MDA-MB-468	Triple Négative (TN)	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻
MDA-MB-231	Triple Négative (TN)	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻
SKBR3	HER2 ⁺	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺
MDA-MB-453	HER2 ⁺	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺

ER : récepteur aux œstrogènes, PR : récepteur à la progestérone, HER2 : *Human Epidermal growth factor Receptor-2*

B. Conditions de culture

Les cellules SKBR3, MCF-7, BT-474, MDA-MB-231, MDA-MB-453 and MDA-MB-468 ont été cultivées en milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contenant 4.5 g/L glucose et supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF), 1% (v/v) de pénicilline (1 U/mL) /streptomycine (1 µg/mL), 2 mM de L-glutamine et 0.1 mM d'acides aminés non essentiels (AANE). Ces réactifs ont été fournis par Gibco® (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Les cellules T-47D ont été cultivées en milieu RPMI-1640 supplémenté par 10% (v/v) de SVF, 1% (v/v) de pénicilline (1 U/mL) /streptomycine (1 µg/mL), 2 mM de

L-glutamine et 0.2 U/mL d'insuline bovine. Les **cellules MCF-10A** ont été cultivées en milieu DMEM/F-12 supplémenté par 5% (v/v) de sérum de cheval, 1% (v/v) de pénicilline (1 U/mL) /streptomycine (1 µg/mL), 2 mM de L-glutamine, 20 ng/mL d'*Epidermal Growth Factor* (EGF), 0.5 µg/mL d'hydrocortisone, 100 ng/mL de toxine de choléra, et 10 µg/mL d'insuline. Ces produits ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Les cellules ont été entretenues en flasques de 75 cm² (Corning Incorporated, NY, Costar®) en incubateur à atmosphère humide, à 37°C et à 5% de saturation en CO₂.

II. MÉTHODES DE TRANSFECTION DES CELLULES

A. Transfection transitoire par électroporation

1. Transfection des cellules par le plasmide contenant la séquence d'ADNc codant la 3-OST3A

Le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A dans lequel la séquence codant la protéine recombinante est étiquetée par le peptide de l'hémagglutinine (HA) ou le plasmide pcDNA3.1(+) (vide) ont été transfectés transitoirement dans les cellules MCF-7, MDA-MB-231 et SKBR3 par électroporation selon les recommandations du fournisseur (Nucleofector™ Protocols, Lonza), spécifiques à chaque lignée cellulaire. L'expression de la 3-OST3A a été analysée en utilisant un anticorps anti-HA produit chez la souris (H9658, Sigma Aldrich) pour les expériences d'immunoblot ou chez le lapin (H6908, Sigma Aldrich) pour les expériences d'immunofluorescence.

2. Transfection des cellules par les siRNA spécifiquement dirigés contre le gène 3-OST3A

Les siRNAs spécifiquement dirigés contre le gène *3-OST3A* ont été dessinés et synthétisés par Eurogentec (Liège, Belgique). Deux siRNAs 3-OST3A, ciblant respectivement le début et la fin de la séquence codante (séquences et positions cibles indiquées dans le Tableau 11 et un siRNA contrôle négatif ne comportant aucune séquence d'appariement pour la cible (fourni par Qiagen, Hilden, Allemagne) ont été transfectés dans les cellules SKBR3 par électroporation selon les recommandations du fournisseur (Nucleofector™ Protocols, Lonza).

Tableau 11. Séquences des siRNA utilisés pour réprimer l'expression du gène 3-OST3A

Gène	Référence Genbank	Séquences nucléotidiques		Taille (pb)	Position
3-OST3A	NM_006042.1	Cible 1	5'-CGTCCCTTTACGTCTTCTA-3'	19	899-917
		Sens 1	5'-CGUCCCUUUACGUCUUCUA-3'		
		Antisens 1	5'-UAGAAGACGUAAAGGGACG-3'		
		Cible 2	5'-ATCTGGTAGAACTTGAGGT-3'	19	1970-1988
		Sens 2	5'-ACCUCAAGUUCUACCAGAU-3'		
		Antisens 2	5'-AUCUGGUAGAACUUGAGGU-3'		

L'efficacité d'inhibition de l'expression du gène 3-OST3A par les siRNA a été vérifiée par RT-PCRq en analysant le taux des ARNm de la 3-OST3A (>80%) en utilisant les amorces listées dans le Tableau 12 et par immuno-détection de la protéine recombinante 3-OST3A-HA en utilisant l'anticorps anti-HA (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France).

Tableau 12. Séquences nucléotidiques des amorces utilisées en RT-PCRq pour analyser l'expression des ARNm 3-OST3A

Gène	Séquences nucléotidiques		Taille du fragment amplifié (pb)	Tm (°C)
3-OST3A	Sens	5'-CAGTGCCCTCTCCACCTC-3'	108	60
	Antisens	5'-GCCAGGCAGTAGAAGACGTAA-3'		

B. Transfection stable des cellules de la lignée MCF-7

Pour réaliser l'expression stable de la 3-OST3A, le protocole de transfection a été optimisé en utilisant le vecteur pEGFP-N1 (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, France) dans lequel a été sous-cloné le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3.1(+) contenant ou non la séquence nucléotidique codant la 3-OST3A étiquetée HA. Les cellules MCF-7 arrivées à 80% de confluence ont été trypsinées, comptées etensemencées en plaques six puits à une densité de 3×10^5 cellules/puits dans du milieu complet 24 heures avant transfection. Après une mise en contact de 15 min à 4°C, le mélange de transfection contenant 2 µg d'ADN

plasmidique et 15 μ L d'Exgen-500 (Euromedex, Souffelweyersheim, France) a été déposé dans chaque puits sur le tapis cellulaire « à sec » avant ajout de milieu sans sérum. Après 3 heures de culture, 1 mL de milieu complet contenant 20% (v/v) de SVF est finalement ajouté dans les puits. La sélection des clones stables a été réalisée en supplémentant le milieu de culture complet avec 1.5 mg/mL de généticine (G-418, Gibco, ThermoFischer scientifique). Des colonies résistantes ont été isolées, remises en culture et amplifiées en plaques 24, 12 et 6 puits. L'expression de la 3-OST3A-HA a été vérifiée pour chaque clone par immunoblot au moyen d'un anticorps anti-HA. Deux colonies exprimant de façon stable la 3-OST3A (notées 3-OST3A-A et -B) et deux colonies contrôles transfectées par le plasmide vide (notées pcDNA-A et -B) ont été choisies pour des expériences de xéno greffe *in vivo* réalisées par l'équipe du Docteur Philippe Lassalle à l'Institut Pasteur de Lille.

III. TRAITEMENTS DES LIGNÉES CELLULAIRES

A. Protocole de traitement des lignées MCF-7 et MDA-MB-231 par les inhibiteurs des marques épigénétiques, la 5-aza-2'-déoxycytidine (Aza) et la trichostatine A (TSA).

Les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 arrivées à 80% de confluence ont été trypsinées, comptées et ensemencées en plaques six puits à une densité de 3×10^5 cellules/puits dans du milieu complet. Les cellules ont été traitées par 2 et 4 μ M de 5-aza-2'-déoxycytidine (Aza, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) (Bui *et al.*, 2010), pendant 9 jours et les contrôles traités avec le diluant de la solution seul (*Phosphate Buffered Saline*, PBS, Gibco). Au cours du traitement, les cellules ont subi deux passages et le milieu de culture contenant l'Aza a été remplacé tous les deux jours. La trichostatine A (TSA, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à la concentration finale de 300 nM (Vigushin *et al.*, 2001) ou le diluant seul ont été ajoutés dans le milieu de culture des cellules 24 heures avant la fin de l'expérience. Les séquences de traitements sont présentées dans le Tableau 13.

Tableau 13. Protocoles de traitements des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 par la 5-aza-2'-déoxycytidine (Aza) et/ou par la trichostatine A (TSA)

	Trypsination des cellules	Changement du milieu	Traitement Aza (2 et 4 μ M)	Traitement TSA (300 nM)
J0	Ensemencement des cellules en plaques 6 puits (3×10^5 cellules/puits)			
J1	-	+	+	-
J2	-	-	-	-
J3	+	+	+	-
J4	-	-	-	-
J5	-	+	+	-
J6	-	-	-	-
J7	+	+	+	-
J8	-	-	-	+
J9	Récolte des cellules pour analyses			

B. Traitements des cellules SKBR3

1. Traitement des cellules SKBR3 par le trastuzumab (Herceptin™)

24 heures après transfection par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou le siRNA dirigé contre le gène *3-OST3A* et leurs contrôles respectifs, les cellules SKBR3 ont été traitées par 20 ou 40 µg/mL de trastuzumab (Feldinger.K *et al.*, 2014) pendant 24 heures avant d'être utilisées pour des analyses protéiques et des tests de prolifération cellulaire.

Le trastuzumab a été gracieusement fourni par le Dr. Catherine Vallance de l'Institut de Cancérologie de Lorraine (Vandœuvre-lès-Nancy, France).

2. Stimulation des cellules SKBR3 par des facteurs de croissance

Les cellules SKBR3 transfectées par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ont été cultivées dans un milieu de culture sans sérum pendant 24 heures afin de s'affranchir de l'influence des facteurs de croissance présents dans le sérum contenu dans le milieu complet. Les cellules ont ensuite été stimulées par les facteurs de croissance HB-EGF (SRP3052, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) ou FGF-7 (251-KG-010, R&D Systems, Minneapolis, MN, États-Unis) selon le protocole indiqué dans le Tableau 14. À la suite des stimulations, les cellules ont été récoltées et les protéines ont été extraites en vue d'effectuer des analyses protéiques par Western-Blot.

Tableau 14. Protocole de stimulation par des facteurs de croissance des cellules SKBR3 surexprimant la 3-OST3A

J0	Transfection des cellules SKBR3 par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou par le vecteur vide par électroporation				
J1	Culture en milieu sans sérum				
J2	Stimulation par les facteurs de croissance (FC) et récolte des cellules :	FC	Doses	Durées de stimulation	Références bibliographiques
		HB-EGF	1 µg/mL	10, 20 et 30 minutes	Mahtouk <i>et al.</i> , 2006
		FGF-7	0.5 ng/mL	10, 20 et 30 minutes	Mao, Gauche <i>et al.</i> , 2016

IV. ANALYSE DU TAUX D'EXPRESSION DES ARNm DE LA 3-OST3A

A. Analyse à partir des lignées cellulaires étudiées

1. Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux a été réalisée à partir des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 précédemment traitées par l'Aza et la TSA et également à partir de toutes les cellules étudiées non traitées. Les ARNm totaux ont été extraits et purifiés suivant les instructions du kit *Qiagen*[®] *RNeasy Mini* (Qiagen, Hilden, Allemagne). La pureté et la concentration des ARNm ont été évaluées par mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm sur le spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA). Les échantillons ont été conservés à -80°C en vue de leur utilisation pour la réaction de rétro-transcription.

2. Analyse en RT-PCR quantitative (RT-PCRq)

La rétro-transcription de l'ARN en ADNc a été réalisée à l'aide du kit *Super Script VILO*[®] *cDNA Synthesis* (Invitrogen, Carlsbad, CA, États-Unis) en utilisant 1 μg d'ARN et dans les conditions suivantes : 10 minutes à 25°C suivies de 60 minutes à 42°C et finalement 5 minutes à 85°C .

La réaction de PCRq a été effectuée en plaques 96 puits sur l'appareil LightCycler[®] (Roche, Meylan, France) et chaque essai contient :

- 10 μL de SYBR Green I (Qiagen, Hilden, Allemagne) contenant la polymérase, les dNTP, le tampon et le fluorochrome
- 1 μL d'amorce sens (10 pmoles)
- 1 μL d'amorce antisens (10 pmoles)
- 2 μL d'ADNc dilué dix fois (soit environ 0.1 μg d'ADNc)
- H_2O RNase, DNase free: qsp 20 μL

Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées sont répertoriées dans le Tableau 12.

La réaction de PCRq a été réalisée selon les conditions données dans le Tableau 15. La spécificité d'amplification a été vérifiée par analyse des courbes de fusion et la méthode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ a été utilisée pour déterminer les niveaux d'expression relatifs des ARNm de la 3-OST3A après normalisation au gène de référence RPS29 (*Ribosomal Protein S29*).

Tableau 15. Conditions de réaction de la PCRq pour l'analyse du taux d'expression des ARNm de la 3-OST3A dans les lignées cellulaires étudiées

Étapes de la réaction de PCRq	Température (°C)	Temps (secondes ou minutes)	Nombre de cycles
Dénaturation	94°C	15 minutes	X
Hybridation et Élongation	94°C 55°C (RPS 29) ou 60°C (3-OST3A)	15 secondes 1 minute	45
Extension finale	94°C	15 secondes	X
	60°C	1 minute	
	94°C	15 secondes	

B. Analyse à partir de tissus tumoraux mammaires de patientes atteintes d'un cancer du sein

Cette partie de l'étude a été réalisée par l'équipe de Jean-Christophe Bourdon avec laquelle nous travaillons en collaboration à l'Université de Dundee (*Jacqui Wood Cancer Centre, Division of Cancer Research*) dans le cadre du Laboratoire International Associé (LIA). L'étude a été réalisée sur une cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein et représentatives des quatre sous-types selon la classification moléculaire de St Gallen : Luminale A, Luminale B, Triple négative et HER2 (Tableau 1).

1. Méthodologie employée

L'analyse du taux d'expression des ARNm de la 3-OST3A dans les tumeurs des patientes atteintes d'un cancer du sein a été réalisée à partir d'un prélèvement de 10 mg de tissu tumoral (composé de plus de 40% de cellules tumorales). Les échantillons ont été homogénéisés dans 75 µL de réactif de lyse QIAzol (Qiagen, Hilden, Allemagne) avant de procéder à l'extraction des ARN totaux comme décrit dans la section IV.A.1. La qualité de l'ARN a été évaluée par l'appareil BioAnalyzer 2100TM (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Etats-Unis) avant l'analyse en RT-PCRq. Les échantillons présentant un ratio 28S/18S < 1.2 ont été éliminés.

La réaction de rétro-transcription a été réalisée avec 0.5 µg d'ARN au moyen du kit *Cloned AMV Reverse Transcriptase* (Invitrogen) et la qualité de l'ADNc obtenu a été confirmée par PCR en utilisant les amorces codant l'actine. Les échantillons d'ADNc qui n'étaient pas amplifiés après 30 cycles de PCR ont été éliminés. Les conditions de réaction de PCRq sont décrites dans le tableau 6.

2. Analyses statistiques des données cliniques

La variabilité d'expression de la 3-OST3A entre les sous-types de cancer du sein a été évaluée par le test statistique de Kruskal-Wallis (hypothèse nulle rejetée) permettant de dire qu'il y a une différence significative d'expression de la 3-OST3A entre les différents sous-types, suivi du test statistique de Mann-Whitney permettant une comparaison par paires.

Les données cliniques ont été soumises à des analyses statistiques univariées (Kaplan-Meier et test Log Rank) en utilisant le logiciel SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, version 21.0) suivie d'analyses multivariées en utilisant le modèle de régression de Cox à risques proportionnels (CR) associés au rapport des risques instantanés (*Hazard Ratios*, HR). Une valeur de $P < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative.

V. ÉTABLISSEMENT DU PROFIL DE MÉTHYLATION DU GÈNE 3-OST3A DANS UN PANEL DE LIGNÉES CELLULAIRES CANCÉREUSES MAMMAIRES

A. Identification des îlots CpG

Un îlot CpG est défini comme une séquence d'au moins 200 paires de bases (pb) contenant une densité de dinucléotides CG supérieure à 50%. La présence d'îlots CpG au niveau de la séquence de la région proximale du promoteur (1000 pb) en amont du site d'initiation de la transcription (*transcription start site*, TSS) ainsi que dans le premier exon du gène 3-OST3A a été déterminée par une méthode bioinformatique en utilisant le logiciel MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer/>).

B. Méthodologie expérimentale de la mise en évidence de la méthylation de l'ADN

1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique des cellules MCF-10A, SKBR3, MCF-7, BT-474, T-47D, MDA-MB-231, MDA-MB-453 et MDA-MB-468 a été extrait au moyen du kit *Illustra*

GenomicPrepTM DNA isolation (GE Healthcare, Buckinghamshire, GB). La qualité et la quantité d'ADN ont été évaluées par spectrophotométrie sur le spectrophotomètre Nanodrop® ND-1000 (Spectrophotometer ThermoFisher Scientific, Wilmington, USA). La pureté de l'ADN obtenu a été estimée au moyen du rapport $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ qui doit être compris entre 1.8 et 2 et la vérification de l'absence de contamination de l'échantillon est faite par la mesure du rapport $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ qui doit être supérieure à 2. La quantité d'ADN a été déterminée en considérant qu'une unité d'absorbance à 260 nm correspond à une concentration de 50 µg d'ADN/mL.

2. Conversion au bisulfite

La carte de méthylation des îlots CpG a été établie en utilisant la technique de conversion au bisulfite (*EpiTect Bisulfite kit*, Qiagen, Courtaboeuf, France) qui modifie de façon chimique les résidus cytosine en uracile lorsque ces nucléotides ne sont pas méthylés. Dans le cas contraire, les cytosines méthylées ne sont pas modifiées (Figure 33).

3. Amplification des séquences d'intérêt par Nested-PCR

Les séquences d'intérêt, à savoir la région promotrice proximale (notée 5') et le premier exon (noté 3') du gène *3-OST3A*, ont ensuite été amplifiées en deux étapes successives par la technique de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dite « nichée » (« *Nested-PCR* ») dans un thermocycleur (Mastercycler® Eppendorf, Le Pecq, France) en utilisant deux couples d'amorces oligonucléotidiques dont les séquences sont reportées dans le Tableau 16.

Tableau 16. Séquences nucléotidiques des amorces utilisées pour la réaction d'amplification par PCR nichée (*Nested-PCR*)

Gène	Amorces		Localisation par rapport au TSS	Taille (pb)	Nombre de CpG
3- <i>OST3A</i> région 5'	Externe sens	5'-TAGTGTTAAGAGGGGAGTAG-3'	-454 à +281	735	46
	Externe antisens	5'-CTTTCTCTAATCCCCTTACC-3'			
Interne sens	5'-ATTAAGTTAGTGGCGTTTGGG-3'	-360 à +120	480		
	Interne antisens			5'-CTACTCTTAAACCCACCTAT-3'	
3- <i>OST3A</i> région 3'	Externe sens	5'-ATAGGTGGGGTTTAAGAGTAG-3'	+100 à +768	668	54
	Externe antisens	5'-CCGACCATACTAAACCTAAAC-3'			
Interne sens	5'-GGAAAGGGGATTAGAGAAAG-3'	+262 à +746	484		
	Interne antisens			5'-CCGACAAATACCAAAACATCC-3'	

La première réaction de PCR a été réalisée à partir de 100 ng d'ADN génomique en utilisant la *TaqDNA* polymérase du kit *AccuPrime™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) et un couple d'amorces externes nommées externe sens et externe antisens en présence de dNTP (10 mM) dans un volume final de 30 µL dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation à 94°C de 8 minutes suivie de 20 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C, 30 secondes à 72°C, et d'une étape d'élongation de 10 minutes à 72°C.

La deuxième réaction de PCR a été réalisée de la même façon à partir de 3 µL de la première réaction en utilisant des amorces internes nommées interne sens et interne antisens dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation à 94°C de 8 minutes suivies de 35 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 60°C, 30 secondes à 72°C et d'une étape d'extension finale de 10 minutes à 72°C.

Les étapes de conversion au bisulfite et d'amplification par PCR sont illustrées en Figure 33.

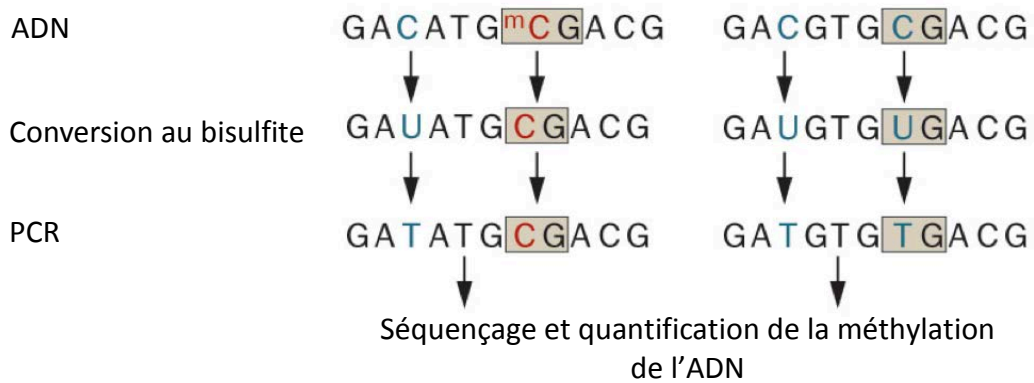


Figure 33. Schéma de conversion au bisulfite des cytosines

Dans cet exemple, la séquence d'ADN comporte des îlots CpG qui présentent des méthylation au niveau des résidus cytosines. Certains résidus cytosines sont méthylés (en rouge) et d'autres non (en bleu). Après conversion au bisulfite et amplification des zones d'intérêt par PCR, les cytosines non méthylées sont converties en résidus thymines alors que les cytosines méthylées restent inchangées. D'après Weller *et al.*, 2009.

4. Purification des produits de PCR, clonage, ligation et transformation bactérienne

Les produits de PCR ont été séparés sur gel d'agarose 1.2 % (p/v) en présence d'un agent intercalant (*SYBR® Safe DNA gel stain*, ThermoFisher Scientific), purifiés sur colonne (*Gel Purification kitTM*, Qiagen) et clonés dans le vecteur PCR2.1 grâce au kit *TOPO TA Cloning®* (Invitrogen). Le mélange de ligation a été transformé dans des bactéries compétentes (*One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli*). Les colonies ont été sélectionnées sur boîte d'agar «AXI» (ampicilline 100 µg/mL, X-galactose 40 µg/mL, isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0,1 mM) permettant la sélection des bactéries recombinantes selon le système blanc / bleu. Trois à cinq clones positifs ont été cultivés en milieu Luria-Bertani (LB) en présence d'ampicilline (100 µg/mL) sous agitation 12 h à 37°C avant extraction de l'ADN plasmidique (*QIAprep Spin Miniprep kitTM*, Qiagen). L'ADN de trois clones différents a été séquencé (*Beckman Coulter Genomics*, Essex, Grande-Bretagne) afin d'identifier les cytosines méthylées.

C. Établissement de la carte de méthylation du gène 3-OST3A

L'établissement de la carte de méthylation du gène 3-OST3A se fait selon les étapes présentées dans la Figure 34.

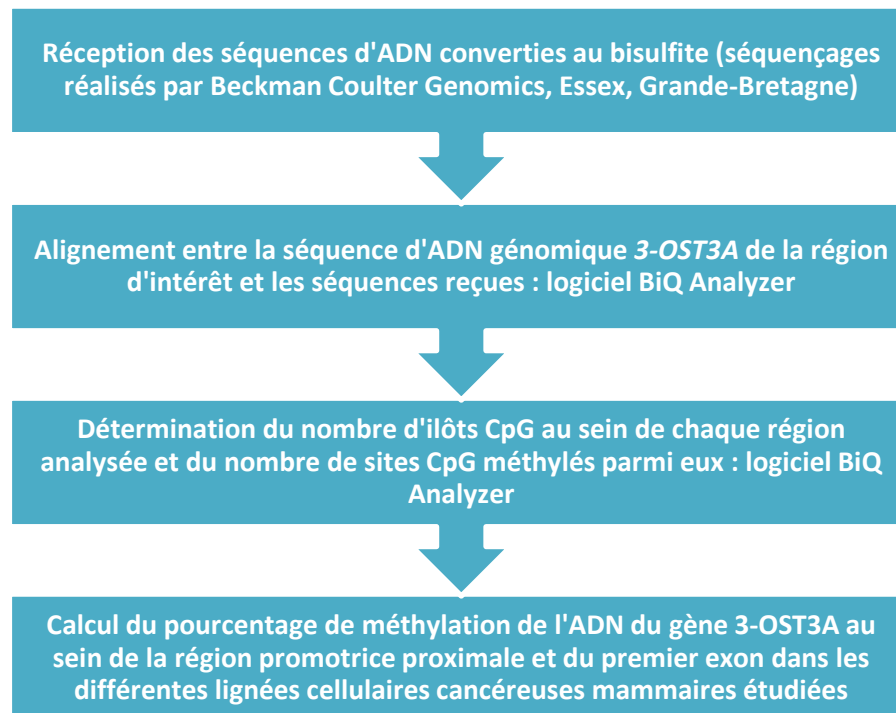


Figure 34. Étapes permettant l'établissement de la carte de méthylation du gène 3-OST3A dans un panel de lignées cancéreuses mammaires

Les séquences d'ADN converties au bisulfite sont alignées avec les séquences de la région promotrice proximale et du premier exon du gène 3-OST3A non converties afin de déterminer le nombre total d'ilôts CpG. La proportion d'ilôts CpG méthylés est calculée dans chaque séquence par le logiciel *BiQ Analyzer* (version v2.00) permettant d'évaluer le niveau de méthylation du gène 3-OST3A.

VI. MISE EN ÉVIDENCE DES ACTEURS ÉPIGÉNÉTIQUES ASSOCIÉS AU GÈNE 3-OST3A DANS LES CELLULES MCF-10A, MCF-7 ET MDA-MB-231 PAR IMMUNOPRÉCIPITATION DE LA CHROMATINE (CHIP)

La méthodologie expérimentale de l'immunoprécipitation de la chromatine est schématisée en Figure 35.

1. Pontage ADN-protéines dans les cellules MCF-10A, MCF-7 et MDA-MB-231

Les cellules MCF-10A, MCF-7 et MDA-MB-231 arrivées à 70 % de confluence ont été trypsinées, comptées et lavées par du tampon PBS. Pour chaque type cellulaire, 10^6 cellules ont été incubées avec du *paraformaldehyde* (37 % (p/v)) pendant 10 minutes à température ambiante afin de permettre un pontage entre l'ADN et les protéines. 1.25 M de glycine (*Low Cell# ChIP kit*, Diagenode) a été ajouté au mélange afin de stopper la réaction

de pontage. Les cellules ont ensuite été lavées deux fois avec du PBS froid puis centrifugées à 4°C pendant 10 minutes à 400 g.

2. Lyse des cellules et fractionnement de l'ADN par sonication

Le culot cellulaire a été resuspendu dans un mélange de tampon B, composé de détergents et d'ions chélateurs, avec inhibiteurs de protéases (*Low Cell# ChIP kit*, Diagenode) avant de procéder à la lyse des cellules par sonication. Les cellules ont été soniquées 12 fois pendant 30 secondes en séparant chaque cycle par une incubation de 30 secondes dans la glace, afin de fractionner l'ADN en petits fragments de 500 paires de bases environ. Après une centrifugation à 4°C pendant 10 minutes à 400 g, le lysat a été resuspendu dans un mélange de tampon A, composé de détergents, de sel et d'ions chélateurs, avec inhibiteurs de protéases (*Low Cell# ChIP kit*, Diagenode). Les échantillons ainsi obtenus contenant la chromatine totale correspondent au témoin positif de la réaction et sont appelés « Input ». L'ADN total a été quantifié par spectrofluorimétrie sur l'appareil Qubit (Invitrogen) en utilisant le kit *Quant-iT dsDNA HS Assay* (Invitrogen).

3. Immunoprécipitation de l'ADN total

a) Préparation du complexe billes magnétiques de protéines G / anticorps

Les billes magnétiques couplées aux protéines G (*Protein G-coated magnetic beads*, *Low Cell# ChIP kit*, Diagenode) ont été lavées deux fois avec un mélange de tampon A-inhibiteurs de protéases avant d'être incubées avec les anticorps ciblant les protéines d'intérêt pendant deux heures à 4°C afin de permettre la liaison des anticorps aux billes magnétiques (voir liste des anticorps dans le Tableau 17). Un anticorps contrôle ne reconnaissant aucune des protéines cibles (*negative control IgG from mouse*, *Low Cell# ChIP kit*, Diagenode) a été utilisé en parallèle dans les mêmes conditions expérimentales. Les échantillons ont ensuite été placés sur un rack magnétique (DiaMag02, Diagenode) afin d'éliminer le surnageant et de ne conserver que les billes magnétiques.

Tableau 17. Liste des anticorps utilisés pour les analyses d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Anticorps	Fournisseur /Référence	Source	Quantité par réaction
DNMT1 (mAb)	Active Motif 39204	souris	5-10 µg
DNMT3A (mAb)	Active Motif 39206	souris	5-10 µg
DNMT3B (mAb)	Active Motif 39207	souris	5-10 µg
Histone H3K4me3 (pAb)	Active Motif 39915	lapin	5-10 µg
Histone H3K9me3 (pAb)	Active Motif 39161	lapin	5-10 µg
Histone H3K27me3 (pAb)	Active Motif 39155	lapin	5-10 µg
EZH2 (mAb)	Active Motif 39875	souris	1-3 µg
SUZ12 (pAb)	Diagenode C15310029	lapin	5 µg
HDAC1 (pAb)	Invitrogen Life technologies 49-1025	lapin	5-10 µg
MeCP2 (pAb)	Diagenode pAb-052-050	lapin	5-10 µg
Sin3A (pAb)	Active Motif 39865	lapin	5-10 µg

Monoclonal (m), polyclonal (p) antibodies (Ab).

b) Immunoprécipitation de l'ADN total

Le culot contenant les anticorps liés aux billes magnétiques a été resuspendu avec l'ADN cellulaire total (Input) et incubé toute la nuit à 4°C sous agitation douce pour assurer l'étape d'immunoprécipitation. Des étapes de lavages ont été réalisées le lendemain afin d'éliminer la chromatine libre.

4. Dépontage entre ADN et anticorps liés aux billes de protéines G

a) Réaction de dépontage

Le dépontage entre l'ADN et les anticorps est réalisé en incubant toute une nuit à 65°C, les échantillons de chromatine immunoprécipités dans un mélange de tampons A et B (115.4 µl de tampon A et 4.6 µL de tampon B) (*IPure kit*, Diagenode). Les échantillons ont ensuite été placés sur un rack magnétique et le surnageant a été éliminé.

b) Purification et élution de l'ADN immunoprécipité

L'ADN ainsi dénaturé a été précipité avec 100 µL d'isopropanol et hybridé aux billes magnétiques du kit selon les recommandations du fournisseur (*IPure kit*, Diagenode) pendant deux heures à température ambiante sous agitation douce avant d'être lavé pendant 5 minutes. Finalement, le tampon d'élution (Tampon C, *IPure kit*, Diagenode) a été ajouté afin de récupérer l'ADN immunoprécipité purifié qui est maintenant prêt à être utilisé pour la réaction de PCR.

5. Amplification de l'ADN immunoprécipité par PCR

a) Design des amorces spécifiques pour l'amplification du gène 3-OST3A

Les amorces de PCR sens et antisens (Tableau 18) ont été dessinées à l'aide du logiciel *Premier Primer 5.0* (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>) afin d'amplifier trois régions adjacentes au site d'initiation de la transcription (TSS) du gène 3-OST3A : les régions nucléotidiques -347/-129, +216/+393 et +468/+605.

Tableau 18. Séquences nucléotidiques, tailles, localisations par rapport au TSS et Tm des amorces de PCR utilisées pour les analyses de ChIP

Amorces spécifiques du gène 3-OST3A			Taille (pb)	Localisation par rapport au TSS	Tm (°C)
Région 1	Sens	5'-GCGTCTTGGGTGGAAGTCAG-3'	219	-347/-129	65
	Antisens	5'-TGGGATGGAGAAAAGGTGGC-3'			
Région 2	Sens	5'-CCTTGGCTGAGAGAACCCTGAAC-3'	178	+216/+393	
	Antisens	5'-TCAGCGATCCTGCATCACTGGC-3'			
Région 3	Sens	5'-GCCAAGGCTGCCCAAGCTCA-3'	138	+468/+605	
	Antisens	5'-CAGGATCCCTGCCTCCAGTC-3'			

b) Conditions de la réaction de PCR

L'ADN immunoprécipité purifié a été utilisé comme matrice pour la réaction de PCR qui se déroule en présence des amorces (sens et antisens) spécifiques du gène *3-OST3A* (Figure 35) selon les conditions de réaction suivantes :

- amorce sens : 5 pmoles
- amorce antisens : 5 pmoles
- mélange de dNTP (10 mM) : 1 μ L
- 10x PCR buffer : 2.5 μ L
- 10x PCR loading dye: 2.5 μ L
- Bio-X-Act polymerase: 0.5 μ L
- échantillon (ADN immunoprécipité) : 6 μ L
- H₂O RNase, DNase free : qsp 25 μ L

La réaction de PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Mastercycler® Eppendorf, Le Pecq, France) dans les conditions suivantes : une étape de dénaturation à 94°C de 2 minutes suivie de 35 cycles de 20 secondes à 94°C, 1 minute à 65°C, 30 secondes à 72°C, et d'une étape d'extension finale de 5 minutes à 72°C.

Les produits de PCR ont ensuite été déposés sur un gel d'agarose à 2% (p/v) contenant un agent intercalant (*SYBR® Safe DNA gel stain*, ThermoFisher Scientific). La présence des marques épigénétiques au niveau des régions amplifiées du gène *3-OST3A* a été mise en évidence grâce à une lampe à UV.

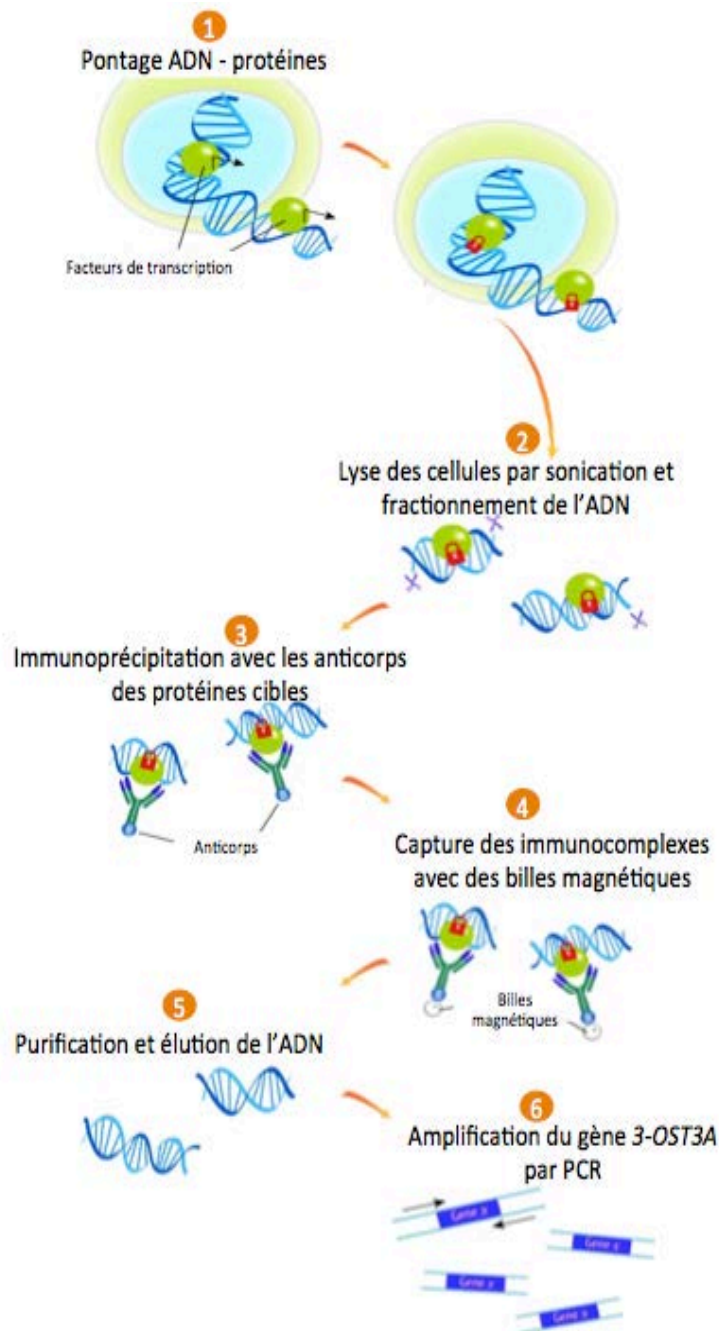


Figure 35. Principales étapes de la réaction d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

L'immunoprécipitation de la chromatine permet d'identifier les acteurs épigénétiques associés au gène *3-OST3A*. Plusieurs étapes sont nécessaires : (i) pontage ADN – protéines, (ii) lyse des cellules et fragmentation de l'ADN par sonication, (iii) immunoprécipitation avec les anticorps dirigés contre les protéines cibles, (iv) capture des immunocomplexes avec des billes magnétiques, (v) purification et élution de l'ADN, (vi) amplification du gène *3-OST3A* par PCR. Modifié d'après <https://www.rndsystems.com/products/exactachip-chromatin-immunoprecipitation-kits-assay-principle>.

VII. TESTS CELLULAIRES D'APOPTOSE ET DE PROLIFÉRATION DES CELLULES CANCÉREUSES MAMMAIRES MCF-7, MDA-MB-231 ET SKBR3 PAR UNE APPROCHE DE GAIN OU DE PERTE DE FONCTION DE LA 3-OST3A

A. Evaluation de l'apoptose par cytométrie en flux

Les cellules MCF-7, MDA-MB-231 et SKBR3 ont été transfectées transitoirement par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou le vecteur vide etensemencées en plaques 6 puits à la densité cellulaire de 1.5×10^5 cellules par puits. Il en est de même pour les cellules SKBR3 qui ont été transfectées par un siRNA ciblant le gène *3-OST3A* ou le siRNA contrôle. 48 heures après la transfection, les cellules ont été marquées à l'annexine V et à l'iodure de propidium (IP) selon les recommandations du kit *AlexaFluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa® Fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry* (Invitrogen). L'annexine V se lie spécifiquement aux phosphatidylsérines membranaires qui sont externalisées en cas d'apoptose précoce et tardive et l'iodure de propidium a la capacité de pénétrer dans les cellules mortes, témoin de l'apoptose tardive et de la nécrose.

Les cellules ont été trypsinées, lavées par le tampon PBS et centrifugées 5 minutes à 100 g. Le culot cellulaire a été resuspendu dans 500 μ L de tampon de liaison à l'annexine V 1x (dilution 5 fois du tampon 5X annexin-binding du kit composé de 50 mM HEPES, 700 mM NaCl, et 12.5 mM CaCl_2 à pH 7.4) puis les cellules ont été marquées en ajoutant 5 μ L d'AlexaFluor® 488 annexine V (solution dans 25 mM HEPES, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, 0.1% SAB (Serum Albumine Bovine)) et 1 μ L d'iodure de propidium à 100 μ g/mL. L'externalisation des phosphatidylsérines et la perméabilité des cellules à l'iodure de propidium (témoignant de l'apoptose précoce et tardive respectivement) ont été évaluées par cytométrie en flux en collectant 10 000 évènements par échantillon. Un exemple de résultat de cytométrie en flux est montré et commenté en Figure 36.

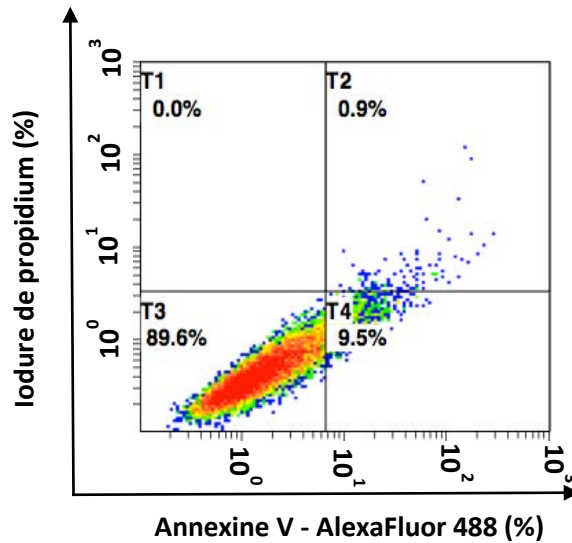


Figure 36. Illustration d'un résultat de cytométrie en flux suite au double marquage des cellules à l'annexine V et à l'iodure de propidium

Profil représentatif de 10 000 évènements par échantillons montrant le marquage des cellules à l'annexine V-AlexaFluor 488 (axe des abscisses) et à l'iodure de propidium IP (axe des ordonnées). Les cellules sont classées en fonction de leur réactivité vis-à-vis des ces deux composés : cellules saines (annexine V-, IP-, cadran en bas à gauche T3), cellules en apoptose précoce (annexine V+, IP-, cadran en bas à droite T4), cellules en apoptose tardive (annexine V+, IP+, cadran en haut à droite T2) et cellules en nécrose (annexine V-, IP+, cadran en haut à gauche T1).

B. Evaluation de la prolifération cellulaire

Les cellules MCF-7, MDA-MB-231 et SKBR3 ont été transfectées transitoirement par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou le vecteur vide et les cellules SKBR3 par le siRNA spécifique de la 3-OST3A ou le siRNA contrôle. Elles ont étéensemencées en plaques 24 puits à la densité cellulaire de 2×10^4 cellules par puits pour les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 et de 4×10^4 cellules par puits pour les cellules SKBR3. 24 heures après transfection les cellules ont été récoltées chaque jour pendant une période de 4 jours. La prolifération cellulaire a été évaluée en mesurant le contenu en ADN des cellules par spectrofluorimétrie sur l'appareil Qubit (Invitrogen) en utilisant le kit *Quant-iT dsDNA HS Assay* (Invitrogen). Le test de prolifération cellulaire a également été réalisé sur les cellules SKBR3 traitées avec 0, 20 et 40 $\mu\text{g/mL}$ de trastuzumab 24 heures après transfection et sur une période de 4 jours.

VIII. ETUDE DE L'APOPTOSE DES LES CELLULES MCF-7 SUITE À LA SUREXPRESSON DE LA 3-OST3A : MISE EN ÉVIDENCE ET EXPLORATION DES MÉCANISMES

La mise en évidence de l'apoptose des cellules MCF-7 a été préalablement mise en évidence, dans un premier temps, par cytométrie en flux selon la méthodologie décrite dans la partie VII-A.

A. Mise en évidence de l'apoptose des cellules MCF-7 suite à la surexpression de la 3-OST3A par la technique TUNEL

Les cellules MCF-7 ont été transfectées par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou le vecteur vide par électroporation selon les recommandations du fournisseur (kit V, Nucleofector™ Protocols, Lonza) et ensemencées en chambre Lab-Tek™ (Dutscher, France) à la densité de 2×10^4 cellules par puits. 48 heures après la transfection, les cellules ont été préparées pour le test TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick and labeling*) en suivant les recommandations du fournisseur (*Click-iT® TUNEL AlexaFluor® Imaging Assay*, Invitrogen) afin de détecter la fragmentation de l'ADN.

Les cellules ont été lavées au PBS et fixées par du *paraformaldéhyde* 4% (p/v) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec une solution à 0.25% (p/v) Triton-X 100 – PBS pendant 20 minutes à température ambiante, lavées deux fois avec de l'eau ultra pure avant de procéder à la réaction dite de TdT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*) permettant l'incorporation de nucléotides modifiés (Ethylnyl-dUTP (EdUTP)) sur l'extrémité 3'OH de l'ADN fragmenté (voir Figure 37). Les cellules ont été incubées avec le tampon de la réaction TdT pendant 10 minutes à température ambiante et ensuite avec le mélange de la réaction TdT contenant le tampon, le mélange de nucléotides EdUTP et l'enzyme TdT pendant 60 minutes à 37°C.

Les cellules ont été lavées deux fois avec une solution de SAB à 3% (p/v)– PBS pendant 5 minutes avant de procéder à la réaction chimique dite « click » qui correspond à l'attaque du groupement alcyne du résidu EdUTP précédemment incorporé par la fonction azide de l'AlexaFluor® 594 permettant l'incorporation du fluorophore (voir Figure 37). Les cellules ont alors été incubées avec la solution de la réaction *Click-iT* contenant l'AlexaFluor® 594 azide pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. En parallèle, un contrôle positif de fragmentation de l'ADN a été réalisé en utilisant la DNase I fournie dans le kit et mise au contact des cellules pendant 30 minutes.

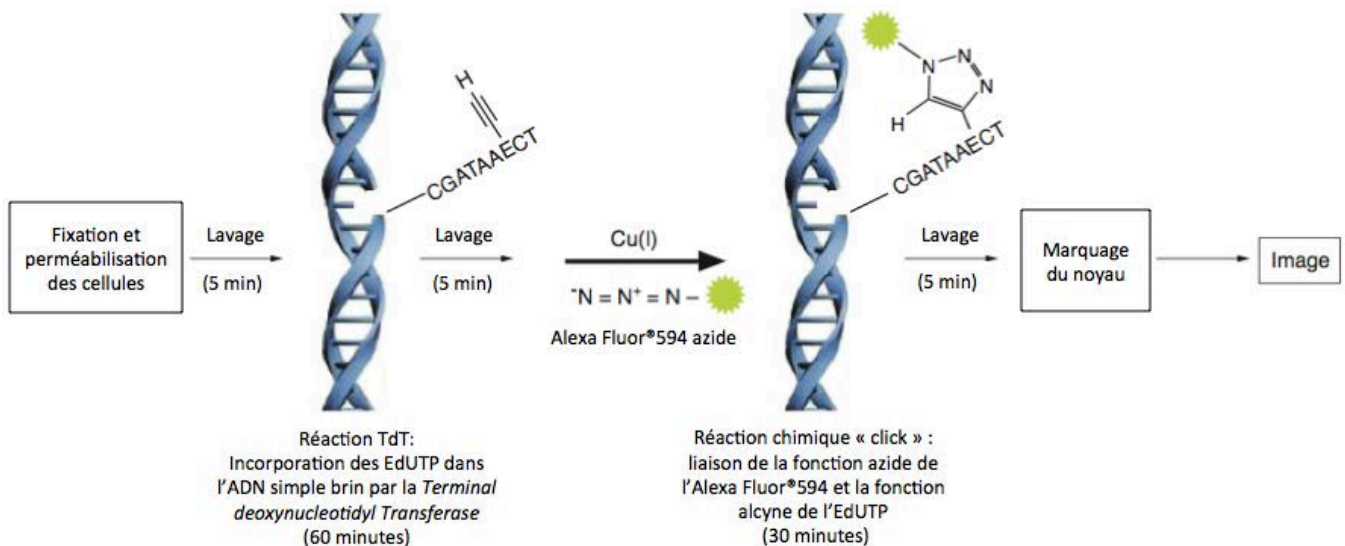


Figure 37. Détection de l'apoptose cellulaire par la technique TUNEL basée sur la réaction chimique "click"

La technique TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling*) permet de mettre en évidence l'apoptose des cellules. Elle se décompose en deux réactions : (i) la réaction TdT qui permet l'incorporation de nucléotides modifiés les EdUTP spécifiquement à l'extrémité 3'-OH de l'ADN fragmenté par l'action de l'enzyme *Terminal deoxynucleotidyl Transferase* (TdT) ; (ii) la réaction chimique « click » basée sur la réactivité de la fonction azide de l'Alexa Fluor® 594 azide et la fonction alcyne de l'EdUTP précédemment incorporé permettant la liaison et la détection du fluorophore spécifiquement au niveau de l'ADN fragmenté témoignant de l'apoptose des cellules.

Modifié d'après <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/apoptosis-protocol/tunel-protocols/click-it-tunel-alex-fluor-imaging-assay-protocol.html>

Finalement une détection de la fluorescence de l'Alexa Fluor ® 594 azide par microscopie confocale (sur l'appareil Leica TCS SP5-X-AOBS) a été réalisée afin de visualiser la fragmentation de l'ADN.

B. Étude de l'expression des protéines impliquées dans l'apoptose des cellules MCF-7 suite à la surexpression de la 3-OST3A par western blot

Les cellules MCF-7 ont été transfectées transitoirement par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou le vecteur vide et ensemencées en plaques 6 puits à la densité cellulaire de 1.5×10^5 cellules par puits. 48 heures après la transfection, les cellules ont été récoltées par grattage en ajoutant 100 μ L (par puits) de tampon de lyse qui contient un détergeant, le NP-40 (ThermoFischer) auquel est ajouté un mélange d'inhibiteur de protéases et de phosphatases (Roche). Les protéines du lysat cellulaire ont été dosées par la méthode de Bradford (Bradford,

1976). 20 µg de protéines ont été déposés sur gel d'acrylamide à 10% (p/v) et séparées par SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) en milieu dénaturant. Suite à la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Immobilon-P[®], Millipore) en milieu semi-sec au moyen de l'appareil de transfert Trans-Blot (Bio-Rad) sous un voltage constant de 12 V pendant une heure.

Après transfert, la membrane a été saturée dans une solution de 5% (p/v) lait-TBST (*Tris Buffered Saline-Tween 20*) puis hybridée en présence d'anticorps primaires, listés dans le Tableau 19, pendant une nuit sous agitation douce à 4°C. Après trois lavages successifs par du tampon TBST, la membrane a été hybridée avec l'anticorps secondaire de souris ou de lapin couplé à la peroxydase (*Cell Signaling Technology*) (Tableau 19) pendant une heure à température ambiante. Les protéines ont finalement été détectées par chimiluminescence (*Western blot detection kit*, Santa Cruz). L'intensité des bandes obtenues pour chaque échantillon a été quantifiée par le logiciel Image J (version 1.43).

Tableau 19. Anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'étude de l'expression des protéines impliquées dans l'apoptose des cellules MCF-7

Anticorps primaires et secondaires	Fournisseur	Source	Dilution
Poly ADP-ribose polymérase (PARP)	Cell Signaling Technology	lapin	1:1000
PARP Clivée (Asp214)	Cell Signaling Technology	lapin	1:1000
Bax (N-20)	Santa Cruz Biotechnology	lapin	1:500
Bcl-2 (C-2)	Santa Cruz Biotechnology	souris	1:200
Caspase 9 clivée (Asp315)	Cell Signaling Technology	lapin	1:1000
β-actine	Sigma-Aldrich	souris	1:3000
Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody	Cell Signalling Technology	cheval	1:2000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling Technology	chèvre	1:2000

IX. ETUDE DE L'EXPRESSION DU RÉCEPTEUR HER2 ET DE SA FORME PHOSPHORYLÉE PHOSPHO HER2 DANS LES CELLULES SKBR3

A. Méthodologie de l'étude

Les cellules SKBR3 ont été transfectées transitoirement par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou le vecteur vide et ensemencées en plaques 6 puits (pour l'analyse en Western-Blot) à la densité cellulaire de 1.5×10^5 cellules par puits ou en plaques Lab-Tek (pour l'analyse en microscopie confocale) à la densité cellulaire de 4×10^4 cellules par puits.

Les cellules ensemencées en plaques 6 puits ont été stimulées par les facteurs de croissance (méthodologie décrite en partie III-B-2, Tableau 14) ou cultivées en milieu complet. 48 heures après la transfection, les cellules ont été récoltées pour analyser l'expression protéique du récepteur HER2 et sa forme phosphorylée par Western Blot et pour étudier la localisation et l'expression des protéines par microscopie confocale. Le milieu de culture des cellules transfectées a été prélevé et utilisé pour réaliser des analyses de l'expression protéique en milieu conditionné.

B. Étude de l'influence de l'expression de la 3-OST3A sur l'expression du récepteur HER2 et sa forme phosphorylée (pHER2) dans les cellules SKBR3 par Western-Blot

Pour cette partie de l'étude, différentes conditions de culture et de traitement des cellules SKBR3 ont été mises en œuvre avant leur récolte pour effectuer une analyse de l'expression du récepteur HER2 et de sa forme phosphorylée. Ces conditions sont répertoriées dans le Tableau 20.

Tableau 20. Résumé des différentes conditions de culture et de traitements des cellules SKBR3 pour l'étude de l'expression du récepteur HER2 et sa forme phosphorylée (pHER2)

Conditions de culture des cellules SKBR3	Cellules cultivées en milieu complet à 10% (v/v) de SVF	Cellules stimulées par les facteurs de croissance HB-EGF ou FGF-7 (voir Tableau 14)	Cellules cultivées en milieu conditionné
Déroulement de l'expérimentation	<p>-J0 : transfection par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou le vecteur vide</p> <p>-J2 : récolte des cellules</p>	<p>-J0 : transfection par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou le vecteur vide</p> <p>-J1 : culture en milieu sans sérum</p> <p>-J2 : stimulation par les facteurs de croissance et récolte des cellules</p>	<p>-J0 : transfection par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou le vecteur vide</p> <p>-J2 : utilisation du surnageant de culture des cellules transfectées comme milieu de culture de cellules non transfectées pendant 10 et 20 minutes avant récolte des cellules</p>
Anticorps primaires utilisés	<p>Anti-HER2</p> <p>Anti-pHER2</p>	<p>Anti-pHER2</p>	<p>Anti-pHER2</p>
Anticorps secondaires utilisés	<p>Anti-lapin couplé à la peroxydase</p>	<p>Anti-lapin couplé à la peroxydase</p>	<p>Anti-lapin couplé à la peroxydase</p>

Les anticorps utilisés pour cette partie sont listés dans le Tableau 21.

Tableau 21. Anticorps utilisés pour l'étude de l'expression du récepteur HER2 et sa forme phosphorylée (pHER2) dans les cellules SKBR3

Anticorps primaires et secondaires	Fournisseur	Source	Dilution
HER2/ErbB2 (29D8)	Cell Signaling Technology	lapin	1 :1000
Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr1221/1222) (6B12)	Cell Signaling Technology	lapin	1:1000
β -actine	Sigma-Aldrich	souris	1:3000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling Technology	chèvre	1:2000

C. Étude de l'influence de l'expression de la 3-OST3A sur l'expression du récepteur HER2 dans les cellules SKBR3 par microscopie confocale

1. Fixation des cellules

48 heures après la transfection par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou le vecteur vide, les cellules SKBR3 ont été lavées par le PBS et fixées par du *paraformaldéhyde* 4% (p/v) pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec une solution de Triton-X 100 à 0.5% (p/v) – PBS pendant 10 minutes à température ambiante.

2. Immunomarquage du récepteur HER2

Après une étape de blocage dans une solution de SAB à 1% (p/v) - PBS, les cellules ont été incubées avec l'anticorps anti-HER2 (HER2, ErbB2 (29D8), *rabbit mAb*, *Cell Signaling Technology*) dilué au 1/200 dans un tampon 1% (p/v) SAB-PBS pendant 45 minutes sous agitation douce à température ambiante. Les cellules ont été lavées trois fois avec le PBS et incubées avec l'anticorps *AlexaFluor® 488 goat anti-rabbit* (Invitrogen) dilué au 1/200 dans un tampon 1% (p/v) SAB-PBS pendant 45 minutes sous agitation douce à température ambiante et finalement lavées trois fois avec le PBS.

3. Immunomarquage des cellules transfectées par la 3-OST3A-HA

Pour visualiser les cellules transfectées par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A, les cellules ont été incubées avec l'anticorps anti-HA (H9658, produit chez la souris, Sigma-Aldrich) dilué au 1/150 dans un tampon 1% (p/v) SAB-PBS pendant 45 minutes sous agitation douce à température ambiante et lavées trois fois avec le PBS. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps *AlexaFluor® 555 donkey anti-mouse* (Invitrogen) dilué au 1/200 dans un tampon 1% (p/v) SAB-PBS pendant 45 minutes sous agitation douce à température ambiante et lavées trois fois avec le PBS. Des contrôles négatifs ont été réalisés en incubant les cellules seulement avec l'anticorps secondaire.

4. Marquage du noyau cellulaire

Suite à l'étape de perméabilisation, les cellules ont été incubées avec le *TOPRO®-3 Iodide (642/661)* (Invitrogen) dilué au 1/1000 dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante et finalement lavées trois fois avec le PBS.

Finalement une détection de la fluorescence par microscopie confocale a été réalisée sur l'appareil Leica TCS SP5-X-AOBS afin de visualiser les cellules transfectées, le récepteur HER2 et le noyau.

X. INFLUENCE DE L'EXPRESSION DE LA 3-OST3A SUR LA FIXATION DU FGF-7 A SON RÉCEPTEUR ET SUR LA 3-O-SULFATATION GLOBALE DES CHAÎNES DE HS DANS LES CELLULES MCF-7 ET SKBR3

A. Mise en évidence de l'influence de l'expression de la 3-OST3A sur la fixation du FGF-7 à son récepteur sur les cellules MCF-7 et SKBR3 par immunomarquage

1. Préparation et traitement des cellules

Les cellules MCF-7 et SKBR3 ont été transfectées transitoirement par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A ou le vecteur vide et ensemencées en plaques Lab-Tek à la densité cellulaire de 2×10^4 et 4×10^4 cellules par puits respectivement. 24 heures après la transfection, les cellules ont été cultivées en milieu sans sérum pendant 24 heures avant d'être stimulées par du FGF-7 (R&D Systems) à 0.5 ng/mL pendant 30 minutes. Les cellules ont été lavées avec le PBS et fixées par du *para*formaldéhyde 4% (p/v) pendant 15 minutes à température ambiante.

2. Immunomarquage du FGF-7

Après une étape de blocage dans une solution de 1% (p/v) SAB-PBS, les cellules ont été incubées avec l'anticorps anti-FGF-7 (S20, Santa Cruz) dilué au 1/50 dans un tampon 1% (p/v) SAB-PBS pendant 45 minutes sous agitation douce à température ambiante. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois par le PBS et incubées avec l'anticorps *AlexaFluor*® 488 *goat anti-rabbit* (Invitrogen) dilué au 1/200 dans un tampon 1% (p/v) SAB-PBS pendant 45 minutes sous agitation douce à température ambiante et finalement lavées trois fois par le PBS. Des contrôles négatifs ont été réalisés en incubant les cellules seulement avec l'anticorps secondaire.

3. Marquage du noyau

Les cellules ont tout d'abord été perméabilisées avec une solution à 0.2% (p/v) SAB-PBS contenant 0.1% (p/v) de Triton-X 100 pendant 10 minutes à température ambiante puis lavées trois fois avec du PBS. Les cellules ont ensuite été incubées avec le marqueur fluorescent TOPRO®-3 Iodide (642/661) (Invitrogen) dilué au 1/1000 dans du PBS pendant 10 minutes à température ambiante et lavées trois fois au PBS.

Une détection de la fluorescence par microscopie confocale sur l'appareil Leica TCS SP5-X-AOBS a été réalisée afin de visualiser la présence du FGF-7 à la surface des cellules et le noyau cellulaire.

B. Mise en évidence de la l'influence de l'expression de la 3-OST3A sur la 3-O-sulfatation globale des chaînes de HS dans les cellules MCF-7 et SKBR3

1. Préparation et traitement des cellules

La méthodologie utilisée est présentée en partie X-A-1 à la différence près qu'ici les cellules ont été transfectées 48 heures en milieu complet avant leur lavage et fixation par le *paraformaldéhyde* 4% (p/v).

2. Immunomarquage de la 3-O-sulfatation globale des chaînes de HS

a) Immunomarquage des chaînes de GAGs 3-O-sulfatées avec l'anticorps anti-HS4C3V

Les cellules ont été incubées avec l'anticorps anti-HS4C3V (qui reconnaît spécifiquement les groupements 3-O-sulfates des chaînes de HS) dilué au 1/5 dans un tampon 0.1% (p/v) SAB-PBS pendant 1h30 sous agitation douce à température ambiante puis lavées trois fois avec le PBS. Cet anticorps porte l'étiquette VSV-G notée « V ».

b) Immunomarquage de l'anticorps anti-HS4C3V avec l'anticorps anti-Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein (VSV-G)

L'anticorps anti-VSV-G (V5507, produit chez la souris, Sigma Aldrich) reconnaît spécifiquement l'étiquette VSV-G portée par l'anticorps anti-HS4C3V.

Les cellules ont été incubées avec l'anticorps anti-VSV-G dilué au 1/200 dans un tampon 0.1% (p/v) SAB-PBS pendant une heure sous agitation douce à température ambiante puis lavées trois fois par le PBS.

c) Immunomarquage avec l'anticorps AlexaFluor® 488

Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps AlexaFluor® 488 *goat anti-mouse* (Invitrogen) dilué au 1/200 dans un tampon 0.1% (p/v) SAB-PBS pendant une heure sous agitation douce à température ambiante puis lavées trois fois par le PBS.

Des contrôles négatifs ont été systématiquement réalisés en incubant les cellules seulement avec l'anticorps secondaire.

3. Immunomarquage des cellules transfectées par la 3-OST3A-HA

Pour cette étape, les cellules ont été perméabilisées avec une solution de 0.5% (p/v) Triton-X 100 – PBS pendant 10 minutes à température ambiante avant de procéder à une étape de blocage permettant d'empêcher une fixation non spécifique des anticorps dans une solution de 1% (p/v) SAB-PBS pendant 10 minutes à température ambiante.

Pour visualiser les cellules transfectées par le plasmide pcDNA3.1(+)-3-OST3A, les cellules ont été incubées avec l'anticorps anti-HA (H6908, Sigma-Aldrich) dilué au 1/150 dans un tampon 1% (p/v) SAB-PBS pendant 45 minutes sous agitation douce à température ambiante et lavées trois fois par le PBS. Les cellules ont ensuite été incubées avec l'anticorps AlexaFluor® 555 *goat anti-rabbit* (Invitrogen) dilué au 1/200 dans un tampon 1% (p/v) SAB-PBS pendant 45 minutes sous agitation douce à température ambiante et lavées trois fois par le PBS. Des contrôles négatifs ont été réalisés en incubant les cellules seulement avec l'anticorps secondaire.

4. Marquage du noyau cellulaire

La méthodologie utilisée est présentée en partie X-A-3.

Finalement une détection de la fluorescence par microscopie confocale sur l'appareil Leica TCS SP5-X-AOBS a été réalisée afin de visualiser en même temps les chaînes de HS 3-*O*-sulfatés, la 3-OST3A-HA surexprimée par les cellules transfectées et le noyau cellulaire.

XI. ANALYSES STATISTIQUES

Tous les résultats présentés sont issus d'au moins trois expériences indépendantes réalisées en triplicat. Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test de Student (*Student t-test*). Une valeur de $p < 0.05$ a été considérée comme statistiquement significative.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

I. PARTIE 1 : L'HÉPARANE SULFATE 3-O-SULFOTRANSFÉRASE 3A (3-OST3A) : UN NOUVEAU RÉGULATEUR TUMORAL ET UN MARQUEUR PRONOSTIQUE DANS LE CANCER DU SEIN

A. Publication

« The heparan sulfate sulfotransferase 3-OST3A (HS3ST3A) is a novel tumor regulator and a prognostic marker in breast cancer »

X Mao^{1,2,8}, C Gauche^{1,8}, MWH Coughtrie^{3,4,9}, C Bui¹, S Gulberti¹, F Merhi-Soussi¹, N Ramalanjaona¹, I Bertin-Jung¹, A Diot³, D Dumas^{1,5}, N De Freitas Caires⁶, AM Thompson⁷, J-C Bourdon^{3,9}, M Ouzzine^{1,9} and S Fournel-Gigleux^{1,9}

Authors' Affiliations:

¹UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine (IMoPA), MolCelTEG Team and Glyco-Fluo platform, Biopôle, Campus Biologie-Santé, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France; ²Laboratory of Experimental Cancer Research, Luxembourg Institute of Health, Luxembourg, UK; ³Division of Cancer Research, Medical Research Institute, University of Dundee, Dundee, UK; ⁴Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada; ⁵Cellular and Tissular Core Imaging Facility, PTIBC IBISA Nancy, Vandoeuvre-lès-Nancy, France; ⁶INSERM U1019E11, Lille, France and ⁷MD Anderson Cancer Center, University of Texas, Houston, TX, USA.

Correspondence: Dr S Fournel-Gigleux, UMR 7365 CNRS-Université de Lorraine (IMoPA), MolCelTEG Team, Biopôle, Campus Biologie-Santé, Faculté de Médecine, Université de Lorraine, CS 50184, Vandoeuvre-les-Nancy 54505, Lorraine, France.

E-mail: sylvie.fournel-gigleux@univ-lorraine.fr

⁸These authors contributed equally to this work.

⁹These authors contributed equally to this work as group leaders.

Received 26 August 2015; revised 16 December 2015; accepted 19 January 2016

ABSTRACT

Heparan sulfate (HS) proteoglycan chains are key components of the breast tumor microenvironment that critically influence the behavior of cancer cells. It is established that abnormal synthesis and processing of HS play a prominent role in tumorigenesis, albeit mechanisms remain mostly obscure. HS function is mainly controlled by sulfotransferases, and here we report a novel cellular and pathophysiological significance for the 3-O-sulfotransferase 3-OST3A (HS3ST3A), catalyzing the final maturation step of HS, in breast cancer. We show that 3-OST3A is epigenetically repressed in all breast cancer cell lines of a panel representative of distinct molecular subgroups, except in human epidermal growth factor receptor 2-positive (HER2+) sloan-kettering breast cancer (SKBR3) cells. Epigenetic mechanisms involved both DNA methylation and histone modifications, producing different repressive chromatin environments depending on the cell molecular signature. Gain and loss of function experiments by cDNA and siRNA transfection revealed profound effects of 3-OST3A expression on cell behavior including apoptosis, proliferation, response to trastuzumab *in vitro* and tumor growth in xenografted mice. 3-OST3A exerted dual activities acting as tumor-suppressor in lumA-michigan cancer foundation (MCF)-7 and triple negative-MD Anderson (MDA) metastatic breast (MB)-231 cells, or as an oncogenic factor in HER2+-SKBR3 cells. Mechanistically, fluorescence-resonance energy transfer-fluorescence-lifetime imaging microscopy experiments indicated that the effects of 3-OST3A in MCF-7 cells were mediated by altered interactions between HS and fibroblast growth factor-7 (FGF-7). Further, this interplay between HS and FGF-7 modulated downstream ERK, AKT and p38 cascades, suggesting that altering 3-O-sulfation affects FGFR2IIIb-mediated signaling. Corroborating our cellular data, a clinical study conducted in a cohort of breast cancer patients uncovered that, in HER2+ patients, high level expression of 3-OST3A in tumors was associated with reduced relapse-free survival. Our findings define 3-OST3A as a novel regulator of breast cancer pathogenicity, displaying tumor-suppressive or oncogenic activities in a cell- and tumor-dependent context, and demonstrate the clinical value of the HS-O-sulfotransferase3-OST3A as a prognostic marker in HER2+ patients.

Key words: Heparan sulfate synthesis, sulfotransferase, epigenetic, breast cancer, biomarker

INTRODUCTION

Heparan sulfate proteoglycans (HSPG) are integral components of extracellular matrices and cell plasma membranes. They are key determinants of the relationships cells have with each other and with their microenvironment, and their role in cancer biology is increasingly recognized.¹ HS glycosaminoglycan chains of cell surface PG, strategically located at the cell-matrix interface, act as co-receptors for numerous signal transduction pathways. HS are composed of uronic acid and *N*-acetylglucosamine repeating disaccharide units covalently attached to the core protein of PG through a tetrasaccharide linkage region.² During biosynthesis, HS are subjected to marked structural modifications - mainly epimerization, *N*-deacetylation, *N*- and *O*-sulfation, catalyzed by numerous enzymes, including HS-*O*-sulfotransferases.^{3,4} The range of biological functions of HS ultimately depends on the fine structure of their polysaccharide chain. The 3-*O*-sulfotransferases (3-OST) form the largest multigene family of HS modifying enzymes with seven different isoforms, catalyzing *O*-sulfation at position 3 of glucosamine (GlcN) residues to produce at least two functionally distinct 3-*O*-sulfated motifs. Importantly, this relatively rare modification completes the fine-tuning of HSPG and is responsible for highly specific HS activities.⁵ The best characterized is the anticoagulant property of the 3-*O*-sulfated anti-thrombin binding motif, primarily generated by the 3-OST1 isoform. Although it is mostly documented that 3-OST3A generates receptors for *Herpes simplex* virus type-1 (HSV-1) entry⁶, other likely biological functions, such as regulation of growth factors and their tyrosine kinase receptors signaling remain to be explored.

HSPG are critical effectors of several hallmarks of cancer biology.⁷ In tumor cells, genes involved in the biosynthesis of HSPG are frequently dysregulated. The upregulation of cell-surface HSPG glypican-1 and syndecan-1 has been described in malignant breast cancer tissue⁸, whilst depletion of the extracellular sulfatase Sulf-1 was reported.⁹ Disruption of HS biosynthetic enzymes results in changes in HS fine structure that critically affect cell-matrix interactions, cell signaling and tumor cell behavior, including proliferation, adhesion, migration and apoptosis through interplay of complex mechanisms.¹⁰

Recent studies highlight an aberrant modulation of 3-*OST* gene expression through epigenetic mechanisms in various tumors including breast, lung, brain, pancreatic, skin and colorectal cancers, suggesting an important role in these pathological conditions.^{11,12} However, these reports reveal either anti-oncogenic or tumor-promoting effects, and the mechanisms and consequences of 3-*OST* dysregulation in the cancer process are thus not well

understood.^{13,14} We recently showed that epigenetic repression of *3-OST* genes in chondrosarcoma cells leads to altered HSPG sulfation, and demonstrated tumor-suppressive properties of 3-*O*-sulfation in chondrosarcoma cells.¹⁵

Identification of the molecular mechanisms underlying the role of HS-modifying enzymes in breast cancer may open new windows for the design of personalized therapies to overcome drug failure and for the discovery of new biomarkers. Here, we demonstrate a critical role of 3-OST3A in specific breast cancer subtypes. We showed epigenetic repression of 3-OST3A in several breast cancer cell lines, and demonstrated its impact on cancer cell behavior by gain and loss of function approaches. Importantly, we examined the influence of 3-OST3A expression on clinical outcome in a cohort of breast cancer patients. Our study identifies the HS-sulfotransferase 3-OST3A as a novel tumor regulator exerting either tumor-suppressive or oncogenic properties in a cell-dependent context, and demonstrates its potential clinical value as a prognostic marker in HER2+ breast cancer patients enabling stratification of patients for treatment.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture, drug treatment and transfection

Human breast cancer cell lines SKBR3, BT-474, T-47D, MDA-MB-231, MDA-MB-453 and MDA-MB-468 representative of distinct molecular subgroups (Table S1) and the immortalized breast epithelial cell line MCF-10A were from the American Type Culture Collection (ATCC). The MCF-7 cell line was from the European Collection of Cell Cultures (ECACC). Detailed culture conditions and treatment by Aza and TSA are described in Supplementary Materials. Cell lines were transiently or stably transfected with pcDNA3.1(+)-3-OST3A-hemagglutinin (HA) or the pcDNA3.1(+) plasmid^{15,44} and 3-OST3A expression was analyzed by immunoblotting using anti-HA antibodies (Table S7). 3-OST3A siRNAs (Eurogentec, Table S8) and a negative control (Qiagen) were transfected as in Supplementary Materials. siRNA efficacy was verified by RT-qPCR and protein analysis.

RT-qPCR analysis

Total RNA was extracted and purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen) for cultured cells and the QIAzol Lysis reagent (Qiagen) for tumor samples. mRNA level was quantified by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method using primers listed in Supplementary Table S9.

CpG island identification, methylation analysis and chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay

Genomic DNA was purified using the GenomicPrepDNA isolation kit (GE Healthcare). The presence of a canonical CpG island in the proximal promoter region (5') and first exon (3') of *3-OST3A* gene was determined using MethPrimer software. The methylation status of two regions was analyzed by bisulfite sequencing¹⁵ using sense and antisense primers for nested-PCR (Table S10). PCR products subcloned into TOPO-TA[®] vector (Invitrogen) were sequenced in at least three clones. ChIP assay was performed using the Low Cell# ChIP kit (Diagenode) using antibodies and PCR primers described in Supplementary Tables S11 and S12, respectively.

Protein analysis

Immunoblot following SDS-PAGE analysis of cell lysate proteins was performed using primary and secondary antibodies listed in Supplementary Table S7.

FGF-7 cell-surface binding assays

Cells cultured in Lab-Tek chambers (Thermo-Scientific) or 6-well plates were serum-starved and incubated with recombinant human FGF-7 (0.5 ng/mL) for 30 min. Cells were immunostained for FGF-7 and HS expression using antibodies (Supplementary Table S7) prior to confocal laser scanning microscopy. Alternatively, following immunostaining, cells were fixed in 4% (w/v) *para*formaldehyde prior to flow cytometry (Gallios, Beckman Coulter, Beckman Coulter Genomix, Essex, UK).

FLIM-based FRET Assay

For the image series and spectra measurements, a Leica TCS SP5-X-AOBS microscope equipped with an acousto-optical beamsplitter and WLL lasers was used with a $\times 40/0.8$ water immersion objective. Temporal histogram depicting the AlexaFluor 488 fluorescence lifetime was obtained by a biexponential fit of the fluorescence decay. The decay analysis by time-correlated single photon counting was performed using the SPCImage software (Becker&Hickl GmbH, Berlin, Germany).

Cell apoptosis assays

After transient transfection with empty vector or with 3-OST3A-HA cDNA and with siRNA control or siRNA 3-OST3A in the case of SKBR3 cells for 48 h, cells were stained

with AlexaFluor 488-conjugated annexin V and propidium iodide (PI) dyes (Invitrogen). The externalization of phosphatidylserine (PS) and the permeability to PI were evaluated by flow cytometry. A TUNEL test was also performed on MCF-7 cells transfected with empty vector or with 3-OST3A-HA cDNA.

Cell proliferation assay

Twenty four hours after transfection with 3-OST3A-HA cDNA, and with siRNA 3-OST3A and corresponding controls, MCF-7, MDA-MB-231 and SKBR3 cells were harvested each day during a 4-day period and cell proliferation was evaluated by measuring DNA content. Cell proliferation was also assessed 2 days following transient transfection in SKBR3 cells treated with 0, 20 and 40 µg/mL trastuzumab kindly provided by Dr. Catherine Vallance (Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandoeuvre-les-Nancy, France).

In vivo mouse xenograft tumor model

Experiments were performed in 6-week-old female severe combined immunodeficient (SCID) mice. MCF-7 cells stably expressing 3-OST3A-HA or transfected with pcDNA empty vector were subcutaneously implanted into the animals. 5×10^6 cells were injected into each mouse (four mice/group for each independent experiment). The tumor growth was assessed weekly using a Vernier caliper. The experiment was conducted twice using two different engineered MCF-7 cell lines denominated 3-OST3A-A and -B, and pcDNA-A and -B, respectively.

Breast tumor sample analyses

3-OST3A mRNA expression was analyzed in a cohort of 117 primary breast tumors collected at Ninewells Hospital, Dundee, UK from Caucasian women with no previous treatment or operation (Tayside Tissue Bank (TTB), Dundee, UK). Informed consent was obtained from all patients and ethical approval was received from TTB (REC Reference: 07/S1402/90) under delegated authority from the Local Research Ethics Committee. Breast cancer overall survival (overall survival) and breast cancer-specific disease free survival (disease free survival or cancer recurrence) were considered. Non-breast cancer deaths (women died from other causes than breast cancer) were censored. The characterization of classical molecular markers was conducted as previously described.⁴⁵ Histological tumor grade was according to Bloom et al.⁴⁶, ER status according to Quickscore method⁴⁷ and HER2+ scoring according to Purdie et al.⁴⁸

Statistical analysis

Data were analyzed using Prism software (GraphPad, San Diego, CA) and are expressed as mean \pm SEM of two replicates in at least three independent experiments. One-way ANOVA and Tukey's post-hoc test were used for analysis of data from cell proliferation and FLIM assays. Two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc tests were used to calculate differences in tumor growth. Paired Student's *t* test was used to calculate *P* values for all other experiments. *P* value <0.05 was considered significant.

Statistical univariate analyses (Kaplan-Meier and Log Rank test) of clinical data were performed using SPSS software (SPSS, version 21.0) followed by multivariate analyses of Cox's proportional hazards regression model (CR) with associated Hazard Ratios (HR) utilizing the backwards step-wise elimination method.

Experimental Procedures are detailed in the Supplementary Materials and Methods section.

RESULTS

3-OST3A is differentially repressed in breast cancer cell lines *via* epigenetic mechanisms

Prompted by studies from us and others pointing to an epigenetic control of *3-OST* genes^{11,15}, we determined whether *3-OST3A* was regulated epigenetically in breast cancer cells. *3-OST3A* expression analysis in a panel of cell lines representative of distinct molecular subgroups of breast cancer (luminal-A [lumA]: ER+ PR+ HER2-; luminal-B [lumB]: ER+ PR+/- HER2+/-; HER2+: ER- PR- HER2+; triple-negative [TN]: ER- PR- HER2-¹⁶, Supplementary Table S1) revealed very low mRNA level in BT-474, T-47D and MD Anderson (MDA)-derived cells, and reduced expression in lumA-michigan cancer foundation (MCF)-7 cells compared with the non-tumorigenic epithelial-derived MCF-10A cells (Figure 1a). The highest expression level was for HER2+ sloan-kettering breast cancer (SKBR3) cells.

DNA methylation analysis of the *3-OST3A* promoter CpG island (Supplementary Figure S1A) showed strong hypermethylation in T-47D and MDA-derived cells, while in MCF-7 cells, hypermethylation only occurred downstream from the TSS (Figure 1b). In contrast, *3-OST3A* was not subject to DNA methylation in SKBR3 and MCF-10A cells (Figure 1b and Supplementary S1B). We established further a link between *3-OST3A* hypermethylation and gene expression by treating the MCF-7 and MDA-MB-231 cells with 5-aza-2'-deoxycytidine (Aza, DNAmethyltransferase (DNMT) inhibitor) and trichostatin A (TSA, histone deacetylase (HDAC) inhibitor). In MCF-7 cells, Aza and TSA alone markedly increased *3-OST3A*

mRNA level (Figure 1c), while no additive effect was observed upon combined treatment. Conversely in MDA-MB-231 cells, neither Aza nor TSA independently produced a significant effect, whereas combined treatment increased expression, suggestive of a cooperative action between histone deacetylation and DNA methylation (Figure 1c).

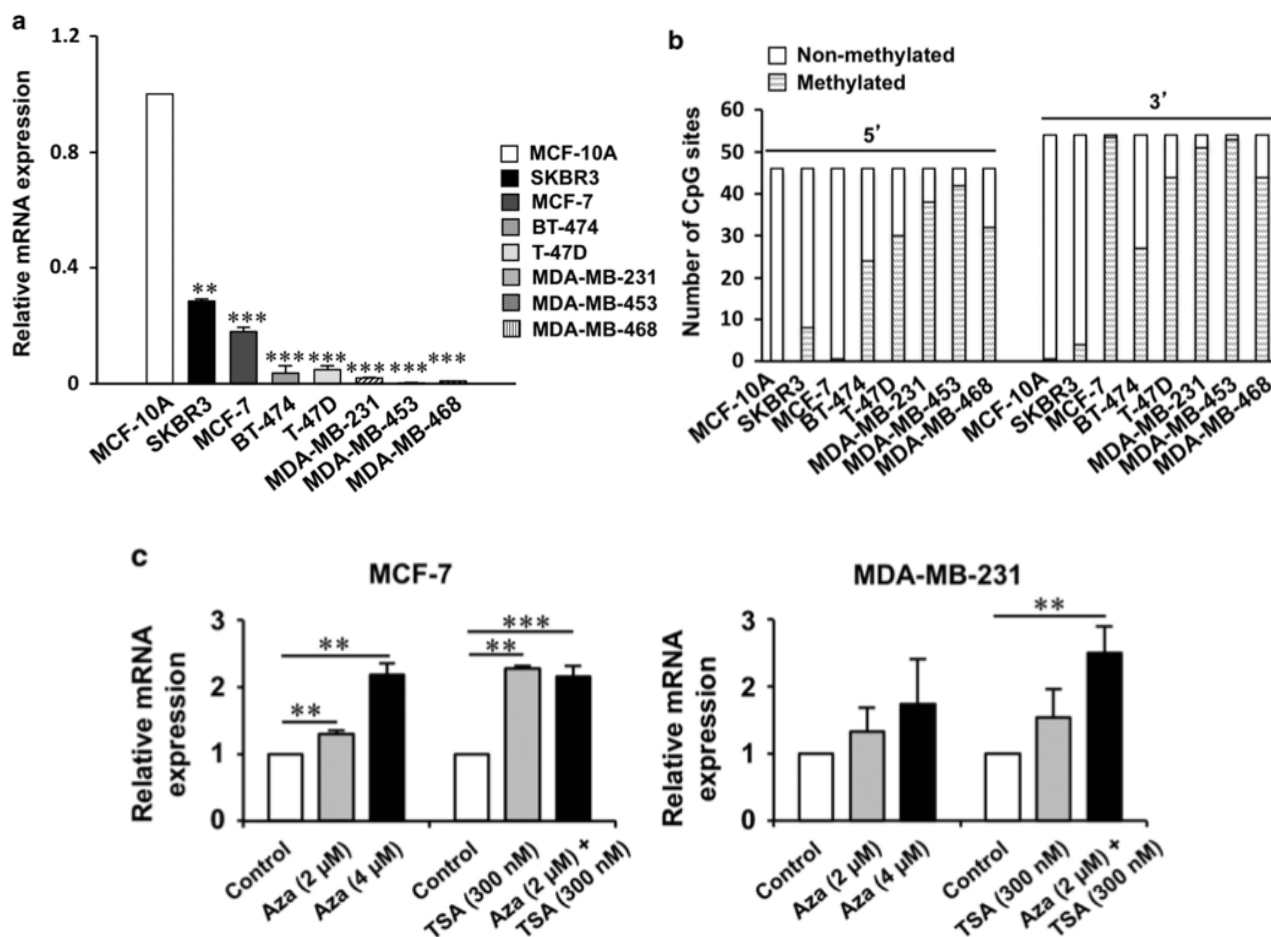


Figure 1. 3-OST3A gene expression is regulated by DNA methylation and histone deacetylation in breast cancer cells. (a) 3-OST3A mRNA expression level is differentially repressed in breast cancer cell lines representative of different subtypes of tumors. RT-qPCR was performed using gene-specific primers, Expression level was normalized to *RP29*, and mRNA level in breast cancer cell lines is expressed relative to MCF-10A control cells (set to 1). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$. (b) The methylation profile of the proximal promoter region (5') and first exon (3') of 3-OST3A shows hypermethylation in all cell lines but SKBR3. The number of methylated and non-methylated sites in the regions of interest (shown in Supplementary Figure S1) is indicated by hatched and empty bars, respectively. Results are the mean from sequencing data of at least three independent clones. (c) Effect of the DNAmethyltransferase inhibitor Aza, and of the histone deacetylase inhibitor TSA on 3-OST3A mRNA expression level indicate epigenetic mechanisms involving DNA methylation and histone deacetylation. MCF-7 (left panel) or MDA-MB-231 cells (right panel) were treated with Aza or TSA alone, or with both drugs. RT-qPCR was performed as described in panel A. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 3$.

To provide insight into the differential regulation of 3-OST3A in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, representative of the lumA and TN subtype, respectively, we analyzed several epigenetic marks at the 3-OST3A promoter. We first evaluated the abundance of DNMT3A and 3B isoforms, and of DNMT1 involved in *de novo* and maintenance of DNA methylation, respectively (Figure 2a). We next examined several Polycomb group (PcG) proteins that form large complexes generally associated with CpG island promoters and cause closure of local chromatin mainly by affecting histone modifications¹⁷. We investigated here enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) that trimethylates Lys27 of histone 3 (H3K27me3) and is associated with the suppressor of zeste 12 (SUZ12) protein to form part of Polycomb repressive complex PRC2. To further investigate the crosstalk between DNA methylation and histone modifications, the methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) that recruits histone deacetylases (HDACs) to the methylated regions¹⁸ as well as Sin3A that functions as a corepressor complex with HDACs and MeCP2¹⁹ were investigated. In MCF-7 cells, enrichment in DNMT3B (Figure 2b) was associated with a strong increase in the repressive H3K27me3, but not in the other repressive trimethylated Lys9 of histone 3 (H3K9me3, Figure 2C) histone mark. As expected, a decrease in the active mark trimethylated Lys4 of histone 3 (H3K4me3) was observed compared to MCF-10A (Figure 2c).

In MDA-MB-231, a strong increase in abundance of DNMT1 and DNMT3A was associated with the presence of repressive H3K9me3 and H3K27me3 and with the depletion of H3K4me3 (Figure 2b and 2c). As expected, in MCF-10A cells H3K4me3 was abundant and H3K9me3 and H3K27me3 absent (Figure 2c). Interestingly, although 3-OST3A regulation in SKBR3 cells does not involve DNA methylation, ChIP analysis suggested that it could involve histone modifications (data not shown). The histone H3K27 methyltransferase EZH2 was abundantly associated with the 3-OST3A gene in MDA-MB-231 whereas it was less recruited in MCF-7 cells, while SUZ12 was present at low levels (Figure 2d). These data suggest that proteins of the PRC2 complex mediate 3-OST3A gene repression in combination with DNMT3B in MCF-7 cells, and with DNMT1 and 3A in MDA-MB-231. Investigation of the crosstalk between DNA methylation and histone modifications showed that in MCF-7 cells the recruitment of HDAC1 did not require MeCP2 (Figure 2e), in agreement with the observation that Aza and TSA derepressed the promoter independently. Conversely in MDA-MB-231 cells, MeCP2, HDAC1 and Sin3A were enriched at the 3-OST3A locus (Figure 2E). Such repressive environment might explain why treatment with both deacetylation and methylation inhibitors is required to reactivate 3-OST3A expression in the latter cells. The distinct repressive complexes in the two cell lines are schematically depicted in Figure 2f.

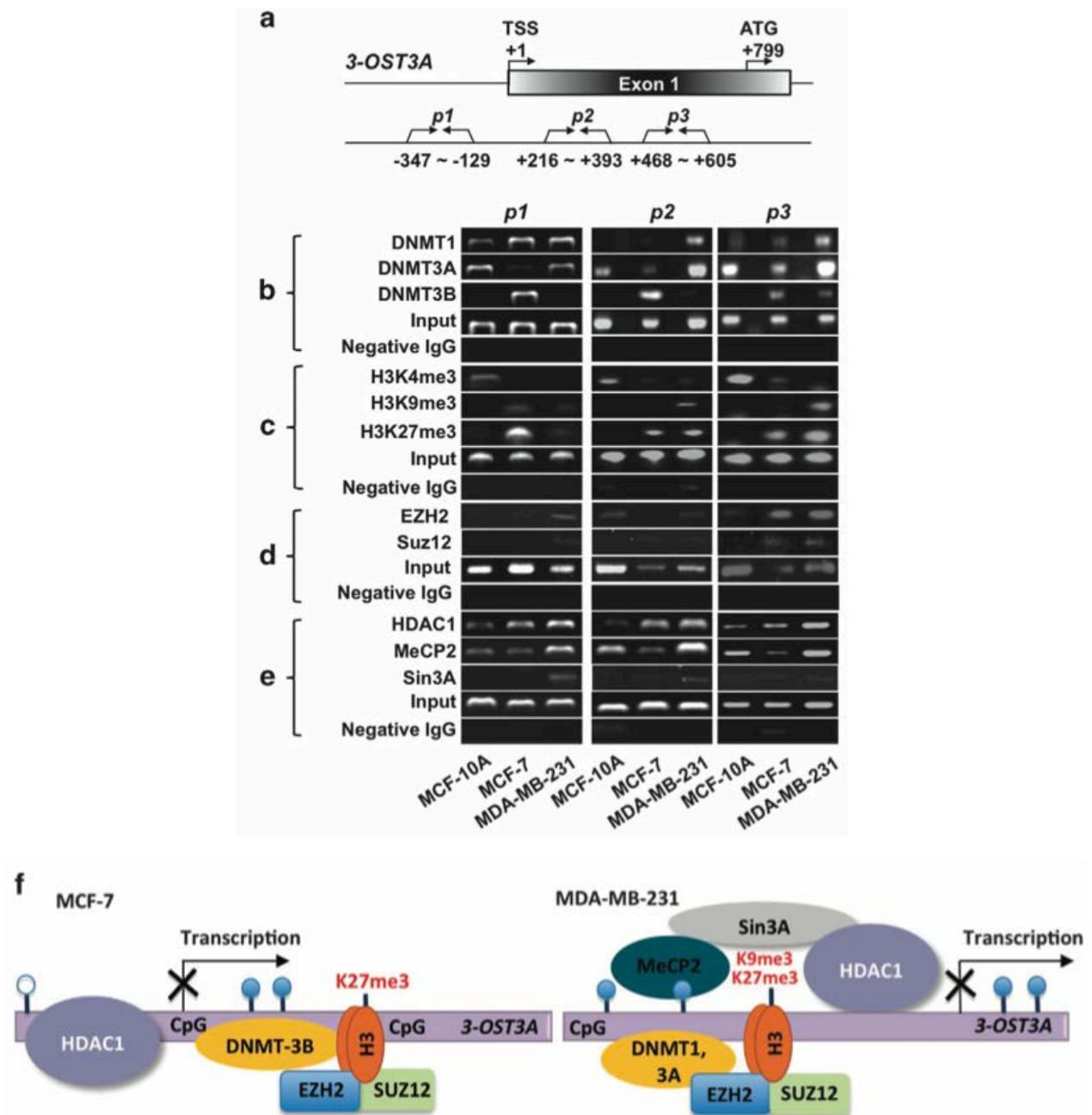


Figure 2. Distinct epigenetic marks are associated with the 3-OST3A gene in breast cancer cells. (a) A representative map of the 3-OST3A gene with ChIP-PCR primers indicated below. Three sets of primers (p1–p3) covering the CpG island of the 3-OST3A gene were used for PCR amplification. Location to TSS, p1: –347 to –129; p2: +216 to +393; p3: +468 to +605. Amount of (b) DNMT isoforms, (c) H3K4me3, H3K9me3 and H3K27me3 marks, (d) EZH2 and SUZ12 of PRC2 complex, (e) HDAC1, MeCP2 and Sin3A recruited at the 3-OST3A gene using specific antibodies was compared with input (about 2% total chromatin) and IgG negative control in MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-231 cells. (f) Schematic representation of chromatin regulators at the 3-OST3A gene. In MCF-7 cells, DNMT3B, EZH2 and H3K27me3 mediates moderate transcriptional repression independently from MeCP2 and HDAC1, while in MDA-MB-231, DNMTs are closely connected to HDAC1 via MeCP2 and Sin3A in a strong repressive complex.

3-OST3A exerts tumor-suppressive or pro-oncogenic effects depending on tumor cell phenotype and influences response to trastuzumab

Having demonstrated different expression level and epigenetic behavior in lumA-MCF-7, TN-MDA-MB-231, and HER2+-SKBR3 cells, we next interrogated the functional impact of 3-OST3A expression in these cell lines by gain and loss of function experiments. Overexpression moderately reduced cell growth rate in MCF-7 cells and completely inhibited cell proliferation in MDA-MB-231 cells (Figure 3a). Importantly, in SKBR3 cells, 3-OST3A expression produced the opposite effect, enhancing proliferation, whereas its knockdown by siRNA transfection consistently reduced cell growth (Figure 3a). These data emphasize the cell-context dependent outcome of HS 3-*O*-sulfation upon 3-OST3A overexpression or silencing, that we observed in immunofluorescence staining experiments using specific HS4C3 antibodies²⁰ (data not shown). A cornerstone of HER2 therapeutic strategies involves the use of a humanized monoclonal anti-HER2 antibody (trastuzumab) leading us to analyze the influence of 3-OST3A expression on HER2+-SKBR3 drug response. Significantly, trastuzumab exerted a stronger antiproliferative effect in 3-OST3A-expressing than in vector-transfected cells, whereas its influence was abrogated following 3-OST3A siRNA knockdown (Figure 3b), indicating that 3-OST3A not only acts as a tumor regulator but also modulates anticancer drug sensitivity.

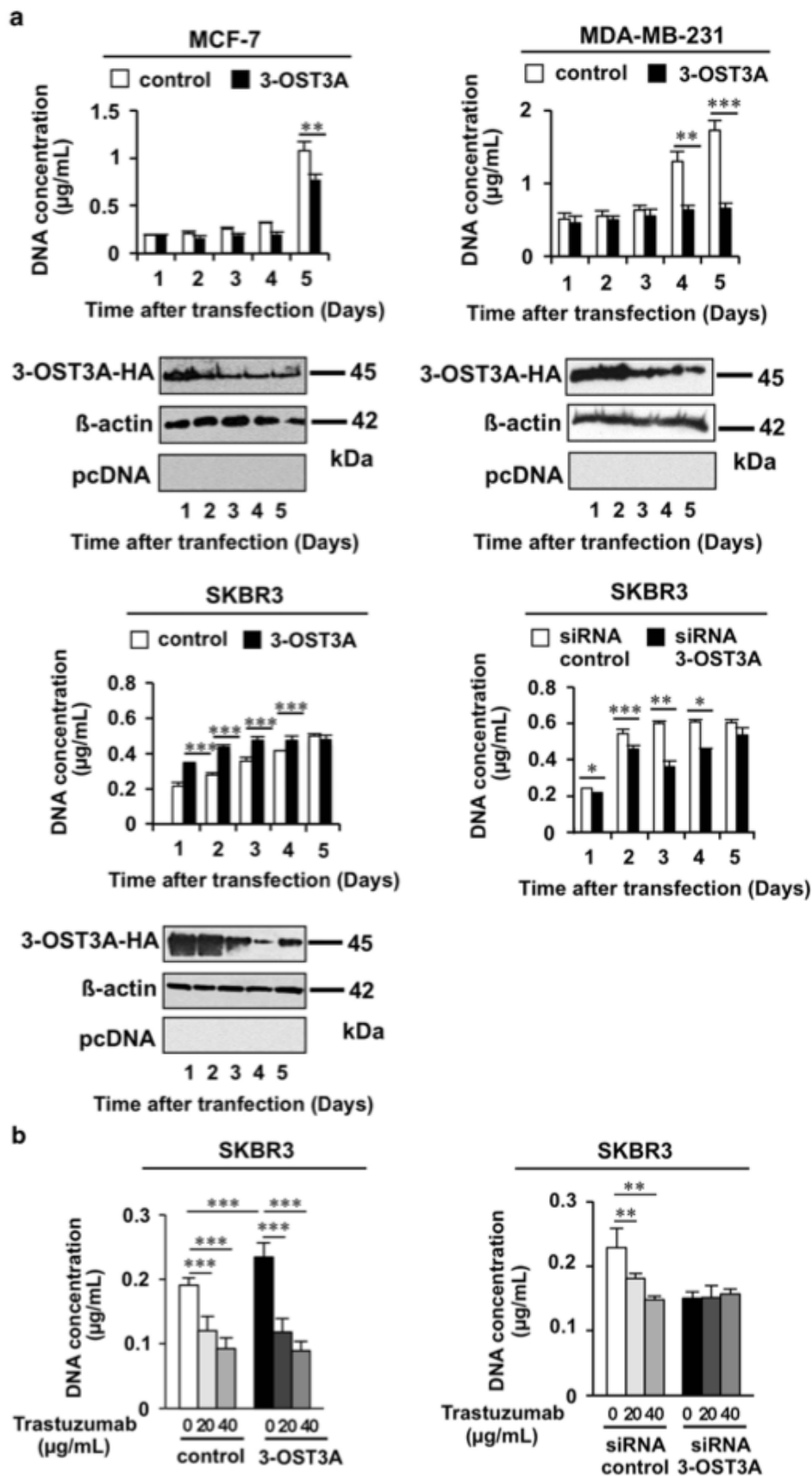
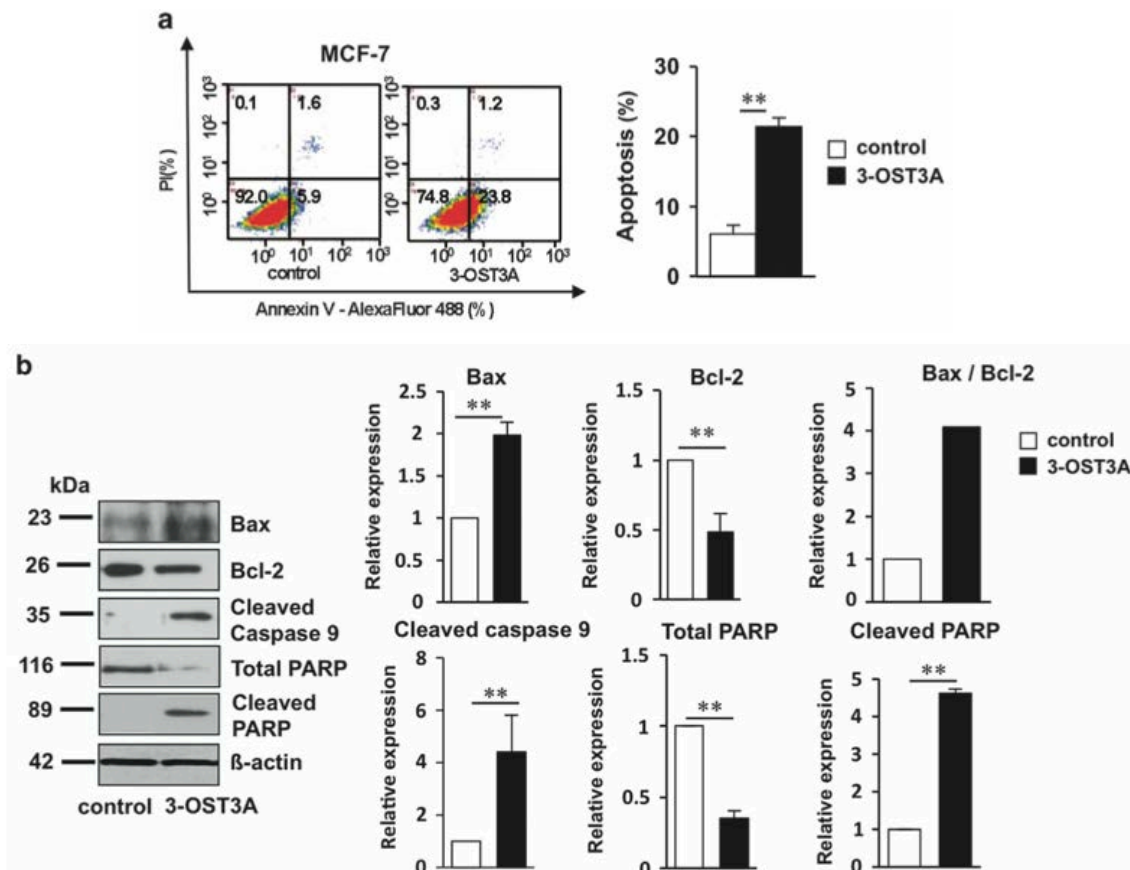


Figure 3. 3- OST3A expression or silencing produces contrasting effects on cell proliferation in different breast cancer cells. (a) Cell proliferation assessed in breast cancer cell lines 1–5 days following transient transfection with empty pcDNA vector (control) or 3- OST3A-HA cDNA (3-OST3A) was reduced in MCF-7 and MDA-MB-231 but enhanced in SKBR3 cells. 3-OST3A expression was monitored by immunoblot analysis using anti-HA antibodies (shown below histograms). SKBR3 cells transfected with siRNA control or 3-OST3A siRNA showed reduced cell growth in depleted cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 4$. (b) Cell growth rate was assessed 2 days following transient transfection with 3- OST3A-HA cDNA, siRNA and corresponding controls in SKBR3 cells, as in panel A, and treated with 0, 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ trastuzumab. The antiproliferative effect of trastuzumab was enhanced upon 3-OST3A expression, whereas it was suppressed in SKBR3-depleted cells. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, $n = 4$.

Analysis of apoptosis using Annexin V staining showed that 3-OST3A expression was pro-apoptotic in MCF-7 cells (Figure 4a), but not in MDA-MB-231 and SKBR3 cells (Supplementary Figure S2). Further investigation of the cell survival mechanisms in MCF-7 cells showed enhanced expression of the pro-apoptotic protein Bax and decreased expression of the anti-apoptotic Bcl-2 (Figure 4b). 3-OST3A also activated caspase-mediated apoptosis, producing an increase in cleaved caspase 9 and in the proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) (Figure 4b). This was accompanied by DNA fragmentation, as shown by a TUNEL assay (Figure 4c). These lines of evidence indicating that 3-OST3A expression results in reduced cell growth and promotes cell survival in MCF-7 cells prompted us to investigate its effect in xenografted mice.

Severe combined immunodeficient mice were transplanted with genetically engineered MCF-7-3-OST3A cell lines in two separate experiments (Figure 4d). A clear trend towards reduced tumor size was observed in mice implanted with MCF-7-3-OST3A-A cells compared with empty vector-transfected cells, reaching significance at 6 and 12 weeks (Figure 4e, and Supplementary S3A). Moreover, MCF-7-3-OST3A-B cells exhibited retarded tumor progression from 8 to 18 weeks following implantation (Figure 4f and Supplementary S3B). Together, these *in vivo* experiments provide strong supporting evidence for the 3-OST3A pro-apoptotic and antiproliferative properties observed *in vitro*, indicating that 3-OST3A acts as a tumor-suppressor in a model of lumA breast tumors.



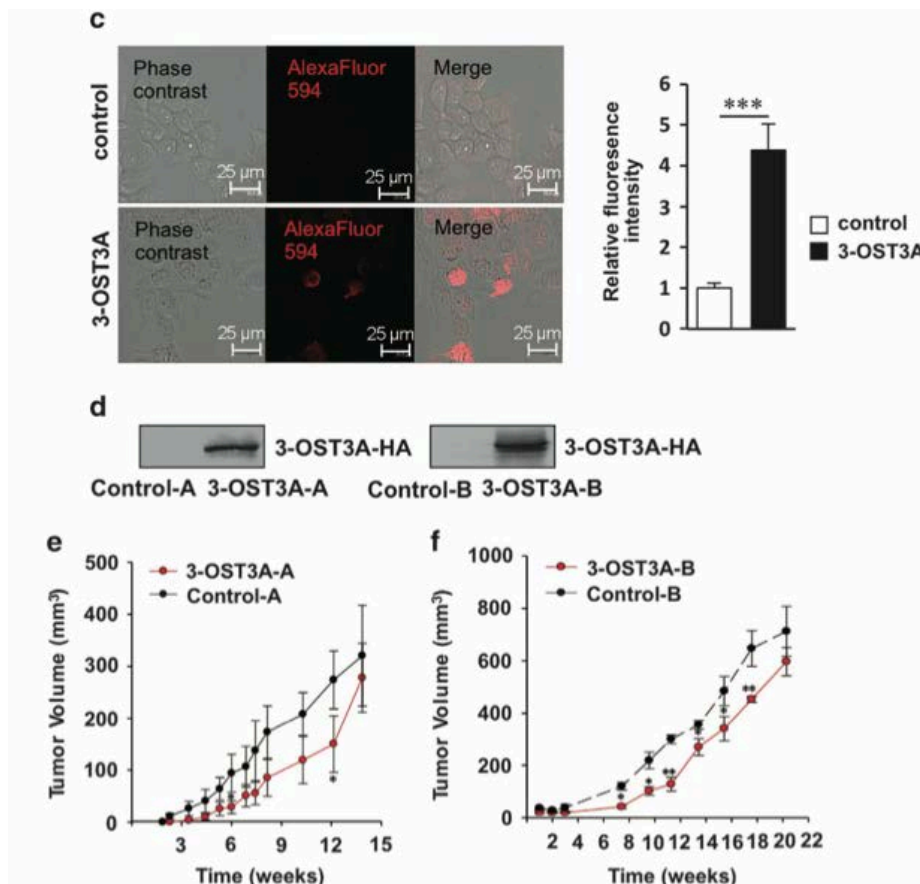


Figure 4. 3-OST3A expression triggers apoptotic events in MCF-7 cells and retards tumor growth in xenografted mice. (a) Annexin V assay in MCF-7 cells transiently transfected with empty vector (control) or 3- OST3A cDNA (3-OST3A) by FACS analysis (left panel). Quantitative analysis of early (annexin V+/PI⁻, right low square) and late (annexin V+/PI⁺, right upper square) stages of apoptosis shows increased percentage of apoptotic cells upon 3-OST3A expression (right panel). **P<0.01, n=3. (b) Immunoblot analysis of apoptotic proteins in MCF- 7 cells transfected with empty vector (control) or 3- OST3A cDNA (3-OST3A). Quantitative analysis of protein expression using Image J software shows increased Bax and decreased Bcl2 level, and increased cleaved caspase 9 and cleaved poly(ADP-ribose)polymerase. Expression level of each protein is expressed relative to control cells (set to 1). **P<0.01, n=3. (c), TUNEL assay in MCF- 7 cells transfected with empty vector (control) or 3- OST3A cDNA (3-OST3A) by dUTP labeling shows increased DNA fragmentation. Quantitative analysis of fragmented DNA was performed using Image J software. Level of fragmented DNA is expressed relative to control cells (set to 1). ***P<0.001, n=3. Scale=25 μ m. (d) 3-OST3A expression in pcDNA (control-A and B) and 3-OST3A-HA (3-OST3A-A and B) stably transfected MCF-7 cells were analyzed by immunoblotting after 10 passages. e and f, the effect of 3-OST3A in 3-OST3A-A and -B MCF-7 cell lines compared with tumors formed in mice implanted with Control-A and -B shows delayed tumor formation. Controls are represented by black solid circles and 3-OST3A-expressing cells by red solid circles. *P<0.05, **P<0.01, n=3 or 4.

3-OST3A affects FGF-7-HS interactions and regulates FGF-7 signaling

HSPGs influence the tumor process by regulating the activity of a variety of signaling molecules, primarily FGFs.²¹ FGF-7 (keratinocyte growth factor) acting on epithelial cells²² is a potent mitogen for mammary glands^{23,24}, and induces proliferation and motility in breast cancer cells.²⁵ This led us to explore the influence of 3-OST3A expression on FGF-7-HS interactions and signaling. FGF-7 binding was analyzed by confocal microscopy, flow

cytometry and, to directly assess FGF-7 and HS interactions, by fluorescence-resonance energy transfer (FRET)-fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM) assays in MCF-7 cells compared to MCF-10A cells. siRNA transfected MCF-10A cells displayed a strong pericellular immunofluorescent staining pattern, consistent with enhanced FGF-7 binding, whereas FGF-7 staining was reduced in MCF-7 upon 3-OST3A expression (Figure 5a and b). Quantitative flow cytometry clearly confirmed an increase in fluorescence signal associated with FGF-7 binding in siRNA transfected MCF-10A, and a decrease in 3-OST3A transfected MCF-7 cells (Figure 5c).

In a FRET assay (Supplementary Figure S4), a clear increase in emission intensity of HS-AlexaFluor 555 was observed in empty vector transfected MCF-7 cells compared to those transfected with 3-OST3A (Supplementary Figure S4A). Lambda scan showed a significant FRET from FGF-7-AlexaFluor 488 to HS-AlexaFluor 555 in cells that did not express 3-OST3A-HA (Supplementary Figure S4B). FLIM analysis confirmed a greater distribution in favor of the FRET positive cell population (in green) in control cells, compared to 3-OST3A transfected cells (Figure 5d). The average lifetime of AlexaFluor 488 was unchanged in cells expressing 3-OST3A-HA, but reduced in control and 3-OST3A-HA-negative cells (Figure 5e, Table 1). These data indicate that binding of FGF-7 is HS-dependent, and that it is impaired upon 3-OST3A overexpression in MCF-7 cells, highlighting the potential impact of 3-O-sulfation on FGF-7-HS interactions.

We next examined whether impaired FGF-7-HS interactions mediated by 3-OST3A would affect FGF-7 downstream signaling pathways. FGF-7 activates the Ras-MAP kinase and PI3K-AKT cascades following binding to its receptor FGFR2IIIb, a splice variant of FGFR2 expressed in breast carcinoma cell lines.^{26,27} Indeed, phosphorylation of AKT was reduced upon FGF-7 treatment at low dose in 3-OST3A-transfected MCF-7 cells (Figure 5f). Furthermore, ERK phosphorylation was strongly inhibited upon 3-OST3A transfection from 0.5 to 1 ng/mL (Figure 5g), whereas phosphorylation of p38 was increased in response to FGF-7 treatment (Figure 5h). In empty vector transfected MCF-7 cells, a slight increase in ERK phosphorylation was observed at the highest FGF-7 concentration and exposure time (Supplementary Figure S5A) whereas no variations in AKT and p38 phosphorylation occurred (Supplementary Figure S5B and C). Our results suggest that inactivation of the FGF-7-induced ERK signaling pathway is involved in the antiproliferative effect of 3-OST3A in lumA-MCF-7 cells, and that inhibition of FGF-7-AKT, together with activation of FGF-7-p38 signaling, contributes to its pro-apoptotic effect (as represented Supplementary Figure S6).

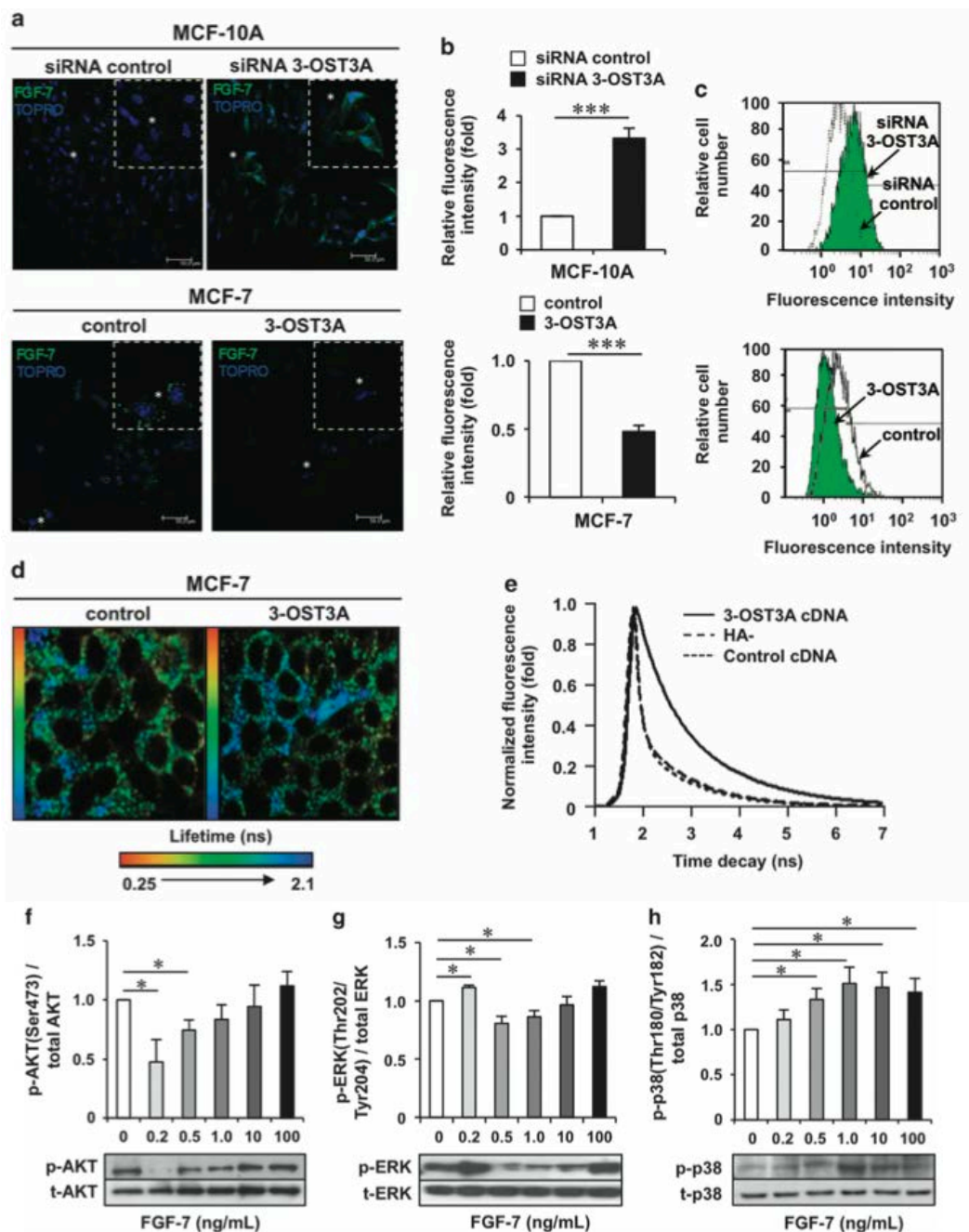


Figure 5. 3-OST3A expression impairs FGF-7 cell-surface binding via FGF-7-HS interactions and regulates FGF-7-dependent signaling in MCF-7 cells. (a) Confocal immunofluorescence microscopy of FGF-7 cell-surface binding on MCF-10A cells transfected by siRNA control or siRNA 3-OST3A (upper panel) and on MCF-7 cells transfected with empty vector (control) or with 3-OST3A cDNA (3-OST3A) (lower panel). Cells were double-stained for bound FGF-7 (green) and nucleus (blue). A single cell is presented in inset. (b) Semi-quantitative analysis of the fluorescence intensity from panel A using Image J software shows increased FGF-7 binding in 3-OST3A siRNA depleted MCF-10A cells and reduced FGF-7 binding upon 3-OST3A expression in MCF-7 cells. ***P<0.001, n=3. (c) Flow cytometry of FGF-7 cell-surface binding performed on cells transfected as in panel A. Upper panel shows increased fluorescence signal in MCF-10A transfected by siRNA 3-OST3A (green) compared with siRNA control (white). Lower panel shows reduced fluorescence signal in MCF-7 transfected with 3-OST3A cDNA (green) compared with empty vector (white). (d) FRET analysis of FGF-7-HS interactions using anti-FGF-7-AlexaFluor 488 antibodies as fluorescence donor, in the presence of anti-HS-AlexaFluor 555 antibodies as acceptor. Quantification of FRET by FLIM showing the distribution of lifetime of the donor from 0.25 (orange, FRET++) to 2.1 ns (blue, FRET -) indicates more FRET positive cells (green) in control compared with 3-OST3A cells. (e) Lifetime decay showed higher average lifetime of donor in 3-OST3A cells compared with HA-negative and empty vector transfected cells (shown in Table 1 and Supplementary Figure. S4). (f-h) 3-OST3A expression regulates FGF-7-mediated signaling. 3-OST3A transfected MCF-7 cells were serum-starved for 24 h and treated with FGF-7. Lower panels show a representative immunoblot of cell lysates performed with (f) anti-phospho-AKT and anti-AKT, (g) anti-phospho-ERK1/2 and anti-ERK1/2 and (h) anti-phospho-p38 and anti-p38 antibodies. The relative intensity of immunoreactive bands of phosphorylated versus total protein shown in upper panels. *P<0.05, n=3.

Condition	Lifetime (ns)
3-OST3A cDNA	0.95 ± 0.07 ^{a,b}
HA-	0.36 ± 0.12 ^a
Control cDNA	0.42 ± 0.10

3-OST3A cDNA, HA-negative (HA-) and control cDNA correspond to regions analyzed in 3-OST3A cDNA-transfected cells expressing 3-OST3A-HA, in 3-OST3A cDNA-transfected cells lacking 3-OST3A-HA expression and in empty vector-transfected cells, respectively, as in Supplementary Figure S4A and B. Data are mean ± s.e.m. ^a*P* < 0.05 vs control cDNA. ^b*P* < 0.05 vs HA-, *n* = 3. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

3-OST3A is a prognostic marker in breast cancer patients

To assess the clinical relevance of our experimental data, we analyzed 3-OST3A expression in a cohort of primary breast tumors.²⁸ The cohort was segregated into 4 subtypes *i.e.* lumA, lumB, HER2+ and TN according to the pathological markers recommended by the St Gallen breast cancer consensus guidelines¹⁶ (Supplementary Table S2). Consistent with other clinical studies, TN and HER2+ breast cancers were the most aggressive breast cancers (Supplementary Figure S8A). All tumors expressed 3-OST3A (Figure 6a) and Kruskal-Wallis analysis indicated that the level of 3-OST3A expression was associated with the breast cancer subtype (*P* < 0.017). Importantly, 3-OST3A expression was significantly lower in lumA-tumors compared to other breast cancer subtypes (Mann-Whitney, *P* < 0.042). This observation suggested that a low expression of 3-OST3A contributes to the cancer process in lumA tumors, as corroborated by the tumor-suppressive effect mediated by 3-OST3A overexpression in MCF-7 cells (shown Figure 3a and 4a). On the other hand, 3-OST3A expression was significantly higher in HER2+ tumors (Mann-Whitney, *P* < 0.008), suggesting that in this subtype, elevated 3-OST3A would favor breast cancer formation and progression, in accordance with its oncogenic properties in SKBR3 cells (shown Figure 3a).

We next investigated the relationship between 3-OST3A expression and HER2+ patient outcome. The optimal cut-off for HER2+ breast tumours was determined by ROC curves^{29,30} (Supplementary Figure S7). Importantly, we showed using univariate analysis that 3-OST3A expression was significantly associated with cancer progression (CP) (Fisher exact *t* test; *P* ≤ 0.004) and death (*P* ≤ 0.046) in HER2+ breast tumors (Supplementary Table S3). This was confirmed by Kaplan-Meier log-rank analyses (CP, $\chi^2 = 7.221$, 1 df, *P* ≤ 0.007; death, $\chi^2 = 3.686$, 1 df, *P* ≤ 0.055, Figure 6b).

In addition to 3-OST3A expression (3ost), tumor size (S) and lymph node metastasis (LN, absence or presence) were independently associated with CP in HER2+ breast cancers

(Supplementary Figure S8B and C, Supplementary Table S4-6). We then formed a binary variable (3ost, S, LN) that was positive only when the HER2+ patients had a 3-OST3A positive tumor of a diameter larger than 20 mm and at least one lymph node metastasis (Figure 6c). Multivariate Cox's regression analysis determined the interdependence degree between these three parameters and confirmed that the combined variable (3ost, S, LN) stood out as an independent significant predictor of cancer recurrence and death (Table 2). This positive variable (3ost, S, LN) enhanced 27-fold the risk of recurrence (Hazard ratio (HR), 27.3; 95% Confidence Interval (CI), 3.6 to 207.7). The Omnibus test indicated that the number of HER2+ breast tumors is sufficient to support this conclusion (Table 2). The Cox's Regression analysis was further confirmed by Kaplan-Meier log-rank analyses (CP: $\chi^2 = 23.233$, 1 df, $P < 2.10^{-6}$, death: $\chi^2 = 14.354$, 1 df, $P < 2.10^{-4}$, Figure 6c) indicating that the combined variable (3ost, S, LN) separated two subtypes of HER2+ breast cancer patients with opposite clinical outcome.

The HER2+ breast cancer patients positive for (3ost, S, LN) represented 43% of total HER2+ patients and among these patients, 71% (15/21) suffered from recurrence (Figure 6c) compared to 44% (16/36) when considering 3-OST3A expression only (Figure 6b), thus providing a discriminating biomarker for clinicians. Considering the combined variable allowed the identification of 93% (15/16) of patients in whom cancer recurred or who died, while the HER2+ patients negative for (3ost, S, LN) had no recurrence over 15 years. Our results suggest that the current treatment of HER2+ patients is efficient in 96% (27/28) of the (3ost, S, LN) negative patients, while the HER2+ breast cancer patients positive for (3ost, S, LN) would benefit from additional or alternative treatment such as trastuzumab.

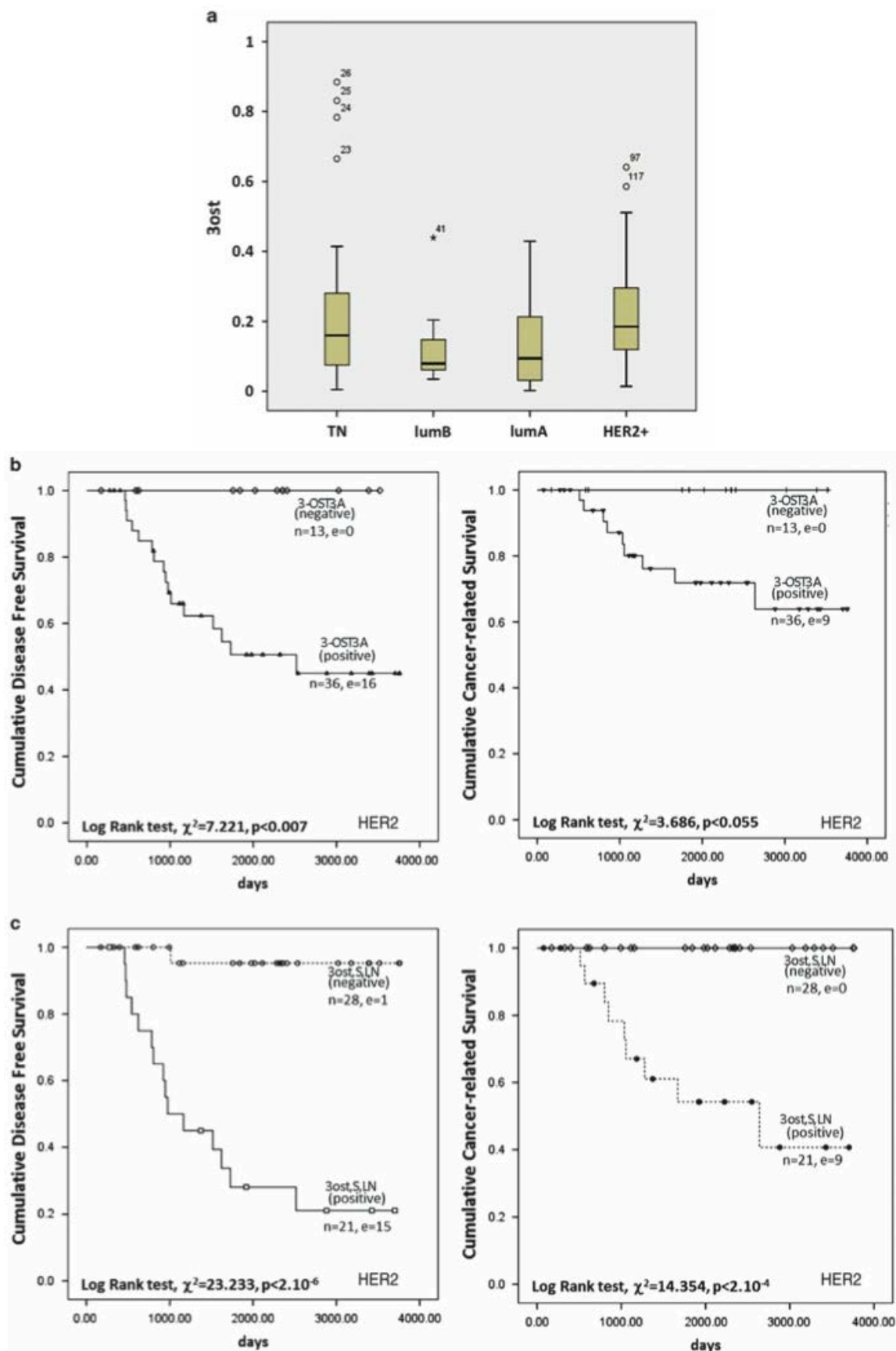


Figure 6. 3-OST3A expression depends on the breast cancer subtype and determines clinical outcome. (a) Multi-variable Kruskal–Wallis non-parametric test was used to analyse the association between the breast cancer subtype (triple negative (TN, ER⁻, PR⁻, HER2⁻), luminal B (lumB, ER⁺, PR⁻, HER2⁻), luminal A (lumA, ER⁺, PR⁺, HER2⁻), HER2+ (HER2+ regardless of ER and PR status)) and 3-OST3A expression level determined by RT-qPCR. (b) Non-parametric Kaplan–Meier plots show that disease-free survival (left) and cancer-related survival (right) in HER2+ patients was significantly lower in 3-OST3A positive tumors. (c) Non-parametric Kaplan–Meier plots of binary variable (3ost, S, LN) in relation to disease-free survival (left) and cancer-related survival (right) shows that 71% of the (3ost,S,LN) positive and Her2+ breast cancer patients suffered from recurrence and among them 60% from death. Censored cases are shown on the curves. Log-rank analyses and P values are indicated. The number of patients (n) and events (e) are indicated. 187

Table 2. Multivariate cox's regression analysis on primary HER2+ breast cancer

	Itr.	Predictor	Omnibus test of model coefficient			HR	95% CI
			χ^2	df	I value		
Disease-free survival	1	(3ost, S, LN)	23.233	1	2.10^{-6}	27.3	3.6 207.7
Overall survival	1	(3ost, S, LN)	14.354	1	2.10^{-4}	117.1	0.41 3.10 ⁵

Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval. Number of HER2+ patients, 49. The clinico-pathological parameters were: presence of lymph node metastasis (LN), tumor size (S), 3-OST3A (3ost) and the combined binary variable (3ost, S, LN).

DISCUSSION

This study reports for the first time the molecular, functional and clinical role of the HS-sulfotransferase 3-OST3A, a key enzyme controlling the tumor microenvironment, in breast cancer. A main result of our work is the unequivocal demonstration that 3-OST3A can display either oncogenic or tumor-suppressive effects depending on the cell and tumor phenotype. This detailed analysis clarifies conflicting literature that reports contrasting effects of 3-OSTs expression on tumorigenesis in different types of cancer and cell models.^{13,14} Importantly, the clinical study performed here shows that 3-OST3A is differentially expressed in distinct subtypes of tumors, corroborating our *in vitro* data, and establishes the prognostic value of 3-OST3A as a novel marker in HER2+ breast cancer patients.

Previous reports including ours have documented the epigenetic repression of several 3-OST genes in tumor cells.^{11,15,31} Our study shows that 3-OST3A was repressed and subjected to hypermethylation in all breast cancer cell lines tested except in HER2+-SKBR3 cells in which, consistently, it was expressed at relatively high level. Further analysis of the chromatin interactors at the 3-OST3A promoter showed that the epigenetic regulation not only depends upon DNA methylation, but also on repressive histone marks, and involves the recruitment of PcG proteins. We describe here for the first time a fine interplay between DNA methylation, histone modifications and epigenetic regulators of the PRC2 complex controlling 3-OST3A expression in a cell-context dependent manner. In lumA-MCF-7 cells, DNMT3B and the EZH2 subunit of the PRC2 complex involved in writing the repressive H3K27me3 mark form a chromatin environment that moderately repressed transcriptional activity. In MDA-MB-231 cells, we propose a scenario at the 3-OST3A promoter in which the methylated DNA reader MeCP2 is associated with a deacetylase complex formed by Sin3A, HDAC1 and possibly H3K9 methyltransferases.¹⁸ Altogether the chromatin interactors DNMT1, 3A, PcG proteins and the histone marks H3K27me3 and H3K9me3 produce gene silencing in these cells. Our demonstration of the HS-sulfotransferase 3-OST3A gene methylation and histone modification is in line with previous findings indicating that epigenetic dysregulation is an

important feature of breast cancer pathobiology and that it depends upon the tumor signature.³² Our results validate the potential value of epigenetic therapies targeting *3-OST3A* together with other silenced critical genes such as those coding for the Ras interacting protein RASSF1A³³, the estrogen receptor α (ER α)³⁴ and the retinoic acid receptor RAR α ³⁵ in TN breast cancers. Altogether, our findings support the attractive idea that the HS-modifying *3-OST3A* sulfotransferase enzyme participates into the matrix-cell dialog through epigenetic mechanisms.

FGFs, a significant group of HS ligands, use HSPG as co-receptors to bind specific tyrosine kinase receptors promoting signal transduction, and FGF signaling is deregulated in many cancer types.³⁶ We thus hypothesized that *3-OST3A* epigenetic regulation may alter breast cancer cell phenotype through modulation of FGF-dependent intracellular signaling. FGF-7 secreted by stromal mesenchymal cells acts on epithelial cells, where it associates with the FGFR2IIIb receptor. Alteration of the FGF-7-FGFR2IIIb signaling axis contributes to the oncogenic process by activating intracellular kinase cascades including ERK-dependent proliferation and AKT-mediated cell survival in breast cancer cells³⁷, and anti-FGFR2IIIb antibodies offer a new therapeutic option.³⁸ Since FGF-7 is one of the most structurally specific FGFs with respect to its requirement for a 3-*O*-sulfated motif to coordinate ligand-receptor complex assembly^{39,40}, we investigated whether *3-OST3A* expression may regulate its signaling pathway to trigger the tumor-suppressive effect observed in the lumA-MCF-7 cells. Supporting this assumption, our data show that reinstating *3-OST3A* expression in these cells: *i*) impaired interactions between FGF-7 and HS chains, *ii*) inhibited proliferative signals *via* ERK dephosphorylation, and *iii*) boosted apoptotic signals *via* AKT dephosphorylation and p38 phosphorylation. Our observations are of particular interest since FGF-7 plays a critical role both in mammary gland development and breast cancer onset and progression.⁴¹ Since 3-*O*-sulfation is an important modification of HS for HS-FGF-7-FGFR2IIIb complex formation⁴², our data support the idea that this modification might contribute to the anti-oncogenic properties of *3-OST3A* in lumA cells. However, it is of note that the mechanisms underlying impaired FGF-7 binding in MCF-7 cells upon *3-OST3A* expression is not fully understood. We ruled out the possibility that *3-OST3A* would reduce FGFR2IIIb expression (data not shown). On the other hand, according to several reports⁴³, it is hypothesized that 3-*O*-sulfated HS binding may precede and prevent FGF-7 interactions with its FGFR2IIIb receptor. Another possibility is that altered activation of fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2□) would trigger internalization and degradation of FGFR2IIIb thus

contributing to attenuate FGF-7 binding and signaling seen in our experiments upon 3-OST3A expression. These options are currently under investigation in our laboratory.

Since the effects triggered by 3-OST3A expression in breast cancer cell lines depended on their molecular signature, a major aim of the present study was to evaluate the clinico-pathological impact of 3-OST3A expression in breast cancer. We provided insight into this key issue by conducting a clinical study in a cohort of breast cancer patients followed over a 15-year period. The low expression detected in lumA tumors suggests that 3-OST3A might inhibit cancer formation and progression and is consistent with a tumor-suppressive effect in this subtype of malignancies. This assumption is supported by our experimental data showing a pro-apoptotic and anti-proliferative effect triggered by 3-OST3A expression in MCF-7 cells, associated with tumor growth retardation in xenografted mice.

A key finding is that, in HER2+ subtype breast cancer patients, high 3-OST3A expression is associated with reduced survival. The SKBR3 cell model harboring this molecular signature allowed us to explore the mechanisms underlying our clinical observations. Consistently, we showed that 3-OST3A overexpression in SKBR3 cells promotes proliferation, whereas its silencing results in the reverse effect. Furthermore, 3-OST3A expression enhanced the antiproliferative effect of trastuzumab whereas knocking-down expression arrested it. This result has two important outcomes. First, it suggests that 3-OST3A-mediated HS modification alters the HER2 receptor-mediated signaling pathway, an assumption that is currently under investigation. Second, it reveals a novel and potentially clinically important effect of 3-OST3A on sensitivity to the therapeutic anti-HER2 antibody trastuzumab. Identifying the HER2+ breast cancer patients who might benefit from extended adjuvant therapy represents a long-standing conundrum. In our cohort, about 40% of HER2+ breast cancer patients given chemotherapy (5-fluorouracil, epirubicin (doxorubicin) and camptothecin) suffered from cancer progression, a poor outcome highlighting a currently unmet clinical need. This phenomenon, strongly supported by the data presented here, could therefore facilitate the stratification of two populations of HER2+ breast cancer patients; one 3-OST3A positive population with at least one lymph node metastasis and a tumor diameter > 21 mm who are much more likely (71% chance) to suffer from cancer recurrence and death, and thus would clearly benefit from alternative therapy such as trastuzumab, while the 3-OST3A negative population has a much better prognosis with lack of recurrence over 15 years.

In conclusion, we show that the sulfotransferase 3-OST3A, involved in the final step of HS processing, is a key regulator of tumor cell behavior and anticancer drug response, and that its

oncogenic or tumor-suppressive effects are cell- and tumor-signature dependent. The finding that 3-OST3A expression correlates with cancer progression in HER2+ patients highlights its clinical significance for guiding therapeutic options in breast cancer treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

Dr Philippe Lassalle (INSERM U1019E11, Campus Institut Pasteur de Lille, Lille, France) is gratefully acknowledged for support with the xenograft experiments and for helpful discussion. Matthieu Chabel and Anne Robert are acknowledged for excellent technical assistance and Xiaomeng Pang is acknowledged for performing methylation analysis. This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR-GAG Network ANR-08-PCVI-0023 and ANR Meca-GT ANR-13-BSV8-0011-01), a Royal Society International Joint grant (to MWHC and SF-G), grants from Région Lorraine and Lorraine University to SF-G and to NR, and was carried out under auspices of the International Associated Laboratory (SFGEN) funded between CNRS-UL (SF-G) and University of Dundee (J-CB and MWHC). Tayside Tissue Bank is supported by Breast Cancer Campaign, Cancer Research UK (CRUK) and by NHS Tayside through the Chief Scientist Office and Health Sciences Scotland (formerly the Scottish Academic Health Science Collaboration, AHSC).

REFERENCES

- 1 Bissell MJ, Hines WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* 2011; 17: 320–329.
- 2 Breton C, Fournel-Gigleux S, Palcic MM. Recent structures, evolution and mechanism of glycosyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* 2012; 22: 540–549.
- 3 Kusche-Gullberg M, Kjellen L. Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol* 2003; 3: 605–611.
- 4 Gulberti S, Lattard V, Fondeur M, Jacquinet JC, Mulliert G, Netter P et al. Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta 1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-1) and beta 1,3-glucuronosyltransferase 1 (GlcAT-1) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J Biol Chem* 2005; 280: 1417–1425.
- 5 Girardin EP, Hajmohammadi S, Birmele B, Helisch A, Shworak NW, de Agostini AI. Synthesis of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans by glomerular epithelial cells involves multiple 3-O-sulfotransferase isoforms and a limiting precursor pool. *J Biol*

Chem 2005; 280: 38059–38070.

6 Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD et al. A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 1999; 99: 13–22.

7 Nurcombe V, Smart CE, Chipperfield H, Cool SM, Boilly B, Hondermarck H. The proliferative and migratory activities of breast cancer cells can be differentially heparan sulfates. *J Biol Chem* 2000; 275: 30009–30018.

regulated by

8 Lofgren L, Sahlin L, Jiang S, Von Schoultz B, Fernstad R, Skoog L et al. Expression of syndecan-1 in paired samples of normal and malignant breast tissue from women. *Anticancer Res* 2007; 27: 3045–3050.

postm enopau

9 Staub J, Chien J, Pan Y, Qian X, Narita K, Aletti G et al. Epigenetic silencing of HSulf-1 in ovarian cancer: implications in chemoresistance. *Oncogene* 2007; 26: ~~4969~~.

10 Sasisekharan R, Shriver Z, Venkataraman G, Narayanasami U. Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 521–528.

11 Miyamoto K, Asada K, Fukutomi T, Okochi E, Yagi Y, Hasegawa T et al. Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfo-transferase-2 (3-OST2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. *Oncogene* 2003; 22: 274–280.

12 Raman K, Kuberan B. Chemical tumor biology of heparan sulfate proteoglycans. *Curr Chem Biol* 2010; 4: 20–31.

13 Hwang JA, Kim Y, Hong SH, Lee J, Cho YG, Han JY et al. Epigenetic inactivation of heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2 in lung cancer and its role in tumorigenesis. *PLoS One* 2013; 8: e79634.

14 Song K, Li Q, Jiang ZZ, Guo CW, Li P. Heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3B1, a novel epithelial-mesenchymal transition inducer in pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther* 2011; 12: 388–398.

15 Bui C, Ouzzine M, Talhaoui I, Sharp S, Prydz K, Coughtrie MW et al. Epigenetics: methylation-associated repression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase gene expression contributes to the invasive phenotype of H-EMC-SS chondrosarcoma cells. *FASEB J* 2010; 24: 436–450.

16 Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thurlimann B et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Ann Oncol* 2013; 24: 2206–2223.

17 Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol* 2013; 10: 1147–1155.

18 Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 4035–4040.

19 Kadamb R, Mittal S, Bansal N, Batra H, Saluja D. Sin3: insight into its transcription regulatory functions. *Eur J Cell Biol* 2013; 92: 237–246.

- 20 van Kuppevelt TH, Dennissen MA, van Venrooij WJ, Hoet RM, Veerkamp JH. Generation and application of type-specific anti-heparan sulfate antibodies using phage display technology. Further evidence for heparan sulfate heterogeneity in the kidney. *J Biol Chem* 1998; 273: 12960–12966.
- 21 Delehedde M, Lyon M, Sergeant N, Rahmoune H, Fernig DG. Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2001; 6: 253–273.
- 22 Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F et al. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 1996; 271: 15292–15297.
- 23 Kitsberg DI, Leder P. Keratinocyte growth factor induces mammary and prostatic hyperplasia and mammary adenocarcinoma in transgenic mice. *Oncogene* 1996; 13: 2507–2515.
- 24 Jacquemier J, Sun ZZ, Penault-Llorca F, Geneix J, Devilard E, Adelaide J et al. FGF7 protein expression in human breast carcinomas. *J Pathol* 1998; 86: 269–274.
- 25 Zang XP, Siwak DR, Nguyen TX, Tari AM, Pento JT. KGF-induced motility of breast cancer cells is dependent on Grb2 and Erk1,2. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21:
- 25 Zang XP, Siwak DR, Nguyen TX, Tari AM, Pento JT. KGF-induced motility of breast cancer cells is dependent on Grb2 and Erk1,2. *Clin Exp Metastasis* 2004; 21:437–443.
- 26 Cha JY, Lambert QT, Reuther GW, Der CJ. Involvement of fibroblast growth factor receptor isoform switching in mammary oncogenesis. *Mol Cancer Res* 2008; 6:435–445.
- 27 Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 116–129.
- 28 Marcel V, Fernandes K, Terrier O, Lane DP, Bourdon JC. Modulation of p53beta and p53gamma expression by regulating the alternative splicing of TP53 gene modifies cellular response. *Cell Death Differ* 2014; 21: 1377–1387.
- 29 Hajian-Tilaki K. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. *Caspian J Intern Med* 2013; 4: 627–635.
- 30 Budezies J, Klauschen F, Sinn BV, Gyorffy B, Schmitt WD, Darb-Esfahani S et al. Cutoff finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PLoS One* 2012; 7: e51862.
- 31 Thacker BE, Xu D, Lawrence R, Esko JD. Heparan sulfate 3-O-sulfation: a rare modification in search of a function. *Matrix Biol* 2013; 35: 60–72.
- 32 Kokura K, Sun L, Bedford MT, Fang J. Methyl-H3K9-binding protein MPP8 mediates E-cadherin gene silencing and promotes tumour cell motility and invasion. *EMBO J* 2010; 29: 3673–3687.
- 33 Klotten V, Becker B, Winner K, Schrauder MG, Fasching PA, Anzeneder T et al. Promoter hypermethylation of the tumor-suppressor genes ITIH5, DKK3, and RASSF1A as novel biomarkers for blood-based breast cancer screening. *Breast Cancer Res* 2013; 15: R4.

- 34 Hervouet E, Cartron PF, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. *Epigenetics* 2013; 8: 237–245.
- 35 Shukla S, Mirza S, Sharma G, Parshad R, Gupta SD, Ralhan R. Detection of RASSF1A and RAR hypermethylation in serum DNA from breast cancer patients. *Epigenetics* 2006; 1: 88–93.
- 36 Dieci MV, Arnedos M, Andre F, Soria JC. Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: from a biologic rationale to medical perspectives. *Cancer Discov* 2013; 3: 264–279.
- 37 Cha JY, Maddileti S, Mitin N, Harden TK, Der CJ. Aberrant receptor internalization and enhanced FRS2-dependent signaling contribute to the transforming activity of the fibroblast growth factor receptor 2 IIIb C3 isoform. *J Biol Chem* 2009; 284: 6227–6240.
- 38 Bai A, Meetze K, Vo NY, Kollipara S, Mazsa EK, Winston WM et al. GP369, an FGFR2-IIIb-specific antibody, exhibits potent antitumor activity against human cancers driven by activated FGFR2 signaling. *Cancer Res* 2010; 70: 7630–7639.
- 39 Ye S, Luo Y, Lu W, Jones RB, Linhardt RJ, Capila I et al. Structural basis for interaction of FGF-1, FGF-2, and FGF-7 with different heparan sulfate motifs. *Biochemistry* 2001; 40: 14429–14439.
- 40 Xu R, Ori A, Rudd TR, Uniewicz KA, Ahmed YA, Guimond SE et al. Diversification of the structural determinants of fibroblast growth factor-heparin interactions: implications for binding specificity. *J Biol Chem* 2012; 287: 40061–40073.
- 41 Mehta M, Kesinger JW, Zang XP, Lerner ML, Brackett DJ, Brueggemeier RW et al. Influence of novel KGFR tyrosine kinase inhibitors on KGF-mediated proliferation of breast cancer. *Anticancer Res* 2010; 30: 4883–4889.
- 42 Luo Y, Ye S, Kan M, McKeehan WL. Control of fibroblast growth factor (FGF) 7- and FGF1-induced mitogenesis and downstream signaling by distinct heparin octasaccharide motifs. *J Biol Chem* 2006; 281: 21052–21061.
- 43 Nieto L, Canales Á, Fernández IS, Santillana E, González-Corrochano R, Redondo-Horcajo M et al. Heparin modulates the mitogenic activity of fibroblast growth factor by inducing dimerization of its receptor. a 3D view by using NMR. *Chem-biochem* 2013; 14: 1732–1744.
- 44 Fournel-Gigleux S, Sutherland L, Sabolovic N, Burchell B, Siest G. Stable expression of two human UDP-glucuronosyltransferases cDNAs in V79 cell cultures. *Mol Pharmacol* 1991; 39: 177–183.
- 45 Bourdon JC, Khoury MP, Diot A, Baker L, Fernandes K, Aoubala M et al. p53 mutant breast cancer patients expressing p53gamma have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2011; 13: R7.
- 46 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: 359–377.
- 47 Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical

semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 1995; 48: 876–878.

48 Purdie CA, Jordan LB, McCullough JB, Edwards SL, Cunningham J, Walsh M et al. HER2 assessment on core biopsy specimens using monoclonal antibody CB11 accurately determines HER2 status in breast carcinoma. *Histopathology* 2010; 56: 702–707.

B. Principaux résultats

Ces travaux ont permis de révéler un rôle fonctionnel de l'héparane sulfate 3-O-sulfotransférase 3A (3-OST3A) en tant que nouveau régulateur tumoral dans le cancer du sein, présentant cette enzyme de maturation des chaînes de HS comme un potentiel marqueur pronostique dans le cancer du sein de sous-type HER2+.

Nous avons tout d'abord établi le profil de méthylation des gènes *3-OSTs* dans un panel de lignées d'adénocarcinome mammaire représentatives des différents sous-types de cancer du sein (LumA, LumB, HER2+, TN) : les cellules SKBR3 (HER2+), MCF-7 (LumA), BT-474 (LumB), T-47D (LumA), MDA-MB-231 (TN), MDA-MB-453 (HER2+) et MDA-MB-468 (TN). Une hyperméthylation de l'isoforme 3-OST3A associée à la diminution, voire à l'extinction totale de son expression, a été mise en évidence dans les lignées tumorales étudiées, excepté dans les cellules SKBR3 (HER2+) pour lesquelles la 3-OST3A reste exprimée à un niveau relativement élevé comparé à celui des cellules contrôles MCF-10A (Figure 1a). Sur la base de travaux ayant mis en évidence une régulation épigénétique de plusieurs gènes *3-OSTs* dans les cellules tumorales (Miyamoto *et al.*, 2003, Bui *et al.*, 2010, Thacker *et al.*, 2014), nous avons alors émis l'hypothèse qu'une régulation épigénétique du gène *3-OST3A* pourrait expliquer une dérégulation de l'expression de la 3-OST3A dans ces différentes lignées tumorales. Afin d'explorer cette hypothèse, nous avons traité les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 par des inhibiteurs des modifications épigénétiques, comme l'Aza, inhibiteur des DNA méthyltransférases et/ou la TSA, inhibiteur des histones déacétylases, qui ont permis d'augmenter l'expression du gène initialement réprimée (par hyperméthylation et déacétylation des histones) (Figure 1b et 1c). Ces résultats ayant confirmé que l'expression du gène codant la 3-OST3A était épigénétiquement régulée, nous avons cherché à identifier les acteurs épigénétiques associés au gène *3-OST3A* par immunoprécipitation de la chromatine. A l'instar des travaux ayant mis en évidence une régulation épigénétique des gènes *3-OSTs* en particulier dûe à la méthylation de l'ADN et à l'acétylation des histones dans différentes formes de cancer, nous avons étudié le recrutement des DNMTs et de l'HDAC1 au niveau du gène *3-OST3A* dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. De plus, les marques répressives des histones les plus connues ont également été étudiées à savoir la triméthylation des lysines 9 et 27 de l'histone 3. D'autre part, l'ADN méthylé étant capable de fixer des protéines appelées *Methyl-CpG-binding domain proteins* impliquées dans le recrutement des HDACs (Grønbaek *et al.*, 2007), nous nous sommes également intéressé au recrutement de la MeCP2 (*Methyl-CpG binding Protein 2*), une protéine qui se fixe au niveau des séquences méthylées

de l'ADN. Ces analyses ont montré que la régulation épigénétique du gène *3-OST3A* ne dépend pas seulement de la méthylation de l'ADN, mais également de la présence de marques répressives sur les histones et du recrutement de protéines du groupe polycombe (PcG). Nous avons pu identifier une interaction entre la méthylation de l'ADN, la modification des histones et les régulateurs épigénétiques du complexe répressif polycombe 2 (PRC2) contrôlant l'expression de la *3-OST3A* de façon dépendante du contexte cellulaire. Dans les cellules MCF-7 (Lum-A), la DNMT3B et la sous-unité EZH2 du complexe PRC2 impliquée dans la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) forment un complexe autour de la chromatine réprimant de façon modérée l'activité transcriptionnelle. Dans les cellules MDA-MB-231, nous avons identifié la formation d'un complexe hautement répressif au niveau du promoteur du gène *3-OST3A* avec le recrutement des DNMT1 et 3A, la présence de la MeCP2 agissant en interaction avec l'histone déacétylase HDAC1 *via* Sin3A, et la marque répressive H3K9me3 (Figure 2).

Pour comprendre le rôle biologique de la *3-OST3A*, nous avons ensuite étudié l'influence de la modulation de son expression sur le comportement des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et SKBR3 par une approche de gain ou de perte de fonction. Des tests cellulaires de prolifération et d'apoptose ont permis de mettre en évidence un rôle pro-oncogénique ou suppresseur de tumeur de la *3-OST3A* selon le contexte cellulaire. Les tests cellulaires d'apoptose ont montré que la surexpression de la *3-OST3A* a un effet pro-apoptotique dans les cellules MCF-7 et n'a pas d'effet sur les cellules MDA-MB-231 et SKBR3. De façon complémentaire, les tests de prolifération ont montré un effet anti-prolifératif de la *3-OST3A* dans les cellules MCF-7 (LumA) et MDA-MB-231 (TN), alors que dans les cellules SKBR3 (HER2+), la surexpression de la *3-OST3A* a un effet pro-prolifératif. Dans ces cellules, l'inhibition de son expression par un siRNA réduit la prolifération cellulaire (Figure 3a). De plus, le trastuzumab (anticorps anti-HER2 bloquant l'activation du récepteur) a permis de contrecarrer l'effet pro-prolifératif de la *3-OST3A* dans les cellules SKBR3, suggérant l'implication du récepteur HER2 dans cette réponse (Figure 3b).

De façon intéressante, la présence de la *3-OST3A* semble améliorer la réponse des cellules au trastuzumab puisque l'inhibition de la prolifération cellulaire par le trastuzumab est plus forte dans les cellules surexprimant la *3-OST3A* (Figure 3b). Cette observation fait actuellement l'objet d'études complémentaires dans l'équipe afin d'expliquer ce phénomène. Ce résultat suggère que la *3-OST3A* serait susceptible de moduler la réponse au trastuzumab, et pourrait être envisagée comme un marqueur clinique prédictif de la réponse à ce traitement spécifique pour des patientes atteintes d'un cancer de sous type HER2+.

Dans la suite de cette étude, nous avons voulu identifier les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de l'apoptose des cellules MCF-7 suite à la surexpression de la 3-OST3A. Nous avons pu mettre en évidence une augmentation de l'expression de la protéine Bax pro-apoptotique en parallèle de la diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, témoignant de l'apoptose mitochondriale et de l'activation de la voie dite intrinsèque de l'apoptose. D'autre part, nous avons détecté une augmentation de l'expression de la caspase-9 clivée, elle aussi caractéristique de la voie intrinsèque de l'apoptose, et concordant avec les précédents résultats obtenus vis-à-vis de l'expression de Bax et Bcl-2 (Figure 4b). Nous avons en parallèle révélé une augmentation de l'expression de la forme clivée de la protéine cytoplasmique PARP (*Poly(ADP-Ribose) Polymérase*), témoignant de son incapacité à activer les mécanismes de réparation de l'ADN. Sachant qu'une des caractéristiques cellulaires représentative de l'apoptose est la fragmentation de l'ADN, nous avons également mis en évidence la fragmentation de l'ADN dans des cellules MCF-7 surexprimant la 3-OST3A par la technique TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) (Figure 3c). L'ensemble de ces données indiquent que la surexpression de la 3-OST3A permet d'activer les mécanismes de mort cellulaire dans les cellules MCF-7, attestant de son rôle « suppresseur de tumeur » dans cette lignée. De plus, des tests *in vivo* ont également été réalisés sur des souris SCID xénotransplantées par des cellules MCF-7 surexprimant la 3-OST3A de façon stable. Il a été montré que ces souris présentent un retard du développement tumoral, quantifié par la mesure de la taille de la tumeur, en comparaison aux souris xénotransplantées par des cellules MCF-7 contrôles ne surexprimant pas la 3-OST3A (Figure 4e). Ces données fournissent des preuves solides des propriétés pro-apoptotiques et anti-prolifératives de la 3-OST3A observées *in vitro* dans les cellules MCF-7, ce qui indique que la 3-OST3A agit comme un suppresseur de tumeur dans un modèle cellulaire de cancer du sein de sous-type LumA.

La suite de notre investigation sur ce point s'est attachée à identifier les mécanismes moléculaires de l'effet pro-apoptotique de la 3-OST3A dans les cellules MCF-7. Cette partie du travail a été réalisée par Xianqing Mao (co-premier auteur des travaux publiés dans *Oncogene* en 2016). Il est aujourd'hui établi que les HSPGs influencent le processus tumoral en régulant la biodisponibilité et l'activité de nombreuses molécules de signalisation, notamment les facteurs de croissance de la famille des FGFs en interagissant avec eux par l'intermédiaire des motifs sulfatés des chaînes de HS (Delehedde *et al.*, 2001). Il a été montré que le FGF-7 agit sur les cellules épithéliales comme un puissant facteur mitogène sur les

glandes mammaires (Kitsberg et Leder, 1996 ; Jacquemier *et al.*, 1998) en induisant la prolifération et la migration des cellules de cancer du sein (Zang *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, nous avons exploré l'influence de l'expression de la 3-OST3A sur les interactions FGF-7 / HS et la signalisation cellulaire induite dans les cellules MCF-7. Dans un premier temps, nous avons montré que la surexpression de la 3-OST3A dans les cellules MCF-7 diminue la liaison du FGF-7 aux HS membranaires (Figure 5a-e). Ces données indiquent que la liaison du FGF-7 est dépendante des HS et mettent en évidence l'impact potentiel de la 3-O-sulfatation médiée par la 3-OST3A sur les interactions HS / FGF-7 et sa signalisation. Dans un deuxième temps, nous avons examiné si la diminution de l'interaction HS/FGF-7 médiée par la surexpression de la 3-OST3A affecterait les voies de signalisation du FGF-7 dans les cellules MCF-7. Le FGF-7 active les voies des MAPkinases-ERK et la voie de la PI3K-Akt après sa liaison à son récepteur FGFR2-IIIb, une isoforme du FGFR2 exprimé dans les lignées d'adénocarcinome mammaire (Cha *et al.*, 2008 ; Turner et Grose, 2010). Nous avons ainsi montré que la surexpression de la 3-OST3A (1) diminue la phosphorylation d'Akt mais seulement en utilisant de faibles doses de FGF-7 (0.2 et 0.5 ng/mL), (Figure 5f) (2) diminue la phosphorylation d'ERK sur une gamme de concentrations de FGF-7 allant de 0.5 à 1 ng/mL (Figure 5g) et (3) augmente la phosphorylation de p-38 quelque soit la dose de FGF-7 utilisée (de 0.2 à 100 ng/mL) (Figure 5h). Ainsi, en considérant que l'effet sur la phosphorylation d'Akt est mineur, la diminution de la liaison du FGF-7 aux HS causée par la surexpression de la 3-OST3A entraîne une inactivation de la voie de signalisation impliquant ERK et une activation de la voie de signalisation impliquant p-38, ce qui permettrait d'expliquer respectivement l'effet anti-prolifératif et pro-apoptotique de la 3-OST3A dans les cellules MCF-7.

La relevance clinique de l'expression de la 3-OST3A a ensuite été étudiée dans une cohorte de 117 patientes atteintes de cancer du sein et représentatives des différents sous-types (LumA, LumB, HER2+ et TN). Cette étude a tout d'abord évalué le niveau d'expression de la 3-OST3A dans les tumeurs des patientes et a permis de montrer qu'il était statistiquement différent entre les sous-types. Le niveau d'expression de la 3-OST3A est ainsi dépendant du sous-type de cancer du sein (Figure 6a). Il a ainsi été mis en évidence une association entre les cancers du sein de sous-type HER2+, le taux d'expression de la 3-OST3A et la rechute des patientes. En effet, un taux de rechute de près de 50% a été observé chez les patientes dont les tumeurs présentaient un fort taux d'expression de la 3-OST3A, indiquant que sa forte expression serait associée à un mauvais pronostic chez ces patientes (Figure 6b). De plus, l'analyse multivariée, a permis d'identifier que 71 % des patientes dont les tumeurs

présentaient (i) un fort taux d'expression de la 3-OST3A (3ost), (ii) ayant au moins une tumeur de diamètre supérieur à 21 mm (S) et (iii) présentant au moins un ganglion lymphatique envahi de cellules cancéreuses (patientes (3ost, S, LN) positive) ont fait une rechute (Figure 6c). Ce résultat devient alors significatif pour le clinicien et justifie la mise en place d'une personnalisation du traitement.

C. Discussion et Conclusions

Les HSPGs sont des macromolécules polysaccharidiques ubiquitaires présentes dans les MEC et à la surface des cellules. Ce sont des acteurs clé à la fois du contrôle de l'assemblage des MEC en interagissant avec les molécules de collagènes et de la communication cellulaire, en particulier par le contrôle de la transduction du signal médiée par de multiples ligands. Les groupements sulfates greffés à différentes positions de la chaîne en cours de maturation lui permet d'interagir avec de nombreux ligands protéiques tels que les facteurs de croissance et les cytokines et d'en réguler la biodisponibilité et l'activité biologique. L'ajout des groupements sulfates est catalysé par l'action séquentielle de sulfotransférases : les NDSTs, la 2-OST, les 6-OSTs et les 3-OSTs.

Cette dernière famille de sulfotransférases catalyse la réaction de 3-*O*-sulfatation qui consiste en l'ajout d'un groupement sulfate en position 3 des résidus glucosamine de la chaîne des HS. Il s'agit d'une modification rare et à ce jour les fonctions biologiques associées aux HS 3-*O*-sulfatés sont limitées. Cette famille de sulfotransférases comporte sept isoformes qui peuvent être classées en deux groupes en fonction de leur spécificité de substrat et leur fonction biologique : d'une part les 3-OSTs de type AT regroupant les 3-OST1 et 5 qui ont la capacité de générer le motif pentasaccharidique reconnu par l'antithrombine III et d'autre part les 3OSTs de type gD comprenant les 3-OST2, 3A, 3B, 4 et 6 capables de générer le motif octasaccharidique reconnu par la glycoprotéine D (gD) de l'enveloppe virale de *l'Herpes simplex virus* de type I (HSV-1).

Les 3-OSTs sont exprimées de façon ubiquitaire, bien que chaque isoforme ait une expression tissulaire spécifique, mais le niveau d'expression et la présence de plusieurs isoformes sont dépendants du type cellulaire. Il est aujourd'hui établi que l'expression de ces enzymes est dérégulée au cours du processus tumoral conduisant à une modification de la structure des HSPGs et par conséquent de leur rôle biologique.

Nous avons montré une régulation épigénétique du gène *3-OST3A* par hyperméthylation et l'intérêt du traitement de ces cellules par les inhibiteurs des modifications épigénétiques pour restaurer l'expression de la *3-OST3A*. Le rôle des modifications épigénétiques dans le contrôle de l'expression génique est aujourd'hui clairement établi dans les processus cancéreux (Ellis *et al.*, 2009). Dans un contexte tumoral, plusieurs autres études ont mis en évidence une dérégulation de l'expression des gènes *3-OSTs* en lien avec la présence de marques épigénétiques générées par les DNMTs et des HDACs. Les travaux de Miyamoto *et al.* (2003) ont mis en évidence une hyperméthylation du gène *3-OST2* dans les cancers du sein, du côlon et du pancréas et les travaux de Hwang *et al.* (2013) ont également montré une hyperméthylation du gène *3-OST2* dans les cellules de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) et dans les tissus tumoraux de patients atteints de CPNPC. L'inhibition de son expression due à son hyperméthylation a été associée à un comportement pro-tumoral se manifestant par une induction de la migration, de la prolifération et de l'invasion cellulaire. De la même façon, des travaux, réalisés au sein de l'équipe, ont permis de mettre en évidence une hyperméthylation des isoformes *3-OST1*, *2*, *3A* et *6* associée à leur répression dans les cellules de chondrosarcome. La restauration de leur expression a permis de s'opposer à la progression tumorale en diminuant la prolifération et la migration cellulaire et en augmentant leur adhésion (Bui *et al.*, 2010). En revanche, les travaux de Song *et al.* (2011) ont montré que la restauration de l'expression de la *3-OST3B* suite à un traitement par la TSA induit la mise en place du processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) dans les cellules tumorales de pancréas, or l'EMT est une étape critique de la tumorigenèse. Dans ce cas de figure, l'expression de la *3-OST3B* est associée à un caractère pro-tumoral. Nos travaux ont pu mettre en évidence une hyperméthylation du gène *3-OST3A* associé à une diminution ou à une extinction totale de l'expression de ses transcrits et l'analyse de la chromatine du gène *3-OST3A* a révélé la formation d'un complexe plus ou moins répressif selon la lignée étudiée. Dans les cellules MDA-MB-231, nous avons mis en évidence la formation d'un complexe hautement répressif permettant d'expliquer que nous avons observé une extinction totale des transcrits *3-OST3A* associée à une hyperméthylation du gène *3-OST3A* à la fois au niveau de la région promotrice proximale et du premier exon. Dans les cellules MCF-7, nous avons mis en évidence la formation d'un complexe répressif de moindre intensité en lien avec une diminution de l'expression des transcrits sans pour autant observer une extinction totale et avec l'hyperméthylation partielle du gène *3-OST3A* seulement mise en évidence au niveau du premier exon.

Le caractère pro ou anti-tumoral des 3-OSTs et dans notre cas de la 3-OST3A a été mis en évidence par des tests cellulaires d'apoptose et de prolifération. Nos données ont permis de révéler que la 3-OST3A est un régulateur du comportement des cellules tumorales mammaires en exerçant une action pro- ou anti-tumorale dépendante du sous-type moléculaire. Dans les cellules MCF-7, nos tests de prolifération et d'apoptose ont permis de révéler un effet anti-prolifératif et pro-apoptotique de la surexpression de la 3-OST3A mettant en évidence un rôle anti-tumoral de la 3-OST3A dans un modèle cellulaire de cancer du sein LumA.

Pour comprendre les mécanismes cellulaires expliquant l'effet suppresseur de tumeur de la 3-OST3A dans les cellules MCF-7 (LumA), nous avons investigué les phénomènes d'interaction des HS avec les HBP étant donné leur implication dans la régulation de nombreux processus physiopathologiques dont la prolifération et la survie cellulaire (Dreyffus *et al.*, 2009). Parmi les HBP, nous nous sommes en particulier intéressés aux FGFs connus pour se lier aux HSPGs qui jouent le rôle de co-récepteurs et former un complexe ternaire HS / FGF / FGFR biologiquement actif nécessaire à la transduction du signal (Turner et Grose, 2010). Parmi les FGFs, nous nous sommes intéressés au FGF-7 puisque des études ont permis de mettre en évidence l'implication de la 3-O-sulfatation des HS pour coordonner sa liaison à son récepteur (Ye *et al.*, 2001, Luo *et al.*, 2006). Le FGF-7 est sécrété par les cellules d'origine mésenchymateuses et exerce son activité biologique exclusivement par l'intermédiaire de son récepteur FGFR2IIIb, un variant spécifique du FGFR2, exprimé par les cellules épithéliales (Zhang *et al.*, 2006, Niu *et al.*, 2007). À la suite de la liaison du FGF, quatre voies de signalisation clés sont activées : Ras/Raf/MAPK, PI3K-Akt, les facteurs STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) et la voie de la phospholipase C (PLC) qui régulent des processus cellulaires majeurs (Turner et Grose, 2010). Une activation aberrante de la signalisation du FGFR2, par sa surexpression et/ou celle de ses ligands tels que le FGF-7, a été trouvée dans des lignées cellulaires de cancer du sein exprimant de façon prédominante l'isoforme IIIb du récepteur FGFR2. Cette altération de la signalisation du complexe FGF-7/FGFR2IIIb et contribue au processus oncogénique en activant les cascades de signalisation intracellulaire dépendante de ERK et Akt impliquées dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses mammaires (Bai *et al.*, 2010).

Nos résultats obtenus avec les cellules MCF-7 surexprimant la 3-OST3A sont contradictoires avec ceux d'études ayant montré l'implication des motifs sulfatés des HS dans la liaison des FGFs à leur récepteur. En particulier dans le cas du FGF2, il a été montré le rôle clé des motifs N, 2 et 6-O sulfatés des HS dans sa liaison à son récepteur FGFR et dans l'activation

d'une réponse cellulaire (Rapraeger *et al.*, 1991, Pye *et al.*, 1998). Cependant, nos travaux ont montré que la 3-*O*-sulfatation des HS diminue la liaison du FGF-7 à la surface des cellules MCF-7. Pour appuyer ce résultat, une étude récente réalisée sur les cellules MCF-7 a montré qu'une diminution de la 2-*O*-sulfatation des HS permet d'augmenter la liaison des FGF-1 et 2 au FGFR1 et donc à l'inverse, la 2-*O*-sulfatation diminue la liaison des FGFs à leur récepteur (Jung *et al.*, 2016). Ceci montre que la présence de motifs sulfatés sur les chaînes de HS n'est pas toujours corrélée à une augmentation de la liaison avec les facteurs de croissance et leur récepteur et qu'au contraire ces sulfatations peuvent diminuer la liaison FGF/FGFR. D'autre part, en se basant sur le fait que les HS sont capables d'induire la dimérisation du FGFR même en absence de ligand (Nieto *et al.*, 2013), nous suggérons un événement similaire pour expliquer nos résultats dans les cellules MCF-7 où la liaison des HS 3-*O*-sulfatés au FGFR2IIIb précéderait celle du FGF-7 rendant ainsi inaccessible le motif 3-*O*-sulfaté impliqué dans la liaison du FGF-7. Une autre possibilité repose sur la capacité de FRS2 α (*Fibroblast growth factor Receptor Substrate 2 alpha*), un effecteur intracellulaire clé de la transduction du signal du FGF, à induire l'internalisation et la dégradation du FGFR (Wong *et al.*, 2002). Dans notre cas, le FGFR2IIIb pourrait être dégradé contribuant à diminuer la liaison du FGF-7 et sa signalisation, ce que nous avons pu observer dans nos résultats. En effet, nous avons étudié les conséquences intracellulaires de la diminution de la liaison du FGF-7 à la surface cellulaire pour évaluer dans quelle mesure la 3-OST3A exerce un effet suppresseur de tumeur dans les cellules MCF-7 (LumA) et nous avons pu montrer une inhibition des signaux de prolifération par l'intermédiaire de la déphosphorylation de ERK et une stimulation des signaux apoptotiques via la déphosphorylation de Akt et la phosphorylation de p38, traduisant l'effet anti-tumoral de la surexpression de la 3-OST3A dans un modèle cellulaire de cancer du sein de sous-type LumA.

Nous avons montré à la fois *in vitro* et en clinique dans une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein que le niveau d'expression de la 3-OST3A est dépendant du sous-type moléculaire. Dans les cellules MCF-7 (LumA), l'expression basale de la 3-OST3A est relativement faible. Dans un contexte clinique, les patientes atteintes d'un cancer du sein de sous-type LumA, sont celles qui présentent le taux d'expression de la 3-OST3A le plus faible dans leurs tumeurs (en comparaison avec les autres sous-types). Cette observation suggère que la faible expression de la 3-OST3A chez les patientes LumA contribue au développement tumoral. Les résultats des tests cellulaires obtenus *in vitro* sur les cellules MCF-7 (LumA) viennent corroborer cette observation en mettant en évidence un effet suppresseur de tumeur quand la 3-OST3A est surexprimée et les résultats obtenus *in vivo* ont également permis de

mettre en évidence cet effet chez des souris xénotransplantées par les cellules MCF-7 surexprimant la 3-OST3A puisqu'elles présentent un retard dans le développement tumoral. Ceci montre que dans les cellules MCF-7, une forte expression de la 3-OST3A empêcherait le développement de la tumeur et donc expliquerait pourquoi chez les patientes atteintes du cancer du sein de sous-type LumA, le niveau d'expression de la 3-OST3A est faible pour permettre le développement de la tumeur.

De façon complémentaire, dans les cellules SKBR3 (HER2+), l'expression basale de la 3-OST3A est relativement élevée. En clinique, les patientes atteintes d'un cancer du sein de sous-type HER2+ sont celles qui présentent le taux d'expression de la 3-OST3A le plus élevé dans leurs tumeurs suggérant qu'une forte expression de la 3-OST3A chez les patientes HER2+ contribue au développement tumoral. Les tests cellulaires menés *in vitro* ont montré que la surexpression de la 3-OST3A est associée à un effet pro-prolifératif, et donc à une action pro-tumorale, résultat également conforté par l'étude clinique qui a montré une association entre la forte expression de la 3-OST3A et la rechute des patientes atteintes d'un cancer du sein de sous-type HER2+. Ces données montrent que dans les cellules SKBR3, une forte expression de la 3-OST3A promeut le développement tumoral.

L'ensemble de ces données suggère que le niveau d'expression de la 3-OST3A dans les tumeurs mammaires est directement associé à la biologie de la tumeur et que selon le sous-type de cancer de sein, son expression est régulée de façon à permettre le développement tumoral.

En plus d'avoir montré que le niveau d'expression de la 3-OST3A dans les tumeurs mammaires est dépendant du sous-type de cancer du sein, un résultat très important de ce travail de thèse a été l'identification d'une association entre le niveau d'expression de la 3-OST3A dans les tumeurs des patientes atteintes du cancer du sein de sous-type HER2+ et leur rechute. Une forte expression de la 3-OST3A est en effet corrélée négativement à une survie sans rechute. Par ailleurs, une étude menée sur une autre isoforme des 3-OSTs, la 3-OST2, a montré que l'extinction de son expression est corrélée négativement à la survie de patientes atteintes d'un cancer du poumon non à petites cellules (Hwang *et al*, 2013). Ces données suggèrent que l'expression des 3-OSTs dans le cancer du sein est associée à un effet pro-oncogénique ou suppresseur de tumeur en fonction du contexte tumoral.

En conclusion, cette première partie de travail de thèse, focalisée sur les fonctions de la sulfotransférase 3-OST3A dans un contexte tumoral, nous a permis de montrer que : (i) le

gène *3-OST3A* est épigénétiquement régulé dans les cellules de cancer du sein, **(ii)** la *3-OST3A* est un régulateur clé du comportement des cellules d'adénocarcinome mammaire en modulant leur prolifération, leur apoptose et leur réponse aux médicaments anticancéreux, comme le trastuzumab. Ses effets « pro-oncogéniques » ou « suppresseur de tumeur » sont de plus dépendants du sous-type moléculaire de la lignée. **(iii)** Dans un contexte clinique, la forte expression de la *3-OST3A* dans les tumeurs mammaires de sous-type HER2+ est associé à un risque accru de rechute des patientes et donc à un mauvais pronostic. Sa forte expression, associée à la présence d'une tumeur dont le diamètre est supérieur à 21 mm et à l'envahissement d'un ganglion lymphatique, permet de justifier la mise en place d'un traitement personnalisé.

Ces travaux sont les premiers à mettre en évidence un rôle oncogénique de la *3-OST3A*, capable de réguler le comportement tumoral et suggèrent la possibilité de l'utiliser comme marqueur pronostique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein de type HER2+.

Les résultats de l'étude clinique nous ont permis d'émettre l'hypothèse d'un effet oncogénique de la *3-OST3A* dans le contexte du cancer du sein HER2+. Ainsi, dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons cherché à expliquer les mécanismes moléculaires pouvant expliquer le caractère agressif des tumeurs mammaires de sous-type HER2+ en association avec une forte expression de la *3-OST3A*.

II. PARTIE II : LA 3-O-SULFATATION DES HÉPARANE SULFATES MÉDIÉE PAR LA 3-OST3A INDUIT L'ACTIVATION DU RÉCEPTEUR HER2 DANS LES CELLULES DE CANCER DU SEIN SKBR3

Sur la base des résultats de l'étude clinique de nos travaux (Mao/Gauche *et al.*, 2016) ayant montré que la forte expression de la 3-OST3A dans les tumeurs des patientes atteintes d'un cancer du sein de sous-type HER2+ est associée à un risque accru de rechute, nous avons émis l'hypothèse d'un effet oncogénique de la 3-OST3A dans ce sous-type de cancer du sein. De plus, les résultats des tests cellulaires ont montré que la surexpression de la 3-OST3A a un effet pro-prolifératif sur les cellules SKBR3 (HER2+) corroborant les données cliniques.

Les travaux réalisés au sein de notre laboratoire sont actuellement dédiés à la compréhension des mécanismes moléculaires permettant d'expliquer un renforcement de l'agressivité du cancer du sein HER2+ lorsque la 3-OST3A est fortement exprimée dans les tumeurs de ces patientes. Pour répondre à cette problématique, notre investigation s'est focalisée sur un modèle cellulaire d'adénocarcinome mammaire présentant les mêmes caractéristiques moléculaires que les patientes HER2+ de l'étude clinique : les cellules SKBR3 qui surexpriment le récepteur HER2 et qui ont été transfectées de façon à moduler, c'est-à-dire surexprimer l'enzyme ou inhiber l'expression de la 3-OST3A.

Les résultats de cette partie de mon travail de thèse sont préliminaires et en cours de vérification et de validation au laboratoire. Ces résultats feront l'objet d'une publication dont une première ébauche est présentée ici.

A. Résultats préliminaires

« Heparan sulfate 3-O-sulfation mediated by 3-OST3A induces HER2 activation in SKBR3 breast cancer cells »

ABSTRACT

Heparan sulfate proteoglycans (HSPG), located at the cell surface and into extracellular matrix, are able to control many physiopathological process such as proliferation and apoptosis through their ability to bind Heparin Binding Protein (HBP) *via* the sulfated motif on HS chains. Despite the abundance of known HBP, few of them have been identified as having a preferential binding to HS residues containing 3-O-sulfated glucosamine. It is now

established that HS chains are co-receptor of Fibroblasts Growth Factor (FGF) to enhance the binding between FGF and its receptor FGFR to allow the formation of a ternary complex HS/FGF/FGFR essential for signal transduction. In this context, in breast cancer, HS chains play a key role in binding of FGF, in particular FGF-2, and contribute to promote tumorigenesis. Our previous study showed an association between high 3-OST3A expression level into tumor tissues and poor clinical outcome in HER2+ subtype breast cancer patients and showed that an overexpression of 3-OST3A in SKBR3 (HER2+) cells exerts a pro-proliferative effect. We show that 3-OST3A overexpression promotes HER2 activation and signaling in SKBR3 (HER2+) breast cancer cells. Indeed, the expression level of HER2 phosphorylated form (pHER2) corresponding to HER2 receptor activated form, and phosphoAkt (pAkt), which is an intracellular effector of HER2 activation, are increased in SKBR3 cells overexpressing 3-OST3A. To explore the role of HS 3-O-sulfation mediated by 3-OST3A in HER2 activation, SKBR3 cells were treated by HB-EGF or FGF-7. We show that 3-OST3A overexpression did not affect HER2 phosphorylation induced by treatment with HB-EGF, a HER1 ligand, whereas FGF-7 treatment induced HER2 activation only when 3-OST3A was overexpressed in SKBR3 cells. This suggests that 3-OST3A induces transactivation of HER2 in a FGF-7 dependent manner. These data provide the preliminary evidence of molecular and cellular mechanisms by which the 3-OST3A improves the aggressiveness of HER2+ breast cancer.

Key words: Heparan sulfate, HS3ST3A, breast cancer, FGF-7, transactivation

INTRODUCTION

Over the last decades, studies have been carried on the mechanisms of breast cancer biology and improved treatments to increase the survival rate of patients. These studies have primarily focused on the genetic determinants elements involved in tumor progression and the role of the tumor microenvironment¹. Indeed, the study and targeting of the tumor microenvironment currently take an important place in the field of cancer research. The tumor process depends on interactions between tumor cells and the extracellular environment that controls the development of the primary tumor, and tumor progression through metastasis formation and dissemination². Our work focuses on the influence of a major cell plasma membrane and matrix component of the tumor microenvironment, called proteoglycans (PGs) and more specifically their glycosaminoglycan (GAG) chains. These complex macromolecules, including heparan sulfates (HS), strategically located into the extracellular matrices (ECM) or anchored to the cell plasma membrane, play a major role in controlling cell-cell and cell-matrix interactions. Within the tumor microenvironment, the HSPGs play a key role in cell adhesion, matrix assembly, storage and liberation of growth factors to regulate cell behavior and tumor progression³.

During their biosynthesis, HS are subjected to structural and functional modifications catalyzed by numerous enzymes, including HS-*O*-sulfotransferases⁴. These sulfations are responsible for interactions between HS and growth factors including fibroblast growth factor (FGF) for instance. The formation of a ternary complex HS/FGF/FGFR activates signaling pathways involved in particular in the proliferation and cell survival. In the tumor cell, the synthesis of HSPGs is frequently deregulated producing alterations in the structure of HS that alter their biological activity and contribute to the dysregulation of cell behavior. In breast cancer, HSPGs and particularly HS chains play a crucial role in the binding and the release of FGF from matrix, in particular FGF-2, to control signal transduction and signaling to promote tumorigenesis⁵. In breast tumor tissues, the formation of the complex HS / FGF-2 / FGFR1 is enhanced contributing to tumor aggressiveness⁶. However, HSPGs involvement in cancer is complex, either pro-oncogenic or tumor suppressor and dependent on cell and tissue context. Their biological role remains to be explored to validate their function and their use as a prognostic or predictive marker and design of new therapeutic approaches.

We previously identified the HS-sulfotransferase 3-OST3A as a novel tumor regulator exerting either tumor-suppressive or oncogenic properties in a cell-dependent context. Our clinical study showed that high 3-OST3A expression in breast tumor is associated with reduced survival of patients suffering for HER2+ (human epidermal growth factor receptor 2-

positive) breast cancer subtype. This study demonstrated the potential clinical value of the 3-OST3A as a prognostic marker in HER2+ breast cancer patients enabling stratification of patients for treatment⁷. The aim of the current work is to identify the molecular mechanisms underlying the capacity of 3-OST3A to promote the aggressiveness of the breast cancer HER2+ subtype using a cellular model, the SKBR3 cell line.

Here, we analyzed the influence of 3-OST3A overexpression on : (i) HER2 expression and its activated form (pHER2) in SKBR3 cells, (ii) HER2 signaling. We next studied the mechanisms of activation of HER2 following 3-OST3A overexpression.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and gene transfection

Human breast cancer cell line SKBR3 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France). SKBR3 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 4.5 g/L glucose supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS, Gibco), penicillin (1 U/mL)/streptomycin (1 µg/mL), L-glutamine (2 mM) and non-essential amino acids (NEAA, 0.1 mM) and grown at 37°C in a 5% CO₂ incubator under humidified atmosphere.

The plasmid pcDNA3.1(+)-3-OST3A-hemagglutinin (HA) or pcDNA3.1(+) was individually transiently transfected into SKBR3 cells. Transient transfections were performed by electroporation following manufacturer's recommendations (Nucleofector™ Protocols, Lonza). 3-OST3A siRNAs, which specifically target *3-OST3A* gene, were designed and synthesized by Eurogentec. Two 3-OST3A siRNAs (Table 1) and a negative control siRNA (Qiagen) were transfected in SKBR3 cells by electroporation following the manufacturer's recommendations (Nucleofector™ Protocols, Lonza). 3-OST3A overexpression and siRNA inhibition efficiency were analyzed 48h after transfection by immunodetection of the recombinant 3-OST3A-HA protein using anti-HA antibodies and by RT-qPCR analysis of 3-OST3A mRNA level (>80%) using primers listed in Table 2.

Table 1. Synthetic siRNA sequences used for RNA interference experiments

Gene	RefSeq Genbank	Sequence		Size (bp)	Position	Efficiency	
						RNA (%)	Protein (%)
<i>3-OST3A</i>	NM_006042.1	Target 1	5'-CGTCCCTTTACGTCTTCTA-3'	19	899-917	88.3 ± 6.3	ND
		Sense 1	5'-CGUCCCUUUACGUCUUCUA-3'				
		Antisense 1	5'-UAGAAGACGUAAAGGGACG-3'				
		Target 2	5'-ATCTGGTAGAACTTGAGGT-3'	19	1970-1988	71.7 ± 4.9	ND
		Sense 2	5'-ACCUCAAGUUCUACCAGAU-3'				
		Antisense 2	5'-AUCUGGUAGAACUUGAGGU-3'				

Experiments were performed using two sets of 3-OST3A siRNA (1 and 2). Efficiency of siRNA inhibition was evaluated using MCF-7 which stably expressed 3-OST3A. 3-OST3A mRNA level was evaluated by RT-qPCR (mean ± SEM, n=3) and protein expression by immunoblotting using anti-HA antibodies, ND, not detectable (n=3).

Table 2. Sequences of primers used for RT-qPCR analysis

Gene	Primers		Size of the amplified fragment (bp)	T _m (°C)
<i>3-OST3A</i>	Sense	5'-CAGTGCCCTCTCCACCTC-3'	108	60
	Antisense	5'-GCCAGGCAGTAGAAGACGTAA-3'		

SKBR3 treatments with growth factors (HB-EGF or FGF-7) and with conditioned medium

24h after transfection with 3-OST3A-HA cDNA or with empty vector, SKBR3 cells were serum-starved for 24h before being treated with recombinant human FGF-7 (R&D system, 0.5 ng/ml) for 10, 20 and 30 minutes or with HB-EGF (Sigma-Aldrich, 1 µg/mL) for 10, 20 and 30 minutes.

Culture medium of SKBR3 transfected cells, called conditioned medium, was used as culture medium for SKBR3 (untransfected) cells for 10, 20 and 30 minutes.

Cell proliferation assay

SKBR3 cells transfected with (i) 3-OST3A-HA or empty vector or (ii) with siRNA 3-OST3A or control siRNA were seeded onto 24-well plates at a density of 4×10^4 cells per well. 24h after transfection, cells were harvested each day during a 4-day period by scraping in 50 μ L lysis buffer (1% (w/v) SDS-PBS). Cell proliferation was evaluated by measuring the DNA content in each sample by spectrofluorimetry using the Quant-iT dsDNA HS Assay kit (Invitrogen).

Protein extraction and western blotting

SKBR3 cells cultured in 6-well plates were harvested and lysed in 100 μ L of lysis buffer containing 1% (v/v) NP-40, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 137 mM NaCl, 10% glycerol (w/v), 2 mM EDTA supplemented with protease and phosphatase inhibitor mixture (Roche). Protein concentration was determined by using a Bradford protein assay kit (Biorad). Lysates containing 20 μ g of proteins were subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) on 10% (w/v) polyacrylamide gels. Proteins were transferred onto Immobilon-P[®] polyvinylidene (PVDF) membrane (Millipore) and incubated in the presence of primary antibodies listed in Table 3. Following incubation with anti-mouse or anti-rabbit peroxidase conjugated secondary antibodies (Cell Signal Technology), proteins were visualized by the Enhance Chemiluminescence (ECL) western blot detection kit (Santa Cruz).

The protein analysis was also performed on SKBR3 transfected cells treated with 0 and 40 μ g/mL of trastuzumab 24 h after transfection. Trastuzumab was kindly provided by Dr. Catherine Vallance (Institut de Cancérologie de Lorraine, Vandœuvre-les-Nancy, France).

Table 3. Primary antibodies and experimental conditions used for immunoblotting experiments in protein expression analysis.

Primary antibodies	Providers	Sources	Dilutions
HER2/ErbB2 (29D8)	Cell Signaling Technology	rabbit	1 :1000
Phospho-HER2/ErbB2 (Tyr1221/1222) (6B12)	Cell Signaling Technology	rabbit	1:1000
Phospho-AKT (Ser473)	Cell Signaling Technology	rabbit	1:1000
Anti-HA	Sigma-Aldrich	rabbit	1:10,000
β -actine	Sigma-Aldrich	mouse	1:3000
Anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	Cell Signaling Technology	goat	1:2000
Anti-mouse IgG, HRP-linked antibody	Cell Signalling Technology	horse	1:2000

RESULTS

3-OST3A promotes HER2 activation and signaling

We investigated the consequences of 3-OST3A transfection on HER2 expression and activation by immunoblot analysis (Figure 1). Our results showed a 2-fold increase of HER2 phosphorylated form (pHER2) in SKBR3 cells transfected with 3-OST3A cDNA compared to control cells. 3-OST3A did not significantly affect unphosphorylated HER2 receptor expression (Figure 1a), suggesting that 3-OST3A promotes HER2 activation. Furthermore, an increase in phosphorylated Akt (pAkt) was observed in SKBR3 cells overexpressing 3-OST3A compared to untransfected cells (Figure 1b). Trastuzumab was tested as a specific inhibitor of HER2 activation. Our results showed that this anti-HER2 antibody reduced in untransfected SKBR3 cells and to larger extent in 3-OST3A overexpressing cells, indicating that Akt phosphorylation was due to HER2 activation.

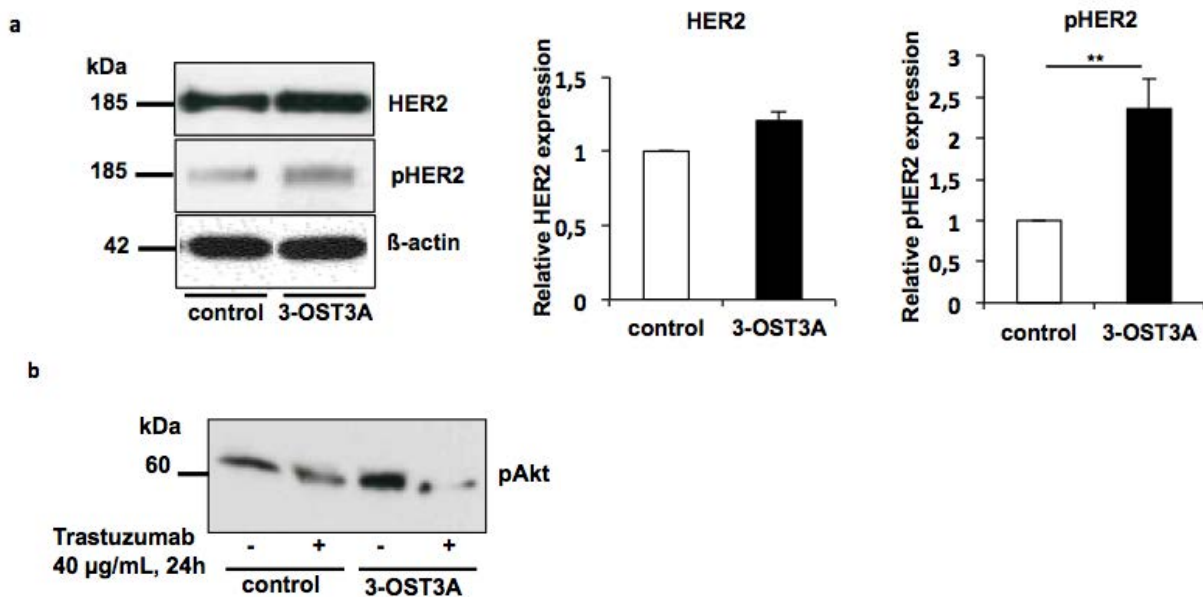


Figure 1. 3-OST3A overexpression enhances HER2 activation and signaling in SKBR3 breast cancer cells. **(a)** Immunoblot analysis of HER2 protein and its phosphorylated form pHER2 in SKBR3 cells transfected with empty vector (control) or 3-OST3A cDNA (3-OST3A). Quantitative analysis of protein expression was carried out using Image J software. Expression level of each protein is expressed relative to control cells (set to 1). ** $P < 0.01$, $n = 3$. **(b)** Immunoblot analysis of HER2 downstream signaling analyzing Akt phosphorylation in SKBR3 overexpressed 3-OST3A cells. Specificity of HER2 signaling was controlled using trastuzumab as specific inhibitor of HER2 activation. $n = 1$.

3-OST3A induces transactivation of HER2 in a FGF-7 dependant manner

To understand the molecular mechanisms of HER2 activation and the role of HS 3-*O*-sulfation mediated by 3-OST3A, we have envisaged two hypotheses.

We first tested a direct involvement of 3-*O*-sulfated HS mediated by 3-OST3A in HER2 activation. In this context, HS would act as co-receptors of HER ligands to favor their binding and consequently induce HER2 activation by heterodimerization with other members of HER family. To test this possibility, we treated 3-OST3A-transfected (and empty-plasmid transfected) SKBR3 cells with HB-EGF, a HER1 ligand, and analyzed pHER2 expression level by western-blot using specific anti-pHER2 antibody. As expected, HB-EGF treatment increased the level of phosphorylated HER2, confirming its activation in presence or absence of 3-OST3A overexpression (Figure 2a). However, no difference in pHER2 expression level was observed in the two conditions suggesting that 3-*O*-sulfated HS did not induce HER2 activation through HB-EGF treatment.

Our second hypothesis postulated an indirect involvement of 3-*O*-sulfated HS in HER2 activation through FGF-7 transactivation. To test this possibility, we treated 3-OST3A-transfected (and empty-plasmid transfected) SKBR3 cells with FGF-7 before assessing

pHER2 level. We showed that pHER2 level was increased after FGF-7 treatment in presence or absence of 3-OST3A. Interestingly, HER2 activation seem to be promoted following a FGF-7 treatment when 3-OST3A was overexpressed, suggesting that 3-*O*-sulfated HS enhance HER2 activation through FGF-7 (Figure 2b).

In that context, HS/FGF-7/FGFR2-IIIb signaling would allow the release of an effector resulting in HER2 activation. To investigate whether a soluble ligand could be released into the extracellular medium, we performed conditioned medium experiments. We showed an slight increase of pHER2 expression when SKBR3 cells were cultured with conditioned medium from SKBR3 cells transfected with 3-OST3A cDNA in comparison to empty plasmid-transfected cells (Figure 2c), supporting the hypothesis of a soluble effector released in cell culture media after 3-OST3A overexpression.

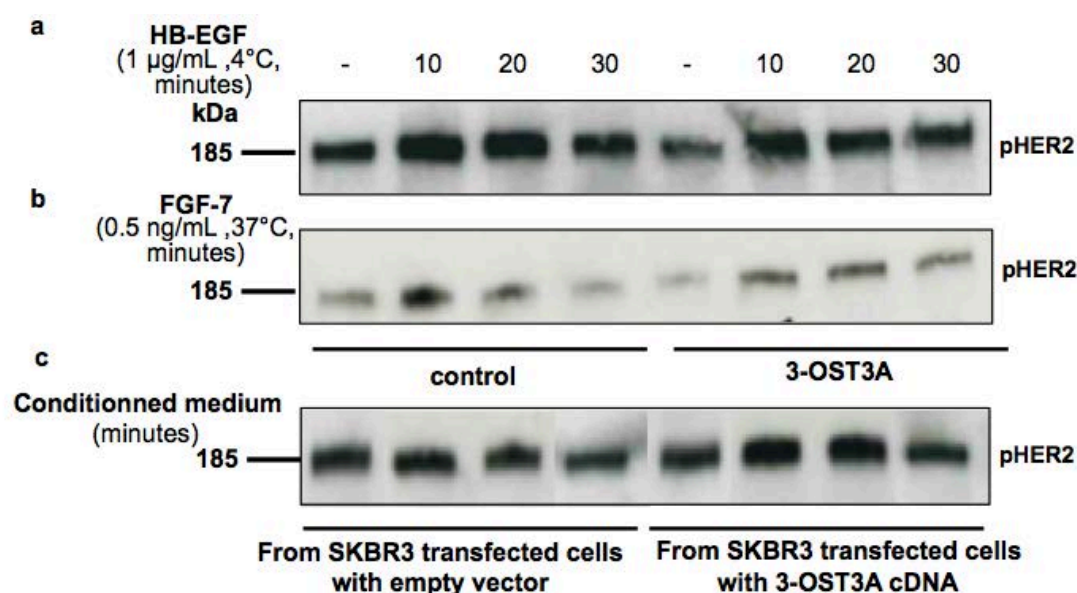


Figure 2. Effect of HB-EGF and FGF-7 on HER2 activation. SKBR3 cells transfected with empty vector (control) or 3-OST3A cDNA (3-OST3A) were serum-starved for 24h and treated with HB-EGF (a) or FGF-7 (b). pHER2 expression level was increased after HB-EGF treatment but no difference was observed between control and 3-OST3A. pHER2 expression level was also increased after FGF-7 treatment and HER2 activation was enhanced in 3-OST3A-expressing cells. (c) Culture supernatant of empty vector (left) or 3-OST3A-transfected (right) SKBR3 cells was used as culture medium for SKBR3 cells for 10, 20 and 30 minutes. Experiment with conditioned medium from SKBR3 cells transfected with 3-OST3A cDNA shows an increase of pHER2 expression level.

DISCUSSION

HSPGs are key components of the tumor microenvironment and there are involved in cell adhesion, ECM assembly, storage and regulation of growth factors that affect cell behavior and tumor progression³. We recently showed that high 3-OST3A expression, an

enzyme catalyzing HS 3-*O*-sulfation, is correlated with an increased risk of relapse in breast cancer patients diagnosed with HER2+ subtype⁷. One of the best-known mechanisms by which HS sulfation contributes to the tumor process involves the formation of a ternary complex between HS, FGF and their receptor FGFR. In this study, we examined the possibility that such a mechanism may explain our clinical observation indicating that 3-OST3A expression is associated with enhanced aggressiveness of HER2+ breast cancer subtype.

For that purpose, we used the SKBR3 breast cancer cell line as a cellular model as it exhibits the same molecular signature as HER2+ patients. SKBR3 cells overexpress HER2 receptor that causes the aggressive nature of this breast cancer subtype. We modulated 3-OST3A expression using a gain or loss of function approach by cDNA or siRNA transfection, respectively.

In a previous study, we showed that 3-OST3A overexpression in SKBR3 cells promotes proliferation whereas its silencing produces the reverse effect⁷. This result suggested that 3-OST3A-mediated HS modification alters HER2 receptor-mediated signaling pathway promoting its activation. Indeed, uncontrolled proliferation of HER2+ breast cancer cells results from HER2 receptor overexpression and its activation through phosphorylation of tyrosine residues located in intracellular domain of HER2 receptor and known to be important for activation of the receptor such as tyrosine 1221/1222 and tyrosine 1248⁸.

We have studied (i) HER2 expression level, (ii) its activation through pHER2 expression analysis and (iii) its signaling evaluating pAkt expression level in SKBR3 cells overexpressing 3-OST3A. We showed that 3-OST3A overexpression has promoted HER2 activation and signaling with an increase of pHER2 and pAKT expression levels respectively. Specificity of Akt activation following HER2 activation was confirmed using trastuzumab as inhibitor of HER2 activation since pAkt was markedly reduced upon trastuzumab treatment.

To explain the role of HS 3-*O*-sulfation mediated by 3-OST3A in HER2 activation, we issued two hypotheses: (i) 3-*O*-sulfated HS would act as co-receptors of HER ligands and in that case, HS 3-*O*-sulfation would be directly involved in HER2 activation, (ii) 3-*O*-sulfated-HS would act as co-receptors of FGF to form a ternary complex HS/FGF/FGFR, which could induce HER2 signaling through a transactivation process. 3-OST3A overexpression did not change HER2 phosphorylation induced by treatment with HB-EGF, a prototypic ligand of HER1, suggesting that the involvement of 3-OST3A in HER2 activation in SKBR3 cells did

not depend on a direct mechanism through ligands of HER receptors. However, other ligands such as amphiregulin should be further tested to confirm that point.

To explore the hypothesis of an indirect involvement of 3-*O*-sulfation in HER2 activation, we treated SKBR3 cells with FGF-7. It was now established that HS act as co-receptors of many ligands, including growth factors, and more particularly the FGF family. The interactions between HS and FGF-2 depend on the presence of *N*-sulfation of glucosamine and 2-*O*-sulfation of IdoA on the HS chain⁹ and the activity of FGF-2, quantified by proliferation assay, depend on 6-*O*-sulfation of glucosamine residue on the HS chain¹⁰. It has also been shown that FGFR-1 bind to HS which bind with AT, showing the involvement of 3-*O*-sulfation in this context¹¹, in contrast 3-*O*-sulfation did not affect the binding of FGF-1 and-2 to the HS¹². However, previous studies have suggested that HS 3-*O*-sulfation could be involved in FGF-7 binding^{12,13} and that 3-*O*-sulfated HS/FGF-7 and its cognate receptor FGFR2-IIIb form a biologically active ternary complex¹⁴. Moreover other studies showed HER2 activation following the formation of ternary complex HS/FGF/FGFR indicating that the FGF-7/FGFR2 complex is responsible of HER2 transactivation¹⁵. However, the role of HS 3-*O*-sulfation in this context has not been yet fully established.

Our results show FGF-7 induced HER2 activation only when 3-OST3A was expressed in SKBR3 cells. This suggested that an indirect effect of 3-*O*-sulfated HS mediated in HER2 activation wherein 3-OST3A induces transactivation of HER2 in a FGF-7 dependent manner. Transactivation mechanism is supported by the conditioned medium experiments in which SKBR3 cells cultivated with supernatant of SKBR3 cells overexpressing 3-OST3A showed HER2 activation. This suggested that a soluble HER ligand is secreted into extracellular medium when 3-OST3A was overexpression and that HS 3-*O*-sulfation.

In conclusion, we showed that the sulfotransferase 3-OST3A, involved in the final step of HS maturation enhances the aggressiveness of HER2+ breast cancer subtype by promoting the activation of HER2 receptor in SKBR3 (HER2+) cells. Our results suggest that 3-OST3A induced transactivation of HER2 in a FGF-7 dependent manner. Additional experiments are currently performed in our laboratory to verify this point.

REFERENCES

1 Gomes, A.M., Stelling, M.P., and Pavão, M.S.G. (2013). Heparan sulfate and heparanase as modulators of breast cancer progression. *Biomed Res Int* 2013, 852093.

- 2 Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* *17*, 320–329.
- 3 Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*.
- 4 Kusche-Gullberg, M., and Kjellén, L. (2003). Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *13*, 605–611.
- 5 Maeda, T., Desouky, J., and Friedl, A. (2006). Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis. *Oncogene* *25*, 1408–1412.
- 6 Mundhenke, C., Meyer, K., Drew, S., and Friedl, A. (2002). Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *Am. J. Pathol.* *160*, 185–194.
- 7 Mao, X., Gauche, C., Coughtrie, M.W.H., Bui, C., Gulberti, S., Merhi-Soussi, F., Ramalanjaona, N., Bertin-Jung, I., Diot, A., Dumas, D., et al. (2016). The heparan sulfate sulfotransferase 3-OST3A (HS3ST3A) is a novel tumor regulator and a prognostic marker in breast cancer. *Oncogene* *35*, 5043–5055.
- 8 Schulze, W.X., Deng, L., and Mann, M. (2005). Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol. Syst. Biol.* *1*, 2005.0008.
- 9 Maccarana, M., Casu, B., and Lindahl, U. (1993). Minimal sequence in heparin/heparan sulfate required for binding of basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* *268*, 23898–23905.
- 10 Pye, D.A., Vives, R.R., Turnbull, J.E., Hyde, P., and Gallagher, J.T. (1998). Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* *273*, 22936–22942.
- 11 McKeehan, W.L., Wu, X., and Kan, M. (1999). Requirement for anticoagulant heparan sulfate in the fibroblast growth factor receptor complex. *J. Biol. Chem.* *274*, 21511–21514.
- 12 Ye, S., Luo, Y., Lu, W., Jones, R.B., Linhardt, R.J., Capila, I., Toida, T., Kan, M., Pelletier, H., and McKeehan, W.L. (2001). Structural basis for interaction of FGF-1, FGF-2, and FGF-7 with different heparan sulfate motifs. *Biochemistry* *40*, 14429–14439.
- 13 Luo, Y., Ye, S., Kan, M., and McKeehan, W.L. (2006). Structural specificity in a FGF7-affinity purified heparin octasaccharide required for formation of a complex with FGF7 and FGFR2IIIb. *J. Cell. Biochem.* *97*, 1241–1258.
- 14 Turner, N., and Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 116–129.
- 15 Wei, W., Liu, W., Serra, S., Asa, S.L., and Ezzat, S. (2015). The breast cancer susceptibility FGFR2 provides an alternate mode of HER2 activation. *Oncogene*.

B. Principaux résultats

Nous avons, en collaboration avec l'équipe de Jean-Christophe Bourdon (Université de Dundee, Dundee, Ecosse, UK), pu mettre en évidence que la forte expression de la 3-OST3A, une enzyme catalysant la 3-O-sulfatation des HS, est corrélée à un risque accru de rechute des patientes atteintes d'un cancer du sein de sous-type HER2+ (Mao/Gauche *et al.*, 2016). Dans un contexte où l'un des rôles de la sulfatation des HS est de contribuer à la formation de sites d'interactions spécifiques pour les facteurs de croissance, comme le FGF, conduisant à la formation de complexes biologiquement actifs HS / FGF / FGFR qui pourraient favoriser la progression tumorale dans le cancer du sein, notre objectif a alors été d'identifier les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer comment la surexpression de la 3-OST3A peut renforcer l'agressivité du sous-type de cancer du sein HER2+.

Afin d'évaluer le rôle biologique de la 3-OST3A sur le comportement des cellules SKBR3 (HER2+ ; ER- ; PR-), nous avons, au cours de nos travaux, réalisé des tests de prolifération cellulaire suivant une approche de gain ou de perte de fonction *in cellulo*. Nous avons mis en évidence que la surexpression de la 3-OST3A a un effet pro-prolifératif alors que l'inhibition de l'expression de la 3-OST3A par des siARN produit un effet anti-prolifératif. De façon intéressante, ces résultats corroborent ceux de l'étude clinique puisque les patientes HER2+ présentant une forte expression de la 3-OST3A au sein de leur tumeur présentaient un risque accru de rechute, témoignant d'un regain de la progression tumorale et donc pouvant se traduire par une prolifération importante des cellules tumorales (Mao/Gauche *et al.*, 2016).

Sur ces bases, nous avons cherché à établir l'influence de la surexpression de la 3-OST3A sur l'expression du récepteur HER2 et sur son activation en analysant le niveau d'expression de sa forme phosphorylée (active) pHER2. En effet, dans le cancer du sein de sous-type HER2+, la surexpression et/ou l'hyperactivation du récepteur HER2 sont à l'origine entre autres d'une prolifération cellulaire incontrôlée et pourrait permettre de faire le lien avec le caractère agressif de ce type de tumeur et le taux de rechute accru des patientes dont les tumeurs présentent un fort taux d'expression de la 3-OST3A. Les analyses du niveau d'expression protéique du récepteur HER2 et de sa forme phosphorylée pHER2 suite à la surexpression de la 3-OST3A dans les cellules SKBR3 ont permis de montrer que la surexpression de la 3-OST3A n'a pas d'effet sur le niveau d'expression du récepteur HER2, mais semble augmenter l'expression de la forme phosphorylée, pHER2. En réponse à l'activation du récepteur HER2, différentes voies de signalisation cellulaires sont susceptibles

d'être activées notamment celle impliquant PI3K-Akt et MAPK-ERK, responsable de la survie cellulaire et de la prolifération respectivement. Le niveau d'expression de pAkt (forme phosphorylée d'Akt) semble légèrement augmenté dans les cellules surexprimant la 3-OST3A. Cependant, la protéine Akt pouvant être activée (phosphorylée) par plusieurs voies de signalisation, nous avons voulu vérifier la spécificité de cette activation en traitant les cellules au trastuzumab, un anticorps monoclonal anti-HER2, qui bloque spécifiquement le récepteur HER2 et empêche son activation. Une diminution de l'expression de pAkt a été observée suite au traitement par le trastuzumab, attestant que l'activation d'Akt est bien consécutive à celle de HER2 dans nos conditions expérimentales. Ces données ont mis en évidence que la surexpression de la 3-OST3A dans les cellules SKBR3 permettrait d'activer le récepteur HER2 et l'une des voies de signalisation associées (voie PI3K-Akt). Nos précédents résultats avaient montré que la surexpression de la 3-OST3A n'induit pas l'apoptose des cellules SKBR3 (Mao/Gauche *et al.*, 2016) et ces travaux nous permettent d'expliquer ce phénomène puisque la 3-OST3A induit l'activation de la voie PI3K-Akt impliqué dans la survie cellulaire.

D'autre part, le niveau d'expression de pErk (forme phosphorylée de Erk) a également été évalué suite à la surexpression de la 3-OST3A dans les cellules SKBR3 dans la mesure où la voie de signalisation des MAPK/ERK est susceptible d'être activée suite à l'activation de HER2. Nos résultats ont révélé que le niveau d'expression de pErk était le même entre les cellules contrôles et les cellules surexprimant la 3-OST3A (données non montrés) et donc il semblerait que la 3-O-sulfatation n'ait pas d'influence dans ce contexte. Or une étude basée sur l'analyse immuohistochimique de tumeurs primaires et métastatiques de cancer du sein a évalué le niveau de pErk dans ces tumeurs selon des scores allant de 0 à 2 signifiant respectivement une absence d'expression et une expression forte. Il a été montré une proportion légèrement plus importante de tumeurs n'exprimant pas pErk. Par ailleurs, les niveaux d'expression des protéines effectrices pAkt et pErk ont été évalués en fonction de l'expression de pHER2. Alors que le niveau d'expression de pAkt est corrélé positivement à celui de pHER2, aucune corrélation n'a été établie entre pErk et pHER2 (Frogne *et al.*, 2009). L'ensemble de ces données montre que d'une part que pErk est dans la plupart des cas non exprimé dans ces tumeurs mammaires et d'autre part que l'activation du récepteur HER2 n'est pas un événement cellulaire induisant forcément l'activation de Erk et donc permettrait d'expliquer notre résultat. Cependant, ces résultats sont préliminaires et en cours de vérification dans notre laboratoire.

Ce travail a été poursuivi en investiguant les mécanismes moléculaires pouvant permettre l'activation du récepteur HER2 dans les cellules SKBR3 suite à la surexpression de la 3-OST3A. Deux hypothèses ont été émises :

(1)-La première hypothèse impliquerait un rôle direct des HS 3-*O*-sulfatés (dont la 3-*O*-sulfatation est catalysée par la 3-OST3A) dans l'activation du récepteur HER2. Dans cette hypothèse, les HS agiraient en tant que corécepteurs des ligands des récepteurs HERs. L'activation des récepteurs HERs suite à la fixation d'un de leur ligand pourrait donc permettre celle de HER2 par hétérodimérisation (Figure 38).

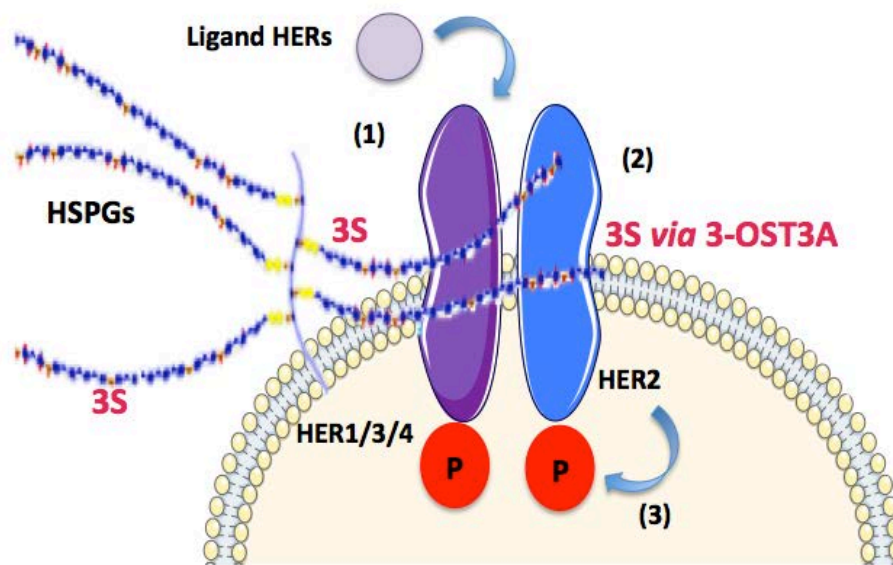


Figure 38. Représentation schématique de l'hypothèse du rôle direct des HS 3-*O*-sulfatés dans l'activation du récepteur HER2

L'hypothèse du rôle direct des HS 3-*O*-sulfatés dans l'activation du récepteur HER2 place les HS 3-*O*-sulfatés en tant que corécepteurs des ligands des récepteurs HERs (1), les récepteurs HER1/3 ou 4 activés par la fixation d'un de leur ligand peuvent s'hétérodimériser avec le récepteur HER2 (2) conduisant à son activation par phosphorylation et à la phosphorylation de protéines cible à l'origine des cascades de signalisation intracellulaires. (3). 3S : 3-*O*-sulfatation des chaînes de HS médiée par la 3-OST3A.

(2)-La deuxième hypothèse impliquerait un rôle indirect des HS 3-*O*-sulfatés dans l'activation de HER2. Dans ce cas, les HS joueraient le rôle de corécepteurs pour d'autres récepteurs, comme les récepteurs aux facteurs de croissance, qui de par leur activation et la signalisation cellulaire induite, permettraient à leur tour une activation du récepteur HER2 par transactivation (Figure 39).

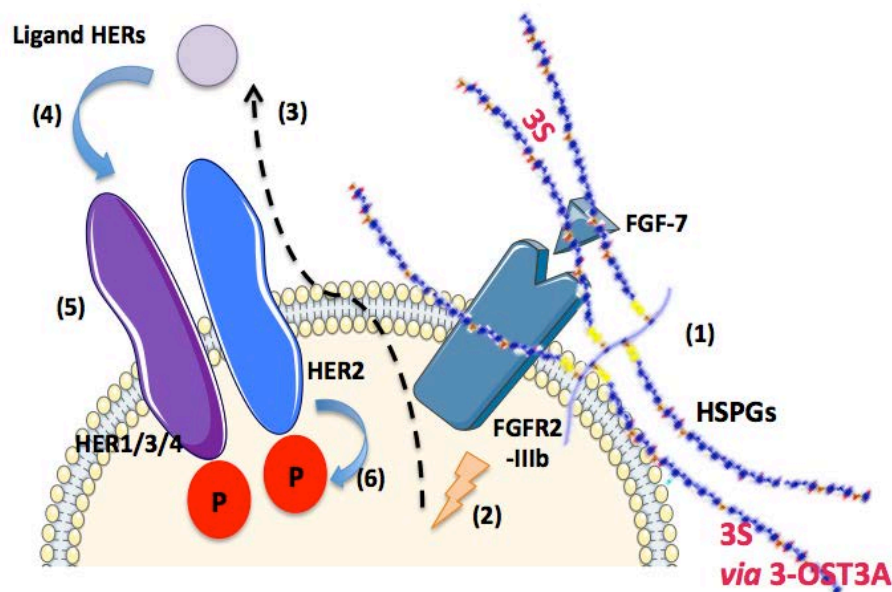


Figure 39. Représentation schématique de l'hypothèse du rôle indirect des HS 3-O-sulfatés dans l'activation du récepteur HER2

L'hypothèse du rôle indirect des HS 3-O-sulfatés dans l'activation du récepteur HER2 place les HS 3-O-sulfatés en tant que corécepteurs du FGF-7 pour former un complexe ternaire HS / FGF-7 / FGFR2-IIIb (1) permettant d'activer des voies de signalisation intracellulaires (2) aboutissant à la libération des ligands des récepteurs HERs sous forme soluble dans les matrices extracellulaires (3). Les ligands HERs ainsi sécrétés peuvent se fixer sur leur récepteur HER (4) permettant son hétérodimérisation avec le récepteur HER2 (5) et son activation par phosphorylation (6). 3S : 3-O-sulfatation des chaînes de HS médiée par la 3-OST3A.

Afin d'explorer ces deux hypothèses dans les cellules SKBR3 surexprimant la 3-OST3A, nous avons stimulé les cellules par différents ligands : (i) l'HB-EGF, ligand de HER1, afin d'explorer l'hypothèse du rôle direct des HS 3-O-sulfatés dans l'activation de HER2 et (ii) le FGF-7, ligand du récepteur FGFR2, dans le but d'explorer l'hypothèse d'un rôle indirect des HS 3-O-sulfatés dans la transactivation de HER2. Les premiers résultats obtenus de façon préliminaire indiqueraient que le traitement des cellules SKBR3 par l'HB-EGF, permettrait une augmentation de l'expression de la forme phosphorylée de HER2, témoin de son activation suite à une hétérodimérisation avec HER1. Cependant la surexpression de la 3-OST3A ne semble pas modifier cette observation puisque le niveau d'expression de pHER2 est le même que celui des cellules ne surexprimant pas la 3-OST3A. Ce résultat suggérerait donc que l'activation de HER2 suite à la surexpression de la 3-OST3A ne se ferait pas par un mécanisme direct impliquant les ligands des récepteurs HERs. Cependant il est nécessaire que nous testions d'autres ligands des récepteurs HERs, en particulier l'amphiréguline connue pour interagir avec les HS et son récepteur HER1 (Piepkorn *et al.*, 1998), et également la neuréguline 1 qui interagit avec les HS en particulier en présence de motifs N-sulfatés pour

augmenter l'activation de ses récepteurs HER3 et HER4 (Pankonin *et al.*, 2005) afin de valider cette hypothèse.

Concernant l'hypothèse d'une activation indirecte de HER2, il semble que le traitement des cellules SKBR3 par le FGF-7 permettrait une activation de HER2 prolongée dans le temps lorsque les cellules surexpriment la 3-OST3A par rapport aux cellules ne la surexprimant pas. Ce résultat serait ainsi en faveur d'un mécanisme d'activation indirect de HER2 consécutivement à l'activation d'autres voies de signalisation. Selon cette hypothèse, les HS membranaires 3-*O*-sulfatés augmenteraient la fixation du FGF-7 à son récepteur FGFR2-IIIb. La signalisation activée par le complexe ternaire HS/FGF-7/FGFR2-IIIb serait alors capable à son tour d'activer HER2 par un mécanisme qui reste à déterminer.

S'il s'avère que l'hypothèse d'une activation indirecte de HER2 par le FGF-7 est validée, il restera à comprendre comment la voie de signalisation médiée par le FGF-7 peut activer HER2. Pour étudier cela, nous avons commencé des expériences utilisant un milieu conditionné dans lesquelles le milieu de culture des cellules SKBR3 surexprimant la 3-OST3A a été mis au contact de cellules SKBR3 dont nous avons évalué le niveau d'expression de pHER2. Nos résultats semblent montrer qu'au contact du milieu conditionné, l'activation du récepteur HER2 est augmentée, suggérant la présence d'un facteur extracellulaire produit dans le milieu conditionné par les cellules surexprimant la 3-OST3A permettant l'activation de HER2 dans des cellules SKBR3 en culture mises au contact de ce milieu. L'étape suivante de cette investigation sera d'identifier le facteur qui est sécrété dans le milieu extracellulaire et qui est susceptible d'activer les récepteurs HERs puis HER2 par hétérodimérisation.

En résumé, nous avons ainsi pu montrer que **(i)** la 3-OST3A augmente l'expression de la forme phosphorylée du récepteur HER2 (pHER2), témoin de son activation, **(ii)** nos résultats préliminaires suggèreraient que la 3-OST3A induise également l'activation de la signalisation intracellulaire de HER2 empruntant la voie Akt et **(iii)** la 3-*O*-sulfatation médiée par la 3-OST3A permettrait une activation indirecte de HER2, appelée transactivation, en favorisant la formation d'un complexe HS / FGF-7 / FGFR2-IIIb capable d'induire à son tour l'activation de HER2.

C. Discussion et Conclusions

Les HSPGs, présents dans les MEC et à la surface des cellules sont capables d'interagir avec de nombreuses HBP (*Heparin Binding Proteins*) incluant des facteurs de croissance, des cytokines et des protéines de la MEC. Ces interactions entre les HS et les HBP sont à l'origine de la régulation de nombreux processus physiopathologiques tels que l'assemblage des MEC, la prolifération, l'adhésion, la migration, l'angiogenèse, la survie cellulaire et la différenciation (Dreyffus *et al.*, 2009). Ces interactions avec les HBP sont également importantes en situation pathologique, en régulant différents aspects de la cancérogenèse incluant la progression tumorale et la formation de métastases (Sasisekharan *et al.*, 2002) et de nombreuses autres pathologies telles que les maladies possédant une composante inflammatoire comme les maladies inflammatoires de l'intestin (Patterson *et al.*, 2012) et les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Bruinsma *et al.*, 2010).

Malgré l'abondance des HBP connues, à ce jour peu d'entre elles ont été identifiées comme ayant une liaison préférentielle aux HS contenant des résidus glucosamines 3-*O*-sulfatés (Thacker *et al.*, 2016). En effet, bien que les travaux de Ye *et al.*, (2001) et Luo *et al.*, (2006) aient mis en évidence l'implication de la 3-*O*-sulfatation des HS dans la fixation du FGF-7, le rôle biologique de cette interaction sur l'activation de voies de signalisation intracellulaires sous-jacentes reste encore mal connu.

Des études sur la compréhension de la biologie du cancer, en particulier du cancer du sein, se sont intéressées au microenvironnement de la tumeur. En effet, grâce à ses multiples composants, ce dernier est capable d'interagir avec des cellules tumorales pour permettre le développement de la tumeur primaire et la formation de métastases (Bissell et Hines, 2011). Dans le microenvironnement tumoral, les HSPGs membranaires et matriciels tiennent une place centrale en raison de leur implication dans l'adhésion des cellules, l'assemblage de la MEC, le stockage et le relargage de facteurs de croissance, permettant de réguler le comportement cellulaire et la progression tumorale (Sarrazin *et al.*, 2011). Dans la cellule tumorale, la synthèse et/ou la maturation des HSPGs sont fréquemment dérégulées, produisant des altérations de la structure des HS qui modifient leur activité biologique et contribuent à la dérégulation du comportement cellulaire. Dans le cancer du sein, les HSPGs et plus particulièrement les chaînes de HS, jouent un rôle crucial dans la fixation, le relargage et la transduction du signal des FGFs, en particulier du FGF-2, dans la promotion de la tumorigenèse (Maeda *et al.*, 2006). Dans les tissus tumoraux mammaires, la formation du

complexe HS / FGF-2 / FGFR1 est augmentée, activant la prolifération cellulaire et contribuant à l'agressivité tumorale (Mundhenke *et al.*, 2002).

Au cours de ma thèse, les résultats d'une étude clinique réalisée dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Dundee (J-C Bourdon, LIA *SFGEN*) ont permis de mettre en évidence une association entre les cancers du sein de sous-type HER2+, le taux d'expression de la 3-OST3A et la rechute des patientes. Un taux de rechute proche de 50% a été observé chez les patientes dont les tumeurs présentaient un fort taux d'expression de la 3-OST3A, indiquant que la forte expression de la 3-OST3A serait associée à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes d'un cancer du sein de sous-type HER2+. Suite à ces résultats, l'objectif majeur de cette deuxième partie de mon travail de thèse a été d'essayer d'étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de l'activation du récepteur HER2 dans les cellules SKBR3 (HER2+) suite à la surexpression de la 3-OST3A afin de comprendre comment la 3-OST3A favorise le caractère agressif du cancer du sein de sous-type HER2+.

L'activation du récepteur HER2, par homodimérisation spontanée ou hétérodimérisation avec les autres récepteurs HER, (Smith *et al.*, 1996 ; Graus-Porta *et al.*, 1997) engendre l'activation de voies de signalisation cellulaire en faveur d'une progression tumorale (Hudis, 2007). Il est important de préciser que le récepteur HER2 n'a pas de ligand connu à ce jour, et que son activation ne peut être que consécutive qu'à une hétérodimérisation avec un autre récepteur HER (HER1, HER3 ou HER4), préalablement activé par la fixation de son ligand. Dans le cancer du sein de sous-type HER2+, le récepteur HER2 est surexprimé (par rapport à une cellule mammaire saine), ce qui peut potentiellement conduire à une activation excessive du récepteur, induisant des cascades de signalisation intracellulaires, se traduisant par un échappement du contrôle de la prolifération responsable de l'envahissement tumoral. L'activation de HER2 déclenche des événements de phosphorylation intracellulaire et conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation, qui sont toutes impliquées dans la progression du cancer du sein (Sirkisoon *et al.*, 2016). Ces voies comprennent la voie PI3K-AKT et la voie des MAPK/ERK conduisant à l'inactivation des protéines déclenchant l'apoptose et donc en faveur de la survie cellulaire, la transcription des gènes permettant la prolifération des cellules tumorales notamment les gènes *Jun/Fos* (Emde *et al.*, 2012) et à la production de VEGF impliqué dans la néo-angiogenèse (Hudis, 2007). D'autre part, l'activation constitutive de STAT3 par les effecteurs intracellulaires phosphorylés Src et JAK en réponse à l'activation de HER2 dans les cellules cancéreuses mammaires (Garcia *et al.*, 2001) est accompagnée par une augmentation de la transcription de la cycline D1, impliquée

dans la progression du cycle cellulaire et de c-Myc impliquée dans la survie cellulaire. Ces événements contribuent à la dérégulation des mécanismes de contrôle de la croissance cellulaire et la survie normale faisant de STAT3 un inducteur de la transformation oncogénique des cellules (Turkson et Jove, 2000). Ces données montrant que l'activation de HER2 est un élément clé responsable de la tumorigenèse. La compréhension des mécanismes responsables de cette activation reste un enjeu médical majeur en vue d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans ce sous-type de cancer très agressif.

Deux hypothèses ont été explorées pour identifier le mécanisme par lequel la 3-OST3A permettrait l'activation du récepteur HER2 :

(1) - La première hypothèse repose sur une activation dite directe de HER2 (décrite dans la Figure 38). Dans ce sens, des travaux ont montré que la fixation de l'amphiréguline et de l'HB-EBF au récepteur HER1 nécessite la présence des HSPGs membranaires comme co-récepteurs (Piepkorn *et al.*, 1998). Cependant, nos premiers résultats ne semblent pas valider cette hypothèse, mais d'autres tests doivent être effectués pour s'en assurer.

(2) - La deuxième hypothèse implique une activation dite indirecte de HER2 ou transactivation suite à l'activation de la voie de signalisation impliquant le FGF-7 et son récepteur FGFR2IIIb (décrite dans la Figure 39). Pour étayer cette hypothèse, plusieurs études nous ont ouvert des pistes d'investigation et ont été à l'origine de nos expériences de traitement des cellules SKBR3 par le FGF-7 et de nos expériences en milieu conditionné.

Les travaux de Maretzky *et al.*, (2011) avaient permis de mettre en évidence que la formation du complexe FGF-7 / FGFR2b à la surface des kératinocytes induit l'augmentation de l'expression de la métalloprotéase ADAM17 connue pour libérer l'HB-EGF sous forme soluble dans les MEC à partir de son précurseur membranaire. Ce ligand de HER1 peut alors se fixer sur son récepteur et l'activer. Cependant le rôle des HS 3-O-sulfatés dans ce contexte n'avait pas été étudié. D'après cette étude, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un mécanisme similaire pourrait avoir lieu dans les cellules de cancer du sein SKBR3 où les HSPGs membranaires par l'intermédiaire de leurs chaînes de HS 3-O-sulfatées *via* la 3-OST3A joueraient le rôle de co-récepteur du FGF-7 pour former un complexe ternaire HS 3-O-sulfatés / FGF-7 / FGFR2IIIb stimulant l'activation de ADAM17. La métalloprotéase ainsi activée pourrait cliver l'HB-EGF membranaire en ligand soluble venant se fixer sur HER1. Finalement une hétérodimérisation HER1/HER2 permettrait l'activation de HER2 et de sa signalisation, favorisant ainsi le développement tumoral.

D'autre part, les travaux récents de Wei *et al.*, (2015) avaient montré que la formation d'un complexe ternaire HS / FGF-7 / FGFR2-IIIb dans les cellules de cancer du sein serait à l'origine d'une transactivation du récepteur HER2, responsable du caractère agressif du cancer. En effet, la formation du complexe ternaire induit l'activation de la métalloprotéase ADAM10 qui va alors cliver la partie extracellulaire du récepteur HER2 résultant en une forme constitutivement active p95HER2. Cependant les caractéristiques structurales des HS dans ce contexte n'ont pas été étudiées et par conséquent le rôle de la 3-*O*-sulfatation des HS médiée par la 3-OST3A n'a pas été exploré. La mise en évidence de son éventuelle implication dans ce contexte a fait l'objet de cette partie de mes travaux de thèse et elle constituerait une avancée majeure dans l'élucidation des rôles fonctionnels des 3-OSTs dans ce contexte. En se basant sur les travaux de Wei *et al.*, (2015), nous pourrions émettre l'hypothèse d'un mécanisme similaire dans les cellules SKBR3 en ajoutant le paramètre de la 3-*O*-sulfatation des HS médiée par la 3-OST3A.

Nous pourrions ainsi explorer deux mécanismes de transactivation de HER2 dans les cellules SKBR3 surexprimant la 3-OST3A : l'un passant par la relargage de la forme soluble de l'HB-EGF et l'autre passant par une action d'ADAM10. Les expériences envisagées pour ces études seront détaillées dans les perspectives de ce travail de thèse.

En conclusion de cette deuxième partie de mon travail de thèse, l'ensemble de nos résultats les plus récents suggèrent que la surexpression de la 3-OST3A dans les cellules SKBR3 **(i)** augmente le niveau d'expression de la forme phosphorylée du récepteur HER2, témoignant de son activation. **(ii)** Des résultats préliminaires montrent également une augmentation de l'expression de la forme phosphorylée de la protéine AKT, attestant de l'activation de cascades de signalisation intracellulaires impliquées dans divers processus cellulaires comme la survie et la prolifération cellulaire ce qui expliquerait le caractère pro-prolifératif de la 3-OST3A dans ces cellules. **(iii)** L'activation du récepteur HER2 dans les cellules SKBR3 surexprimant la 3-OST3A semblerait passer par un mécanisme d'activation indirecte (transactivation) impliquant le complexe ternaire HS 3-*O*-sulfatés FGF-7 / FGFR2-IIIb.

L'étude de ces phénomènes d'activation croisée entre différentes voies de signalisation (ici celles médiées par le FGFR2IIIb et HER2) pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes responsables du caractère agressif de certaines tumeurs et pourraient conduire au développement de stratégies visant à contrecarrer la progression tumorale dans ce sous-type de cancer agressif.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

I. CONCLUSION GÉNÉRALE

Les HSPGs sont les constituants majeurs des MECs et sont également ancrés à la membrane plasmique des cellules. Les chaînes de HS sont constituées de la répétition d'un motif disaccharidique composé d'un résidu d'acide uronique (GlcA ou IdoA) lié à un résidu glucosamine (GlcN). Au cours de leur maturation ces résidus vont être modifiés par l'action coordonnée et séquentielle (i) de nombreuses sulfotransférases qui greffent des groupements sulfates en position 2, 6 et/ou 3 des résidus saccharidiques (ii) de la C5-épimérase qui convertit les résidus GlcA en IdoA. L'expression de ces enzymes est très variable selon le type cellulaire et tissulaire. Bien que les enzymes d'une même famille catalysent la même réaction de sulfatation, elles ont des spécificités de substrats très fines. Il en résulte une très grande diversité structurale et fonctionnelle des chaînes de HS.

La présence de ces motifs sulfatés est à l'origine de la création de sites de reconnaissance spécifiques par certains ligands protéiques. Ces ligands, appelés HBP, regroupent des facteurs de croissance, des cytokines et chimiokines ou encore des protéines de la MEC. Les interactions HS / HBP contribuent à la régulation de multiples processus physiopathologiques. Il est aujourd'hui établi que l'expression des enzymes de maturation des HS est dérégulée dans certains types de cancers. Cette dérégulation entraîne un remodelage de la structure des HS et par conséquent modifie leur capacité d'interaction avec les HBP, phénomène souvent associé à des situations pathologiques telles que la progression tumorale et la formation de métastases.

Les HS, jouant un rôle émergent dans la biologie du cancer, l'étude des mécanismes de régulation de l'expression de leurs enzymes de maturation et les réponses cellulaires qui en résultent est nécessaire à la compréhension du rôle des sulfotransférases dans le processus tumoral. C'est dans ce contexte que se sont inscrits mes travaux de thèse qui ont porté sur les mécanismes de régulation de l'expression des 3-OSTs et leur impact sur le comportement des cellules tumorales mammaires. Ils ont permis de rapporter pour la première fois le rôle moléculaire, fonctionnel et pathologique de l'héparane sulfate 3-O-sulfotransférase 3A (3-OST3A) dans le cancer du sein.

Mes travaux de thèse ont tout d'abord montré que le gène *3-OST3A* est épigénétiquement régulé dans les cellules d'adénocarcinomes mammaires. En effet, une hyperméthylation de ce gène en association avec une diminution ou une extinction totale de son expression a été mise en évidence au niveau des lignées tumorales étudiées. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine nous ont permis d'identifier les acteurs épigénétiques associés au gène 3-

OST3A impliqués dans la régulation négative de son expression dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. De façon intéressante, nous avons observé une concordance entre l'intensité du complexe de répression formé au niveau du gène *3-OST3A* et les résultats obtenus suite aux traitements des cellules par les inhibiteurs des marques épigénétiques comme la 5-Aza-2'-deoxycytidine (Aza) et la trichostatine A (TSA), qui ont permis la restauration de l'expression du gène *3-OST3A* dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231. Dans les cellules MDA-MB-231, les marques épigénétiques associées au gène *3-OST3A* sont abondantes et forment un complexe hautement répressif expliquant la nécessité de combiner les deux traitements (Aza et TSA) pour permettre la restauration de l'expression de la *3-OST3A*. Dans les cellules MCF-7, la répression génique de la *3-OST3A* est exercée par un nombre moins important de marques répressives permettant d'expliquer qu'un traitement à l'Aza seule ou à la TSA seule suffise à restaurer son expression. L'utilité des inhibiteurs des modifications épigénétiques dans la ré-expression des *3-OSTs* a également été mise en évidence dans des travaux précédents au sein de notre équipe, ainsi que l'action anti-tumorale des *3-OSTs* sur les cellules de chondrosarcomes (Bui *et al.*, 2010).

Un certain nombre d'études, dont les nôtres, ont ainsi montré un lien entre la régulation épigénétique des *3-OSTs* et le processus tumoral. La régulation épigénétique des *3-OSTs* semble être de plus en plus mise en évidence dans différents types de cancer comme le cancer du sein. Ces mécanismes épigénétiques en lien avec la régulation de leur expression, se manifestent par un caractère pro- ou anti-tumoral des *3-OSTs* selon les types de cancers. Ceci montre l'importance, l'ambivalence et la complexité des rôles biologiques pouvant être associés aux *3-OSTs* dans le contrôle du développement tumoral. La compréhension des mécanismes régulant leur expression est donc capitale pour nous renseigner sur la survenue d'un cancer et son développement et également importante dans la recherche d'éventuelles cibles thérapeutiques.

Les données de la littérature sont donc partagées entre un rôle suppresseur de tumeur ou un rôle pro-oncogénique des *3-OSTs* selon le contexte cellulaire, ce que nous avons nous-mêmes observé au niveau des lignées tumorales mammaires. Un résultat majeur de notre travail est la démonstration que la *3-OST3A* peut afficher des effets pro-oncogéniques ou suppresseurs de tumeur que ce soit *in vitro* et chez les patientes en fonction du sous-type de cancer du sein. *In vitro*, nous avons montré que la *3-OST3A* peut exercer à la fois une action « pro- ou anti-tumorale » sur le comportement des cellules tumorales mammaires en fonction de leur sous-type moléculaire. En effet, nos tests de prolifération cellulaire ont pu montrer que la

surexpression de la 3-OST3A a un effet anti-prolifératif sur les cellules MCF-7 (LumA) et MDA-MB-231 (TN) alors qu'elle a un effet pro-prolifératif sur les cellules SKBR3 (HER2+) mettant en lumière la dualité de fonction de la 3-OST3A en étroite relation avec la signature moléculaire des cellules étudiées. D'autre part, nos tests d'apoptose ont montré uniquement un rôle pro-apoptique de la surexpression de la 3-OST3A sur les cellules MCF-7 suggérant un rôle suppresseur de tumeur de la 3-OST3A dans ce contexte. Les mécanismes de l'apoptose des cellules MCF-7 suite à la surexpression de la 3-OST3A ont été étudiés et ont révélé la mise en place d'une apoptose intrinsèque aboutissant à la fragmentation de l'ADN. Nos expériences de xénotransferts de cellules MCF-7 surexprimant la 3-OST3A chez des souris SCID ont permis de renforcer le rôle suppresseur de tumeur de cette enzyme de maturation des HS dans un modèle cellulaire de cancer du sein de sous-type LumA puisqu'un retard dans le développement des tumeurs a été mis en évidence.

Étant donné que les effets induits par l'expression de la 3-OST3A dans des lignées cellulaires cancéreuses mammaires dépendent du sous-type moléculaire, un objectif majeur de notre étude a été d'évaluer l'impact pathologique de l'expression de la 3-OST3A dans le cancer du sein. Pour cela, une étude clinique réalisée dans une cohorte de 117 patientes atteintes des différents sous-types de cancer du sein a été menée (en collaboration Université de Dundee, dans le cadre du LIA SFGEN).

Le premier objectif de cette étude clinique a été d'évaluer le niveau d'expression de la 3-OST3A dans les tumeurs des patientes pour déterminer si ce niveau est statistiquement différent d'un sous-type à l'autre. Il s'est avéré que ce niveau est bien dépendant du sous-type de cancer du sein. D'autre part, en corrélation avec nos observations obtenues avec les tests cellulaires réalisés *in vitro*, nous avons mis en évidence le fait que le niveau d'expression de la 3-OST3A soit dépendant du sous-type de tumeur et régulé de façon à permettre le développement tumoral.

Un résultat majeur de ce travail de thèse a été de montrer que les patientes HER2+ présentant un fort taux d'expression de la 3-OST3A dans leurs tumeurs présentent un risque accru de rechute comparées aux 1 patientes avec un faible taux d'expression.

Le modèle cellulaire SKBR3, présentant une signature moléculaire de type HER2+, nous a permis d'explorer les mécanismes moléculaires découlant de nos observations cliniques. Nous avons ainsi montré que la surexpression de la 3-OST3A dans des cellules SKBR3 augmente la prolifération cellulaire, alors que son inhibition par des siRNA la réduit (Mao/Gauche *et al.*, 2016). Ce résultat suggérerait que la 3-O-sulfatation des HS médiée par la 3-OST3A pourrait

activer des voies de signalisation médiées par le récepteur HER2, une donnée actuellement en cours d'investigation et qui sera développée dans les perspectives de ce travail.

Dans la cohorte étudiée, environ 40% des patientes HER2+ présentant une forte expression de la 3-OST3A ont rechuté alors que celles présentant une faible expression de la 3-OST3A au niveau de leur tumeur n'ont pas rechuté sur toute la durée de l'étude (environ 12 ans). Une analyse multivariée tenant compte à la fois de l'expression de la 3-OST3A dans les tumeurs, de la taille de la tumeur (>21mm) et de l'envahissement des ganglions lymphatiques, a montré que lorsque les patientes sont positives pour ces trois paramètres, alors le risque de rechute atteint les 71%. Ces patientes seraient donc susceptibles d'être orientées vers un traitement utilisant le trastuzumab. Il est important de préciser que lorsque l'étude a été réalisée, le trastuzumab n'était pas encore prescrit en Grande Bretagne et on sait aujourd'hui que le trastuzumab a permis une avancée considérable dans la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein de sous-type HER2+. Il serait donc intéressant de réaliser une étude clinique sur une nouvelle cohorte de patientes atteintes de cancer du sein de sous-type HER2+, présentant une forte expression de la 3-OST3A dans leurs tumeurs, et ayant été traitées au trastuzumab, pour voir comment ses patientes y répondent et voir si la réponse est différente en fonction du niveau d'expression de la 3-OST3A.

La deuxième partie de mon travail de thèse s'est attachée à comprendre les mécanismes permettant d'expliquer que la forte expression de la 3-OST3A est associée à un effet pro-oncogénique dans les cellules SKBR3. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une augmentation de l'activation du récepteur HER2 et de sa signalisation suite à la surexpression de la 3-OST3A. Pour expliquer ces phénomènes, nos résultats préliminaires tendent à montrer une implication de la 3-O-sulfatation des HS médiée par la 3-OST3A dans la fixation du FGF-7 sur son récepteur aboutissant à la transactivation du récepteur HER2 par un mécanisme qui reste encore à déterminer.

En conclusion, ces travaux ont montré que la 3-OST3A, impliquée dans l'étape finale de maturation des HS, est un régulateur clé du comportement des cellules tumorales mammaires. Ces travaux sont les premiers à mettre en évidence un rôle oncogénique de la 3-OST3A dans ce contexte et suggèrent la possibilité de l'utiliser comme marqueur pronostique chez les patientes atteintes d'un cancer du sein de sous-type HER2+.

Ces travaux de thèse ont permis de confirmer le rôle pro- ou anti-tumoral des 3-OSTs dans le cancer du sein et de mettre en évidence la différence de comportement des cellules en

fonction de la signature moléculaire de la tumeur. Ces rôles opposés s'exercent à différents niveaux :

- (1) – au niveau génomique, par le contrôle de l'expression génique des 3-OSTs médié par des mécanismes épigénétiques,
- (2) – au niveau cellulaire où l'expression de la 3-OST3A exerce une action pro- ou anti-tumorale dépendante de la signature moléculaire des cellules tumorales mammaires,
- (3) – au niveau clinique où le niveau d'expression de la 3-OST3A dans les tumeurs mammaires est dépendant du sous-type de cancer du sein de façon à promouvoir ou empêcher le développement tumoral.

La complexité de la compréhension des fonctions biologiques des 3-OSTs ne s'arrête pas là. Au sein d'un même cancer, l'expression ou la répression de l'expression des différentes isoformes des 3-OSTs a des effets cliniques opposés sur la rechute des patientes, suggérant un rôle précis de chacune des isoformes dans le processus de tumorigenèse. Par ailleurs, le niveau d'expression d'une même isoforme au sein d'un même sous-type de cancer peut également influencer le devenir des patientes, notre travail en est une très bonne démonstration. Cette complexité témoigne de la finesse de la régulation de l'expression de ces enzymes et la spécificité de leur fonction biologique dépendante du contexte tumoral. Ainsi, la compréhension des mécanismes moléculaires de régulation de l'expression et de l'activité des 3-OSTs en situation pathologique dans les cancers reste aujourd'hui à élucider et ouvrira de vastes perspectives d'investigation et d'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

II. PERSPECTIVES

Les perspectives de ce travail auront pour objectif d'élucider les mécanismes moléculaires par lesquels la 3-OST3A peut favoriser l'agressivité du cancer du sein de sous-type HER2+. La poursuite de ce travail de thèse sera organisée en plusieurs points :

1 – Caractériser l'effet pro-oncogénique de la 3-OST3A dans la lignée cellulaire SKBR3 et étudier son influence sur la réponse des cellules tumorales au trastuzumab :

Nos travaux ont permis de montrer le caractère pro-prolifératif de la 3-OST3A associé à sa surexpression dans les cellules SKBR3, en concordance avec le résultat de l'étude clinique montrant qu'un fort taux d'expression de la 3-OST3A au sein des tumeurs des patientes atteintes d'un cancer du sein de sous-type HER2+ est associé à un risque accru de rechute (Mao/Gauche *et al.*, 2016). De plus, nos résultats les plus récents tendent à montrer que les cellules SKBR3 surexprimant la 3-OST3A répondraient de façon plus importante au traitement par le trastuzumab, par rapport à des cellules ne la surexprimant pas. Ainsi pour compléter ces études, des tests d'apoptose (Annexine V) et de migration (en système Tranwell®) sur les cellules SKBR3 surexprimant ou non la 3-OST3A, et traitées ou non par le trastuzumab, pourront nous apporter des éléments de réponse sur ces différents points.

2 - Évaluer l'influence de la modulation de l'expression de la 3-OST3A (surexpression/extinction) sur l'activation du récepteur HER2 et sa signalisation cellulaire :

Nos résultats récents ont mis en évidence que la surexpression de la 3-OST3A semble induire une augmentation de l'expression de la forme phosphorylée du récepteur HER2 (pHER2) dans les cellules SKBR3.

L'analyse de l'expression de la forme phosphorylée du récepteur HER2 sera à nouveau analysée par Western-Blot et par immunofluorescence pour valider ou non ces premiers résultats. En plus de nous renseigner sur la capacité de la 3-OST3A à activer le récepteur HER2, les expériences d'immunofluorescence permettront de nous renseigner sur le mode d'action de la 3-OST3A : une action autocrine, en lien avec un rôle direct des HS 3-O-sulfatés ou une action juxtacrine, en lien avec un rôle indirect des HS 3-O-sulfatés dans l'activation du récepteur HER2.

De façon complémentaire, la surexpression de la 3-OST3A semble pouvoir activer les voies de signalisation intracellulaires médiées par le récepteur HER2. En effet, nos résultats préliminaires suggèrent une augmentation de l'expression de la forme phosphorylée de la

protéine Akt (pAkt) dans les cellules SKBR3 qui surexpriment la 3-OST3A. Ce résultat indiquerait que l'activation de HER2 active à son tour la signalisation intracellulaire empruntant la voie PI3K-Akt impliquée dans la survie cellulaire, et pourrait donc expliquer le caractère pro-prolifératif de la 3-OST3A dans ces cellules. L'analyse de l'activation de la signalisation de HER2 sera étendue à d'autres voies de signalisation intracellulaires, comme celles impliquant les MAPK-ERK ou le facteur STAT3. Pour ce faire, les niveaux d'expression des effecteurs phosphorylés seront étudiés par Western-Blot à l'aide d'anticorps spécifiques dédiés et également par *intracellular signaling array* permettant de détecter spécifiquement des molécules intracellulaires phosphorylées. Nous analyserons en particulier la phosphorylation des protéines intracellulaires effectrices comme Akt, ERK et STAT3. L'utilisation du trastuzumab (anticorps anti-HER2) en tant qu'inhibiteur spécifique de l'activation de HER2 sera ici envisagée pour vérifier que ces protéines effectrices sont bien spécifiquement activées suite à l'activation de HER2.

3 - Caractériser le mécanisme d'activation du récepteur HER2 dans les cellules SKBR3 et le rôle de la 3-OST3A dans ce contexte :

Le but de cette partie sera d'établir une relation entre la surexpression de la 3-OST3A et l'augmentation du taux d'expression de la forme activée (phosphorylée) du récepteur HER2 dans les cellules SKBR3.

Nos premiers résultats suggèrent plutôt une action indirecte des HS 3-O-sulfatés dans l'activation de HER2 puisque le traitement des cellules SKBR3 par l'HB-EGF (un ligand de HER1) ne permet pas de mettre en évidence une implication de la surexpression de la 3-OST3A sur l'expression de pHER2. Le traitement de ces cellules par le FGF-7 semble quant à lui induire une augmentation de l'expression de pHER2 uniquement lorsque la 3-OST3A est surexprimée, confortant l'hypothèse du mécanisme d'activation indirect. Afin d'écarter de façon certaine l'hypothèse d'un rôle direct, les cellules SKBR3 surexprimant la 3-OST3A seront à nouveau traitées par l'HB-EGF pour confirmer ou non nos résultats préliminaires, et seront également traitées par d'autres ligands des récepteurs HERs, notamment l'amphiréguline (un ligand de HER1). D'autre part, pour renforcer l'hypothèse d'un rôle indirect impliquant une transactivation de HER2 *via* d'autres récepteurs activés, les expériences de traitement des cellules SKBR3 par le FGF-7 seront renouvelées. Les niveaux d'expression du récepteur HER2 activé (pHER2), ainsi que ceux des protéines effectrices des voies de signalisation médiées par l'activation de ce récepteur seront évalués par Western-Blot à l'aide d'anticorps spécifiques dédiés et par *intracellular signaling array*. L'utilisation

de siRNA, spécifiquement dirigés contre les récepteurs FGFR2-IIIb ou HER2, devrait confirmer le phénomène de transactivation et évaluer la contribution de chacun de ces récepteurs dans l'activation des différentes voies de signalisation. De plus de tests de *phospho-receptor tyrosine kinase array* nous permettrons d'étudier l'activation du FGFR2 et de HER2 par l'intermédiaire de la mise en évidence de la phosphorylation des résidus tyrosine du domaine intracellulaire des récepteurs.

Pour explorer le mécanisme de transactivation de HER2, nous nous baserons sur les études de Maretsky *et al.*, (2011) et Wei *et al.*, (2015) qui mettent en évidence le rôle des métalloprotéases ADAM 17 et ADAM 10 dans le relargage des ligands des HERs conduisant à l'activation de HER2 par hétérodimérisation et dans l'activation constitutive de HER2 respectivement.

Pour explorer le relargage des ligands de HERs par action d'ADAM 17 conduisant à l'activation de HER2 par hétérodimérisation, plusieurs expériences sont envisagées :

(a) – Il faudra tout d'abord s'assurer de l'activation du récepteur FGFR2IIIb, en réponse à la stimulation des cellules par le FGF-7, par Western-Blot en utilisant un anticorps anti-pFGFR2 et/ou en utilisant une technique de *phospho-receptor tyrosine kinase array*,

(b) – Pour étudier la potentielle implication d'ADAM 17, l'expression de la métalloprotéase sera quantifiée dans les cellules SKBR3 surexprimant la 3-OST3A avant et après stimulation par le FGF-7 par RT-qPCR pour évaluer le niveau d'expression des transcrits et par western-blot pour évaluer le niveau d'expression protéique.

(c) – Le relargage de l'HB-EGF pourra être évalué en récupérant le milieu de culture de cellules SKBR3 transfectées par la 3-OST3A et traitées par le FGF-7 (=milieu conditionné) par un test ELISA ou par Western Blot en utilisant un anticorps anti-HB-EGF ou par une technique de *growth factor array*,

(d) – Pour s'assurer qu'ADAM17 est à l'origine de la libération de l'HB-EGF, un inhibiteur spécifique d'ADAM17, le marimastat, et/ou un siRNA ciblant spécifiquement ADAM17 seront utilisés avant de quantifier le niveau d'expression de l'HB-EGF dans le milieu conditionné,

(e) – Afin de vérifier que l'activation de HER2 est consécutive au relargage de l'HB-EGF (ligand de HER1) et à l'hétérodimérisation avec HER1, un inhibiteur de l'EGFR (=HER1), le cétuximab, et un inhibiteur de l'HB-EGF, le CRM197 (non toxique pour les cellules) issu de la toxine diphtérique, seront utilisés avant de procéder à l'évaluation de l'activation de HER2

par Western-Blot en utilisant un anticorps anti-pHER2 ou en utilisant une technique de *phospho-receptor tyrosine kinase array*.

Pour explorer l'hypothèse d'une activation constitutive de HER2 suite au clivage de sa partie extracellulaire par ADAM 10, plusieurs expériences sont envisagées :

(a) – De la même façon que précédemment, il faudra tout d'abord s'assurer de l'activation du récepteur FGFR2IIIb, en réponse à la stimulation des cellules par le FGF-7, par Western-Blot en utilisant un anticorps anti-pFGFR2 et/ou en utilisant une technique de *phospho-receptor tyrosine kinase array*,

(b) – Pour étudier la potentielle implication d'ADAM 10, l'expression de la métalloprotéase sera quantifiée dans les cellules SKBR3 surexprimant la 3-OST3A avant et après stimulation par le FGF-7 par RT-qPCR pour évaluer le niveau d'expression des transcrits et par western-blot pour évaluer le niveau d'expression protéique.

(c)- L'expression de la forme constitutivement active de HER2 sera quantifiée par Western-Blot en utilisant un anticorps anti-p95HER2

(d)-Pour s'assurer qu'ADAM10 est responsable du clivage de HER2 en p95HER2, un inhibiteur spécifique d'ADAM10, le batimastat, sera utilisé avant de quantifier le niveau d'expression de p95HER2 par Western-Blot.

L'ensemble de ces résultats devrait nous permettre de comprendre le rôle de la 3-OST3A dans l'agressivité des tumeurs mammaires de sous-type HER2+. Les expériences réalisées devraient contribuer à identifier les acteurs impliqués (directement ou indirectement) dans l'activation de HER2 suite à la surexpression de la 3-OST3A. L'étude des voies de signalisation induites par l'activation du récepteur HER2 et la mise en évidence des protéines effectrices impliquées devraient nous permettre de comprendre les effets cellulaires observés suite à la modulation (surexpression ou extinction) de l'expression de la 3OST3A dans la lignée cellulaire tumorale SKBR3, en particulier en termes de prolifération et de survie cellulaire. De façon complémentaire, notre équipe souhaite mettre en place une collaboration avec l'Unité de Biologie des Tumeurs de l'Institut de Cancérologie de Lorraine (ICL), basée sur une collecte d'échantillons de tumeurs mammaires préalablement sélectionnés, de façon à étudier l'expression de la 3-OST3A et son éventuelle influence sur la réponse au trastuzumab dans une cohorte de patientes atteintes de cancer du sein de sous-type HER2+ traitées par le trastuzumab. Cette investigation devrait permettre de confirmer s'il est possible d'envisager la

3-OST3A comme un marqueur prédictif de la réponse au trastuzumab dans le traitement des cancers du sein de sous-type HER2+.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- de Agostini, A.I., Dong, J.-C., de Vantéry Arrighi, C., Ramus, M.-A., Dentand-Quadri, I., Thalmann, S., Ventura, P., Ibecheole, V., Monge, F., Fischer, A.-M., et al. (2008). Human follicular fluid heparan sulfate contains abundant 3-O-sulfated chains with anticoagulant activity. *J. Biol. Chem.* *283*, 28115–28124.
- Ai, X., Do, A.-T., Lozynska, O., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., and Emerson, C.P. (2003). QSulf1 remodels the 6-O sulfation states of cell surface heparan sulfate proteoglycans to promote Wnt signaling. *J. Cell Biol.* *162*, 341–351.
- Aikawa, J., and Esko, J.D. (1999). Molecular cloning and expression of a third member of the heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/ N-sulfotransferase family. *J. Biol. Chem.* *274*, 2690–2695.
- Aikawa, J., Grobe, K., Tsujimoto, M., and Esko, J.D. (2001). Multiple isozymes of heparan sulfate/heparin GlcNAc N-deacetylase/GlcN N-sulfotransferase. Structure and activity of the fourth member, NDST4. *J. Biol. Chem.* *276*, 5876–5882.
- Aleman-Muench, G.R., Mendoza, V., Stenvers, K., Garcia-Zepeda, E.A., Lopez-Casillas, F., Raman, C., and Soldevila, G. (2012). Betaglycan (T β RIII) is expressed in the thymus and regulates T cell development by protecting thymocytes from apoptosis. *PLoS ONE* *7*, e44217.
- Alexopoulou, A.N., Mulhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2007). Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 505–528.
- Anderegg, U., Simon, J.C., and Averbek, M. (2014). More than just a filler - the role of hyaluronan for skin homeostasis. *Exp. Dermatol.* *23*, 295–303.
- Arribas, J., Baselga, J., Pedersen, K., and Parra-Palau, J.L. (2011). p95HER2 and breast cancer. *Cancer Res.* *71*, 1515–1519.
- Arteaga, C.L., Sliwkowski, M.X., Osborne, C.K., Perez, E.A., Puglisi, F., and Gianni, L. (2012). Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* *9*, 16–32.
- Arvatz, G., Weissmann, M., Ilan, N., and Vlodaysky, I. (2016). Heparanase and cancer progression: New directions, new promises. *Hum Vaccin Immunother* *12*, 2253–2256.
- Aspberg, A. (2012). The different roles of aggrecan interaction domains. *J. Histochem. Cytochem.* *60*, 987–996.
- Atha, D.H., Lormeau, J.C., Petitou, M., Rosenberg, R.D., and Choay, J. (1987). Contribution of 3-O- and 6-O-sulfated glucosamine residues in the heparin-induced conformational change in antithrombin III. *Biochemistry* *26*, 6454–6461.
- Axelsson, J., Xu, D., Kang, B.N., Nussbacher, J.K., Handel, T.M., Ley, K., Sriramarao, P., and Esko, J.D. (2012). Inactivation of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase accentuates neutrophil infiltration during acute inflammation in mice. *Blood* *120*, 1742–1751.
- Bai, A., Meetze, K., Vo, N.Y., Kollipara, S., Mazsa, E.K., Winston, W.M., Weiler, S., Poling, L.L., Chen, T., Ismail, N.S., et al. (2010). GP369, an FGFR2-IIIb-specific antibody, exhibits potent antitumor activity against human cancers driven by activated FGFR2 signaling. *Cancer Res.* *70*, 7630–7639.

- Bai, X., Zhou, D., Brown, J.R., Crawford, B.E., Henet, T., and Esko, J.D. (2001). Biosynthesis of the linkage region of glycosaminoglycans: cloning and activity of galactosyltransferase II, the sixth member of the beta 1,3-galactosyltransferase family (beta 3GalT6). *J. Biol. Chem.* *276*, 48189–48195.
- Baljinnyam, E., Umemura, M., De Lorenzo, M.S., Iwatsubo, M., Chen, S., Goydos, J.S., and Iwatsubo, K. (2011). Epacl promotes melanoma metastasis via modification of heparan sulfate. *Pigment Cell Melanoma Res* *24*, 680–687.
- Barbareschi, M., Maisonneuve, P., Aldovini, D., Cangi, M.G., Pecciarini, L., Angelo Mauri, F., Veronese, S., Caffo, O., Lucenti, A., Palma, P.D., et al. (2003). High syndecan-1 expression in breast carcinoma is related to an aggressive phenotype and to poorer prognosis. *Cancer* *98*, 474–483.
- Barbouri, D., Afratis, N., Gialeli, C., Vynios, D.H., Theocharis, A.D., and Karamanos, N.K. (2014). Syndecans as modulators and potential pharmacological targets in cancer progression. *Front Oncol* *4*, 4.
- Bargmann, C.I., and Weinberg, R.A. (1988). Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion. *EMBO J.* *7*, 2043–2052.
- Baselga, J., and Swain, S.M. (2009). Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat. Rev. Cancer* *9*, 463–475.
- Beauvais, D.M., and Rapraeger, A.C. (2010). Syndecan-1 couples the insulin-like growth factor-1 receptor to inside-out integrin activation. *J. Cell. Sci.* *123*, 3796–3807.
- Béchar, D., Scherpereel, A., Hammad, H., Gentina, T., Tscopoulos, A., Aumercier, M., Pestel, J., Dessaint, J.P., Tonnel, A.B., and Lassalle, P. (2001). Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol.* *167*, 3099–3106.
- Bekku, Y., and Oohashi, T. (2010). Neurocan contributes to the molecular heterogeneity of the perinodal ECM. *Arch. Histol. Cytol.* *73*, 95–102.
- Bengtsson, J., Eriksson, I., and Kjellén, L. (2003). Distinct effects on heparan sulfate structure by different active site mutations in NDST-1. *Biochemistry* *42*, 2110–2115.
- Berendsen, A.D., Pinnow, E.L., Maeda, A., Brown, A.C., McCartney-Francis, N., Kram, V., Owens, R.T., Robey, P.G., Holmbeck, K., de Castro, L.F., et al. (2014). Biglycan modulates angiogenesis and bone formation during fracture healing. *Matrix Biol.* *35*, 223–231.
- Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J.M., and Quintanilla, M. (2009). The emerging role of TGF-beta superfamily coreceptors in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1792*, 954–973.
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 729–777.
- Bespalov, M.M., Sidorova, Y.A., Tumova, S., Ahonen-Bishopp, A., Magalhães, A.C., Kuleskiy, E., Paveliev, M., Rivera, C., Rauvala, H., and Saarma, M. (2011). Heparan sulfate proteoglycan syndecan-3 is a novel receptor for GDNF, neurturin, and artemin. *J. Cell Biol.* *192*, 153–169.

- Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat. Med.* *17*, 320–329.
- Blobel, C.P. (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 32–43.
- Bonnet, F., Périn, J.P., Charbonnier, F., Camuzat, A., Roussel, G., Nussbaum, J.L., and Alliel, P.M. (1996). Structure and cellular distribution of mouse brain testican. Association with the postsynaptic area of hippocampus pyramidal cells. *J. Biol. Chem.* *271*, 4373–4380.
- Bourdon, M.A., Krusius, T., Campbell, S., Schwartz, N.B., and Ruoslahti, E. (1987). Identification and synthesis of a recognition signal for the attachment of glycosaminoglycans to proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *84*, 3194–3198.
- Bourin, M.C., and Lindahl, U. (1993). Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation. *Biochem. J.* *289 (Pt 2)*, 313–330.
- Bouvier-Labit, C., Liprandi, A., Monti, G., Pellissier, J.F., and Figarella-Branger, D. (2002). CD44H is expressed by cells of the oligodendrocyte lineage and by oligodendrogliomas in humans. *J. Neurooncol.* *60*, 127–134.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.
- Bret, C., Moreaux, J., Schved, J.-F., Hose, D., and Klein, B. (2011). SULFs in human neoplasia: implication as progression and prognosis factors. *J Transl Med* *9*, 72.
- Breton, C., Bettler, E., Joziassse, D.H., Geremia, R.A., and Imberty, A. (1998). Sequence-function relationships of prokaryotic and eukaryotic galactosyltransferases. *J. Biochem.* *123*, 1000–1009.
- Bruinsma, I.B., Riet, L. te, Gevers, T., Dam, G.B. ten, van Kuppevelt, T.H., David, G., Küsters, B., de Waal, R.M.W., and Verbeek, M.M. (2010). Sulfation of heparan sulfate associated with amyloid-beta plaques in patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* *119*, 211–220.
- Bui, C., Ouzzine, M., Talhaoui, I., Sharp, S., Prydz, K., Coughtrie, M.W.H., and Fournel-Gigleux, S. (2010). Epigenetics: methylation-associated repression of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase gene expression contributes to the invasive phenotype of H-EMC-SS chondrosarcoma cells. *FASEB J.* *24*, 436–450.
- Bullock, S.L., Fletcher, J.M., Beddington, R.S., and Wilson, V.A. (1998). Renal agenesis in mice homozygous for a gene trap mutation in the gene encoding heparan sulfate 2-sulfotransferase. *Genes Dev.* *12*, 1894–1906.
- Burgess, A.W., Cho, H.-S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P.J., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell* *12*, 541–552.
- Busse, M., Feta, A., Presto, J., Wilén, M., Grønning, M., Kjellén, L., and Kusche-Gullberg, M. (2007). Contribution of EXT1, EXT2, and EXTL3 to heparan sulfate chain elongation. *J. Biol. Chem.* *282*, 32802–32810.

- Busse-Wicher, M., Wicher, K.B., and Kusche-Gullberg, M. (2014). The exostosin family: proteins with many functions. *Matrix Biol.* *35*, 25–33.
- Cadwallader, A.B., and Yost, H.J. (2006). Combinatorial expression patterns of heparan sulfate sulfotransferases in zebrafish: I. The 3-O-sulfotransferase family. *Dev. Dyn.* *235*, 3423–3431.
- Capila, I., and Linhardt, R.J. (2002). Heparin-protein interactions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *41*, 391–412.
- Capurro, M.I., Xiang, Y.-Y., Lobe, C., and Filmus, J. (2005). Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res.* *65*, 6245–6254.
- Carey, D.J. (1996). N-syndecan: structure and function of a transmembrane heparan sulfate proteoglycan. *Perspect Dev Neurobiol* *3*, 331–346.
- Carter, N.M., Ali, S., and Kirby, J.A. (2003). Endothelial inflammation: the role of differential expression of N-deacetylase/N-sulphotransferase enzymes in alteration of the immunological properties of heparan sulphate. *J. Cell. Sci.* *116*, 3591–3600.
- Cha, J.Y., Lambert, Q.T., Reuther, G.W., and Der, C.J. (2008). Involvement of fibroblast growth factor receptor 2 isoform switching in mammary oncogenesis. *Mol. Cancer Res.* *6*, 435–445.
- Cheab, B., Auguste, A., and Leary, A. (2015). The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin J Cancer* *34*, 4–16.
- Chen, J., Jones, C.L., and Liu, J. (2007). Using an enzymatic combinatorial approach to identify anticoagulant heparan sulfate structures. *Chem. Biol.* *14*, 986–993.
- Chen, X.-D., Fisher, L.W., Robey, P.G., and Young, M.F. (2004). The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *FASEB J.* *18*, 948–958.
- Chen, X.-Z., Zhang, W.-H., Chen, H.-N., Liu, J.-P., He, D., Liu, Y., Liu, K., Chen, X.-L., Mo, X.-M., Zhou, Z.-G., et al. (2016). Associations between serum CA724 and HER2 overexpression among stage II-III resectable gastric cancer patients: an observational study. *Oncotarget* *7*, 23647–23657.
- Chen, Z., Fan, J.-Q., Li, J., Li, Q.-S., Yan, Z., Jia, X.-K., Liu, W.-D., Wei, L.-J., Zhang, F.-Z., Gao, H., et al. (2009). Promoter hypermethylation correlates with the Hsulf-1 silencing in human breast and gastric cancer. *Int. J. Cancer* *124*, 739–744.
- Cheng, W., Tseng, C.-J., Lin, T.T.C., Cheng, I., Pan, H.-W., Hsu, H.-C., and Lee, Y.-M. (2008). Glypican-3-mediated oncogenesis involves the Insulin-like growth factor-signaling pathway. *Carcinogenesis* *29*, 1319–1326.
- Chitu, V., and Stanley, E.R. (2006). Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* *18*, 39–48.
- Choay, J., Petitou, M., Lormeau, J.C., Sinaÿ, P., Casu, B., and Gatti, G. (1983). Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for

antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *116*, 492–499.

Choi, S., Lee, H., Choi, J.R., and Oh, E.S. (2010). Shedding: towards a new paradigm of syndecan function in cancer. *BMB Rep* *43*, 305–310.

Cole, C.L., Rushton, G., Jayson, G.C., and Avizienyte, E. (2014). Ovarian cancer cell heparan sulfate 6-O-sulfotransferases regulate an angiogenic program induced by heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factor/EGF receptor signaling. *J. Biol. Chem.* *289*, 10488–10501.

Copeland, R., Balasubramaniam, A., Tiwari, V., Zhang, F., Bridges, A., Linhardt, R.J., Shukla, D., and Liu, J. (2008). Using a 3-O-sulfated heparin octasaccharide to inhibit the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochemistry* *47*, 5774–5783.

Cornolti, G., Ungari, M., Morassi, M.L., Facchetti, F., Rossi, E., Lombardi, D., and Nicolai, P. (2007). Amplification and overexpression of HER2/neu gene and HER2/neu protein in salivary duct carcinoma of the parotid gland. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* *133*, 1031–1036.

Cotman, S.L., Halfter, W., and Cole, G.J. (1999). Identification of extracellular matrix ligands for the heparan sulfate proteoglycan agrin. *Exp. Cell Res.* *249*, 54–64.

Crawford, B.E., Olson, S.K., Esko, J.D., and Pinhal, M.A. (2001). Cloning, Golgi localization, and enzyme activity of the full-length heparin/heparan sulfate-glucuronic acid C5-epimerase. *J. Biol. Chem.* *276*, 21538–21543.

Cronenwett and Johnston (2014). *Rutherford's Vascular Surgery* 8th edition, Chapter 35, page 555

Dahabreh, I.J., Linardou, H., Siannis, F., Fountzilas, G., and Murray, S. (2008). Trastuzumab in the adjuvant treatment of early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Oncologist* *13*, 620–630.

Delehedde, M., Lyon, M., Sergeant, N., Rahmoune, H., and Fernig, D.G. (2001). Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *6*, 253–273.

Delehedde, M., Devenyns, L., Maurage, C.-A., and Vivès, R.R. (2013). Endocan in cancers: a lesson from a circulating dermatan sulfate proteoglycan. *Int J Cell Biol* *2013*, 705027.

Deligny, A., Denys, A., Marcant, A., Melchior, A., Mazurier, J., van Kuppevelt, T.H., and Allain, F. (2010). Synthesis of heparan sulfate with cyclophilin B-binding properties is determined by cell type-specific expression of sulfotransferases. *J. Biol. Chem.* *285*, 1701–1715.

Dewerchin, M., Héroult, J.-P., Wallays, G., Petitou, M., Schaeffer, P., Millet, L., Weitz, J.I., Moons, L., Collen, D., Carmeliet, P., et al. (2003). Life-threatening thrombosis in mice with targeted Arg48-to-Cys mutation of the heparin-binding domain of antithrombin. *Circ. Res.* *93*, 1120–1126.

Dews, I.C., and Mackenzie, K.R. (2007). Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 20782–20787.

- Dinccelik-Aslan, M., Gumus-Akay, G., Elhan, A.H., Unal, E., and Tukun, A. (2015). Diagnostic and prognostic significance of glypican 5 and glypican 6 gene expression levels in gastric adenocarcinoma. *Mol Clin Oncol* 3, 584–590.
- Dreyfuss, J.L., Regatieri, C.V., Jarrouge, T.R., Cavalheiro, R.P., Sampaio, L.O., and Nader, H.B. (2009). Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An. Acad. Bras. Cienc.* 81, 409–429.
- Du, W.W., Yang, W., and Yee, A.J. (2013). Roles of versican in cancer biology--tumorigenesis, progression and metastasis. *Histol. Histopathol.* 28, 701–713.
- Duncan, M.B., Chen, J., Krise, J.P., and Liu, J. (2004). The biosynthesis of anticoagulant heparan sulfate by the heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5. *Biochim. Biophys. Acta* 1671, 34–43.
- Dwivedi, P.P., Lam, N., and Powell, B.C. (2013). Boning up on glypicans--opportunities for new insights into bone biology. *Cell Biochem. Funct.* 31, 91–114.
- Dwyer, C.A., Bi, W.L., Viapiano, M.S., and Matthews, R.T. (2014). Brevican knockdown reduces late-stage glioma tumor aggressiveness. *J. Neurooncol.* 120, 63–72.
- Dzwonek, J., and Wilczynski, G.M. (2015). CD44: molecular interactions, signaling and functions in the nervous system. *Front Cell Neurosci* 9, 175.
- Edavettal, S.C., Lee, K.A., Negishi, M., Linhardt, R.J., Liu, J., and Pedersen, L.C. (2004). Crystal structure and mutational analysis of heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 1. *J. Biol. Chem.* 279, 25789–25797.
- Edge, A.S., and Spiro, R.G. (1990). Characterization of novel sequences containing 3-O-sulfated glucosamine in glomerular basement membrane heparan sulfate and localization of sulfated disaccharides to a peripheral domain. *J. Biol. Chem.* 265, 15874–15881.
- Edovitsky, E., Elkin, M., Zcharia, E., Peretz, T., and Vlodaysky, I. (2004). Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis, and metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.* 96, 1219–1230.
- Edwards, I.J. (2012). Proteoglycans in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 9, 196–206.
- Elderbroom, J.L., Huang, J.J., Gatza, C.E., Chen, J., How, T., Starr, M., Nixon, A.B., and Blobe, G.C. (2014). Ectodomain shedding of TβRIII is required for TβRIII-mediated suppression of TGF-β signaling and breast cancer migration and invasion. *Mol. Biol. Cell* 25, 2320–2332.
- Elfenbein, A., and Simons, M. (2013). Syndecan-4 signaling at a glance. *J. Cell. Sci.* 126, 3799–3804.
- Ellis, L., Atadja, P.W., and Johnstone, R.W. (2009). Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1409–1420.
- Emde, A., Köstler, W.J., Yarden, Y., and Association of Radiotherapy and Oncology of the Mediterranean arEa (AROME) (2012). Therapeutic strategies and mechanisms of tumorigenesis of HER2-overexpressing breast cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 84 Suppl 1, e49–e57.

- Erickson, A.C., and Couchman, J.R. (2000). Still more complexity in mammalian basement membranes. *J. Histochem. Cytochem.* *48*, 1291–1306.
- Esko, J.D., and Lindahl, U. (2001). Molecular diversity of heparan sulfate. *J. Clin. Invest.* *108*, 169–173.
- Esko, J.D., and Selleck, S.B. (2002). Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu. Rev. Biochem.* *71*, 435–471.
- Esko, J.D., Kimata, K., and Lindahl, U. (2009). Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press),.
- Essner, J.J., Amack, J.D., Nyholm, M.K., Harris, E.B., and Yost, H.J. (2005). Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut. *Development* *132*, 1247–1260.
- Essner, J.J., Chen, E., and Ekker, S.C. (2006). Syndecan-2. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *38*, 152–156.
- Farach-Carson, M.C., Warren, C.R., Harrington, D.A., and Carson, D.D. (2014). Border patrol: insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue borders. *Matrix Biol.* *34*, 64–79.
- Feldinger, K., Generali, D., Kramer-Marek, G., Gijssen, M., Ng, T.B., Wong, J.H., Strina, C., Cappelletti, M., Andreis, D., Li, J.-L., et al. (2014). ADAM10 mediates trastuzumab resistance and is correlated with survival in HER2 positive breast cancer. *Oncotarget* *5*, 6633–6646.
- Ferguson, B.W., and Datta, S. (2011). Role of heparan sulfate 2-o-sulfotransferase in prostate cancer cell proliferation, invasion, and growth factor signaling. *Prostate Cancer* *2011*, 893208.
- Ferreras, C., Rushton, G., Cole, C.L., Babur, M., Telfer, B.A., van Kuppevelt, T.H., Gardiner, J.M., Williams, K.J., Jayson, G.C., and Avizienyte, E. (2012). Endothelial heparan sulfate 6-O-sulfation levels regulate angiogenic responses of endothelial cells to fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* *287*, 36132–36146.
- Figueroa-Magalhães, M.C., Jelovac, D., Connolly, R.M., and Wolff, A.C. (2014). Treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast* *23*, 128–136.
- Filmus, J., and Capurro, M. (2013). Glypican-3: a marker and a therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *FEBS J.* *280*, 2471–2476.
- Filmus, J., and Capurro, M. (2014). The role of glypicans in Hedgehog signaling. *Matrix Biol.* *35*, 248–252.
- Filmus, J., Capurro, M., and Rast, J. (2008). Glypicans. *Genome Biol.* *9*, 224.
- Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L., and Kjellén, L. (1999). Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature* *400*, 773–776.

- Fransson, L.A., Silverberg, I., and Carlstedt, I. (1985). Structure of the heparan sulfate-protein linkage region. Demonstration of the sequence galactosyl-galactosyl-xylose-2-phosphate. *J. Biol. Chem.* *260*, 14722–14726.
- Fransson, L.-A., Belting, M., Cheng, F., Jönsson, M., Mani, K., and Sandgren, S. (2004). Novel aspects of glypican glycobiology. *Cell. Mol. Life Sci.* *61*, 1016–1024.
- Frese, M.-A., Milz, F., Dick, M., Lamanna, W.C., and Dierks, T. (2009). Characterization of the human sulfatase Sulf1 and its high affinity heparin/heparan sulfate interaction domain. *J. Biol. Chem.* *284*, 28033–28044.
- Friedman, R.J. (2010). New oral anticoagulants for thromboprophylaxis after elective total hip and knee arthroplasty. *Thrombosis* *2010*, 280731.
- Frischknecht, R., and Seidenbecher, C.I. (2012). Brevican: a key proteoglycan in the perisynaptic extracellular matrix of the brain. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *44*, 1051–1054.
- Frogne, T., Laenkholm, A.-V., Lyng, M.B., Henriksen, K.L., and Lykkesfeldt, A.E. (2009). Determination of HER2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors. *Breast Cancer Res.* *11*, R11.
- Fuentealba, L., Carey, D.J., and Brandan, E. (1999). Antisense inhibition of syndecan-3 expression during skeletal muscle differentiation accelerates myogenesis through a basic fibroblast growth factor-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* *274*, 37876–37884.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P., and Kouzarides, T. (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* *278*, 4035–4040.
- Funderburgh, J.L. (2002). Keratan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life* *54*, 187–194.
- Gandrille, S., Aiach, M., Lane, D.A., Vidaud, D., Molho-Sabatier, P., Caso, R., de Moerloose, P., Fiessinger, J.N., and Clauser, E. (1990). Important role of arginine 129 in heparin-binding site of antithrombin III. Identification of a novel mutation arginine 129 to glutamine. *J. Biol. Chem.* *265*, 18997–19001.
- Garcia, R., Bowman, T.L., Niu, G., Yu, H., Minton, S., Muro-Cacho, C.A., Cox, C.E., Falcone, R., Fairclough, R., Parsons, S., et al. (2001). Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* *20*, 2499–2513.
- Gesteira, T.F., Pol-Fachin, L., Coulson-Thomas, V.J., Lima, M.A., Verli, H., and Nader, H.B. (2013). Insights into the N-sulfation mechanism: molecular dynamics simulations of the N-sulfotransferase domain of NDST1 and mutants. *PLoS ONE* *8*, e70880.
- Ghiselli, G., and Agrawal, A. (2005). The human D-glucuronyl C5-epimerase gene is transcriptionally activated through the beta-catenin-TCF4 pathway. *Biochem. J.* *390*, 493–499.
- Girardin, E.P., Hajmohammadi, S., Birmele, B., Helisch, A., Shworak, N.W., and de Agostini, A.I. (2005). Synthesis of anticoagulant active heparan sulfate proteoglycans by glomerular epithelial cells involves multiple 3-O-sulfotransferase isoforms and a limiting precursor pool. *J. Biol. Chem.* *280*, 38059–38070.

Goldhirsch, A., Wood, W.C., Coates, A.S., Gelber, R.D., Thürlimann, B., Senn, H.-J., and Panel members (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol.* *22*, 1736–1747.

Gomes, A.M., Stelling, M.P., and Pavão, M.S.G. (2013). Heparan sulfate and heparanase as modulators of breast cancer progression. *Biomed Res Int* *2013*, 852093.

Gopal, S., Bober, A., Whiteford, J.R., Mulhaupt, H.A.B., Yoneda, A., and Couchman, J.R. (2010). Heparan sulfate chain valency controls syndecan-4 function in cell adhesion. *J. Biol. Chem.* *285*, 14247–14258.

Gorokhov, A., Perera, L., Darden, T.A., Negishi, M., Pedersen, L.C., and Pedersen, L.G. (2000). Heparan sulfate biosynthesis: a theoretical study of the initial sulfation step by N-deacetylase/N-sulfotransferase. *Biophys. J.* *79*, 2909–2917.

Götting, C., Kuhn, J., Zahn, R., Brinkmann, T., and Kleesiek, K. (2000). Molecular cloning and expression of human UDP-d-Xylose:proteoglycan core protein beta-d-xylosyltransferase and its first isoform XT-II. *J. Mol. Biol.* *304*, 517–528.

Graus-Porta, D., Beerli, R.R., Daly, J.M., and Hynes, N.E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* *16*, 1647–1655.

Greenfield, B., Wang, W.C., Marquardt, H., Piepkorn, M., Wolff, E.A., Aruffo, A., and Bennett, K.L. (1999). Characterization of the heparan sulfate and chondroitin sulfate assembly sites in CD44. *J. Biol. Chem.* *274*, 2511–2517.

Grigorieva, E.V., Prudnikova, T.Y., Domanitskaya, N.V., Mostovich, L.A., Pavlova, T.V., Kashuba, V.I., and Zabarovsky, E.R. (2011). D-glucuronyl C5-epimerase suppresses small-cell lung cancer cell proliferation in vitro and tumour growth in vivo. *Br. J. Cancer* *105*, 74–82.

Grobe, K., Ledin, J., Ringvall, M., Holmborn, K., Forsberg, E., Esko, J.D., and Kjellén, L. (2002). Heparan sulfate and development: differential roles of the N-acetylglucosamine N-deacetylase/N-sulfotransferase isozymes. *Biochim. Biophys. Acta* *1573*, 209–215.

Grønbaek, K., Hother, C., and Jones, P.A. (2007). Epigenetic changes in cancer. *APMIS* *115*, 1039–1059.

Guerrini, M., Elli, S., Mourier, P., Rudd, T.R., Gaudesi, D., Casu, B., Boudier, C., Torri, G., and Viskov, C. (2013). An unusual antithrombin-binding heparin octasaccharide with an additional 3-O-sulfated glucosamine in the active pentasaccharide sequence. *Biochem. J.* *449*, 343–351.

Gulberti, S., Lattard, V., Fondeur, M., Jacquinet, J.-C., Mulliert, G., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M., and Fournel-Gigleux, S. (2005). Phosphorylation and sulfation of oligosaccharide substrates critically influence the activity of human beta1,4-galactosyltransferase 7 (GalT-I) and beta1,3-glucuronosyltransferase I (GlcAT-I) involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *280*, 1417–1425.

Gulberti, S., Jacquinet, J.-C., Chabel, M., Ramalanjaona, N., Magdalou, J., Netter, P., Coughtrie, M.W.H., Ouzzine, M., and Fournel-Gigleux, S. (2012). Chondroitin sulfate N-

acetylgalactosaminyltransferase-1 (CSGalNAcT-1) involved in chondroitin sulfate initiation: Impact of sulfation on activity and specificity. *Glycobiology* 22, 561–571.

Gullick, W.J. (2001). The Type 1 growth factor receptors and their ligands considered as a complex system. *Endocr. Relat. Cancer* 8, 75–82.

Guo, Y., Feng, Y., Li, Z., and Lin, X. (2014a). *Drosophila* heparan sulfate 3-O sulfotransferase B null mutant is viable and exhibits no defects in Notch signaling. *J Genet Genomics* 41, 369–378.

Guo, Y., Li, Z., and Lin, X. (2014b). Hs3st-A and Hs3st-B regulate intestinal homeostasis in *Drosophila* adult midgut. *Cell. Signal.* 26, 2317–2325.

Habuchi, H., and Kimata, K. (2010). Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1. *Prog Mol Biol Transl Sci* 93, 79–111.

Habuchi, H., Tanaka, M., Habuchi, O., Yoshida, K., Suzuki, H., Ban, K., and Kimata, K. (2000). The occurrence of three isoforms of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase having different specificities for hexuronic acid adjacent to the targeted N-sulfoglucosamine. *J. Biol. Chem.* 275, 2859–2868.

Habuchi, H., Miyake, G., Nogami, K., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Kusche-Gullberg, M., Habuchi, O., Tanaka, M., and Kimata, K. (2003). Biosynthesis of heparan sulphate with diverse structures and functions: two alternatively spliced forms of human heparan sulphate 6-O-sulphotransferase-2 having different expression patterns and properties. *Biochem. J.* 371, 131–142.

Habuchi, H., Nagai, N., Sugaya, N., Atsumi, F., Stevens, R.L., and Kimata, K. (2007). Mice deficient in heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-1 exhibit defective heparan sulfate biosynthesis, abnormal placentation, and late embryonic lethality. *J. Biol. Chem.* 282, 15578–15588.

Hagner-McWhirter, A., Li, J.-P., Oscarson, S., and Lindahl, U. (2004). Irreversible glucuronyl C5-epimerization in the biosynthesis of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* 279, 14631–14638.

HajMohammadi, S., Enjyoji, K., Princivalle, M., Christi, P., Lech, M., Beeler, D., Rayburn, H., Schwartz, J.J., Barzegar, S., de Agostini, A.I., et al. (2003). Normal levels of anticoagulant heparan sulfate are not essential for normal hemostasis. *J. Clin. Invest.* 111, 989–999.

Harris, R.C., Chung, E., and Coffey, R.J. (2003). EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* 284, 2–13.

Hartmann, U., Hülsmann, H., Seul, J., Röhl, S., Midani, H., Breloy, I., Hechler, D., Müller, R., and Paulsson, M. (2013). Testican-3: a brain-specific proteoglycan member of the BM-40/SPARC/osteonectin family. *J. Neurochem.* 125, 399–409.

Hemmick, L.M., and Bidlack, J.M. (1990). Beta-endorphin stimulates rat T lymphocyte proliferation. *J. Neuroimmunol.* 29, 239–248.

Hervent, A.-S., and De Keulenaer, G.W. (2012). Molecular mechanisms of cardiotoxicity induced by ErbB receptor inhibitor cancer therapeutics. *Int J Mol Sci* 13, 12268–12286.

- Holbro, T., and Hynes, N.E. (2004). ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *44*, 195–217.
- Holst, C.R., Bou-Reslan, H., Gore, B.B., Wong, K., Grant, D., Chalasani, S., Carano, R.A., Frantz, G.D., Tessier-Lavigne, M., Bolon, B., et al. (2007). Secreted sulfatases Sulfl and Sulf2 have overlapping yet essential roles in mouse neonatal survival. *PLoS ONE* *2*, e575.
- Hu, Y.-P., Lin, S.-Y., Huang, C.-Y., Zulueta, M.M.L., Liu, J.-Y., Chang, W., and Hung, S.-C. (2011). Synthesis of 3-O-sulfonated heparan sulfate octasaccharides that inhibit the herpes simplex virus type 1 host-cell interaction. *Nat Chem* *3*, 557–563.
- Hudis, C.A. (2007). Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N. Engl. J. Med.* *357*, 39–51.
- Van Hul, W., Wuyts, W., Hendrickx, J., Speleman, F., Wauters, J., De Boule, K., Van Roy, N., Bossuyt, P., and Willems, P.J. (1998). Identification of a third EXT-like gene (EXTL3) belonging to the EXT gene family. *Genomics* *47*, 230–237.
- Humphries, D.E., Lanciotti, J., and Karlinsky, J.B. (1998). cDNA cloning, genomic organization and chromosomal localization of human heparan glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferase-2. *Biochem. J.* *332* (Pt 2), 303–307.
- Hur, K., Han, T.-S., Jung, E.-J., Yu, J., Lee, H.-J., Kim, W.H., Goel, A., and Yang, H.-K. (2012). Up-regulated expression of sulfatases (SULF1 and SULF2) as prognostic and metastasis predictive markers in human gastric cancer. *J. Pathol.* *228*, 88–98.
- Hwang, J.-A., Kim, Y., Hong, S.-H., Lee, J., Cho, Y.G., Han, J.-Y., Kim, Y.-H., Han, J., Shim, Y.M., Lee, Y.-S., et al. (2013). Epigenetic inactivation of heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2 in lung cancer and its role in tumorigenesis. *PLoS ONE* *8*, e79634.
- Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* *42*, 11–55.
- Iozzo, R.V., Moscatello, D.K., McQuillan, D.J., and Eichstetter, I. (1999). Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.* *274*, 4489–4492.
- Itano, N., and Kimata, K. (2002). Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life* *54*, 195–199.
- Jacobsson, I., Lindahl, U., Jensen, J.W., Rodén, L., Prihar, H., and Feingold, D.S. (1984). Biosynthesis of heparin. Substrate specificity of heparosan N-sulfate D-glucuronosyl 5-epimerase. *J. Biol. Chem.* *259*, 1056–1063.
- Jacquemier, J., Sun, Z.Z., Penault-Llorca, F., Geneix, J., Devilard, E., Adélaïde, J., and Birnbaum, D. (1998). FGF7 protein expression in human breast carcinomas. *J. Pathol.* *186*, 269–274.
- Jia, J., Maccarana, M., Zhang, X., Beshpalov, M., Lindahl, U., and Li, J.-P. (2009). Lack of L-iduronic acid in heparan sulfate affects interaction with growth factors and cell signaling. *J. Biol. Chem.* *284*, 15942–15950.

- Jung, S.H., Lee, H.C., Yu, D.-M., Kim, B.C., Park, S.M., Lee, Y.-S., Park, H.J., Ko, Y.-G., and Lee, J.-S. (2016). Heparan sulfation is essential for the prevention of cellular senescence. *Cell Death Differ.* *23*, 417–429.
- Jury, E.C., and Kabouridis, P.S. (2010). New role for Agrin in T cells and its potential importance in immune system regulation. *Arthritis Res. Ther.* *12*, 205.
- Kakuta, Y., Sueyoshi, T., Negishi, M., and Pedersen, L.C. (1999). Crystal structure of the sulfotransferase domain of human heparan sulfate N-deacetylase/ N-sulfotransferase 1. *J. Biol. Chem.* *274*, 10673–10676.
- Kakuta, Y., Li, L., Pedersen, L.C., Pedersen, L.G., and Negishi, M. (2003). Heparan sulphate N-sulphotransferase activity: reaction mechanism and substrate recognition. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 331–334.
- Kali, A., and Shetty, K.S.R. (2014). Endocan: a novel circulating proteoglycan. *Indian J Pharmacol* *46*, 579–583.
- Kamimura, K., Fujise, M., Villa, F., Izumi, S., Habuchi, H., Kimata, K., and Nakato, H. (2001). Drosophila heparan sulfate 6-O-sulfotransferase (dHS6ST) gene. Structure, expression, and function in the formation of the tracheal system. *J. Biol. Chem.* *276*, 17014–17021.
- Kamimura, K., Rhodes, J.M., Ueda, R., McNeely, M., Shukla, D., Kimata, K., Spear, P.G., Shworak, N.W., and Nakato, H. (2004). Regulation of Notch signaling by Drosophila heparan sulfate 3-O sulfotransferase. *J. Cell Biol.* *166*, 1069–1079.
- Kapoor, S. (2013). Bikunin and its emerging role in the modulation of tumor invasion and metastasis. *J. Surg. Res.* *183*, 982.
- Katta, K., Imran, T., Busse-Wicher, M., Grønning, M., Czajkowski, S., and Kusche-Gullberg, M. (2015). Reduced Expression of EXTL2, a Member of the Exostosin (EXT) Family of Glycosyltransferases, in Human Embryonic Kidney 293 Cells Results in Longer Heparan Sulfate Chains. *J. Biol. Chem.* *290*, 13168–13177.
- Kawashima, H., Watanabe, N., Hirose, M., Sun, X., Atarashi, K., Kimura, T., Shikata, K., Matsuda, M., Ogawa, D., Heljasvaara, R., et al. (2003). Collagen XVIII, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, interacts with L-selectin and monocyte chemoattractant protein-1. *J. Biol. Chem.* *278*, 13069–13076.
- Kim, B.T., Kitagawa, H., Tamura, J., Saito, T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., and Sugahara, K. (2001). Human tumor suppressor EXT gene family members EXTL1 and EXTL3 encode alpha 1,4- N-acetylglucosaminyltransferases that likely are involved in heparan sulfate/ heparin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 7176–7181.
- Kimelman, D., and Kirschner, M. (1987). Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. *Cell* *51*, 869–877.
- Kinsella, M.G., and Wight, T.N. (1986). Modulation of sulfated proteoglycan synthesis by bovine aortic endothelial cells during migration. *J. Cell Biol.* *102*, 679–687.

- Kirkbride, K.C., Townsend, T.A., Bruinsma, M.W., Barnett, J.V., and Blobel, G.C. (2008). Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor. *J. Biol. Chem.* *283*, 7628–7637.
- Kitagawa, H., Tone, Y., Tamura, J., Neumann, K.W., Ogawa, T., Oka, S., Kawasaki, T., and Sugahara, K. (1998). Molecular cloning and expression of glucuronyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *273*, 6615–6618.
- Kitagawa, H., Shimakawa, H., and Sugahara, K. (1999). The tumor suppressor EXT-like gene EXTL2 encodes an alpha1, 4-N-acetylhexosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine and N-acetylglucosamine to the common glycosaminoglycan-protein linkage region. The key enzyme for the chain initiation of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* *274*, 13933–13937.
- Kitagawa, H., Tsutsumi, K., Ikegami-Kuzuhara, A., Nadanaka, S., Goto, F., Ogawa, T., and Sugahara, K. (2008). Sulfation of the galactose residues in the glycosaminoglycan-protein linkage region by recombinant human chondroitin 6-O-sulfotransferase-1. *J. Biol. Chem.* *283*, 27438–27443.
- Kitayama, K., Hayashida, Y., Nishida, K., and Akama, T.O. (2007). Enzymes responsible for synthesis of corneal keratan sulfate glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* *282*, 30085–30096.
- Kitsberg, D.I., and Leder, P. (1996). Keratinocyte growth factor induces mammary and prostatic hyperplasia and mammary adenocarcinoma in transgenic mice. *Oncogene* *13*, 2507–2515.
- Kjellén, L. (2003). Glucosaminyl N-deacetylase/N-sulphotransferases in heparan sulphate biosynthesis and biology. *Biochem. Soc. Trans.* *31*, 340–342.
- Knelson, E.H., Gaviglio, A.L., Nee, J.C., Starr, M.D., Nixon, A.B., Marcus, S.G., and Blobel, G.C. (2014a). Stromal heparan sulfate differentiates neuroblasts to suppress neuroblastoma growth. *J. Clin. Invest.* *124*, 3016–3031.
- Knelson, E.H., Nee, J.C., and Blobel, G.C. (2014b). Heparan sulfate signaling in cancer. *Trends Biochem. Sci.* *39*, 277–288.
- Knudson, C.B. (1993). Hyaluronan receptor-directed assembly of chondrocyte pericellular matrix. *J. Cell Biol.* *120*, 825–834.
- Kobayashi, M., Habuchi, H., Yoneda, M., Habuchi, O., and Kimata, K. (1997). Molecular cloning and expression of Chinese hamster ovary cell heparan-sulfate 2-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* *272*, 13980–13985.
- Kobayashi, S., Morimoto, K., Shimizu, T., Takahashi, M., Kurosawa, H., and Shirasawa, T. (2000). Association of EXT1 and EXT2, hereditary multiple exostoses gene products, in Golgi apparatus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *268*, 860–867.
- Koide, T., Odani, S., Takahashi, K., Ono, T., and Sakuragawa, N. (1984). Antithrombin III Toyama: replacement of arginine-47 by cysteine in hereditary abnormal antithrombin III that lacks heparin-binding ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *81*, 289–293.

- Koike, T., Izumikawa, T., Tamura, J.-I., and Kitagawa, H. (2009). FAM20B is a kinase that phosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region. *Biochem. J.* *421*, 157–162.
- Koike, T., Izumikawa, T., Sato, B., and Kitagawa, H. (2014). Identification of phosphatase that dephosphorylates xylose in the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *289*, 6695–6708.
- Kolb, M., Margetts, P.J., Sime, P.J., and Gauldie, J. (2001). Proteoglycans decorin and biglycan differentially modulate TGF-beta-mediated fibrotic responses in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* *280*, L1327–L1334.
- Korpetinou, A., Skandalis, S.S., Labropoulou, V.T., Smirlaki, G., Noulas, A., Karamanos, N.K., and Theocharis, A.D. (2014). Serglycin: at the crossroad of inflammation and malignancy. *Front Oncol* *3*, 327.
- Kreuger, J., and Kjellén, L. (2012). Heparan sulfate biosynthesis: regulation and variability. *J. Histochem. Cytochem.* *60*, 898–907.
- Kreuger, J., Salmivirta, M., Sturiale, L., Giménez-Gallego, G., and Lindahl, U. (2001). Sequence analysis of heparan sulfate epitopes with graded affinities for fibroblast growth factors 1 and 2. *J. Biol. Chem.* *276*, 30744–30752.
- Krishna, N.R., and Agrawal, P.K. (2000). Molecular structure of the carbohydrate-protein linkage region fragments from connective-tissue proteoglycans. *Adv Carbohydr Chem Biochem* *56*, 201–234.
- Krusius, T., Finne, J., Margolis, R.K., and Margolis, R.U. (1986). Identification of an O-glycosidic mannose-linked sialylated tetrasaccharide and keratan sulfate oligosaccharides in the chondroitin sulfate proteoglycan of brain. *J. Biol. Chem.* *261*, 8237–8242.
- Kuberan, B., Lech, M.Z., Beeler, D.L., Wu, Z.L., and Rosenberg, R.D. (2003). Enzymatic synthesis of antithrombin III-binding heparan sulfate pentasaccharide. *Nat. Biotechnol.* *21*, 1343–1346.
- Kusche, M., Bäckström, G., Riesenfeld, J., Petitou, M., Choay, J., and Lindahl, U. (1988). Biosynthesis of heparin. O-sulfation of the antithrombin-binding region. *J. Biol. Chem.* *263*, 15474–15484.
- Kusche-Gullberg, M., and Kjellén, L. (2003). Sulfotransferases in glycosaminoglycan biosynthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *13*, 605–611.
- Kwok, J.C.F., Dick, G., Wang, D., and Fawcett, J.W. (2011). Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol* *71*, 1073–1089.
- Lai, J., Chien, J., Staub, J., Avula, R., Greene, E.L., Matthews, T.A., Smith, D.I., Kaufmann, S.H., Roberts, L.R., and Shridhar, V. (2003). Loss of HSulf-1 up-regulates heparin-binding growth factor signaling in cancer. *J. Biol. Chem.* *278*, 23107–23117.
- Lai, J.-P., Chien, J.R., Moser, D.R., Staub, J.K., Aderca, I., Montoya, D.P., Matthews, T.A., Nagorney, D.M., Cunningham, J.M., Smith, D.I., et al. (2004). hSulf1 Sulfatase promotes apoptosis of hepatocellular cancer cells by decreasing heparin-binding growth factor signaling. *Gastroenterology* *126*, 231–248.

- Lamanna, W.C., Frese, M.-A., Balleininger, M., and Dierks, T. (2008). Sulf loss influences N-, 2-O-, and 6-O-sulfation of multiple heparan sulfate proteoglycans and modulates fibroblast growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* *283*, 27724–27735.
- Laremore, T.N., Zhang, F., and Linhardt, R.J. (2007). Ionic liquid matrix for direct UV-MALDI-TOF-MS analysis of dermatan sulfate and chondroitin sulfate oligosaccharides. *Anal. Chem.* *79*, 1604–1610.
- Lauder, R.M. (2009). Chondroitin sulphate: a complex molecule with potential impacts on a wide range of biological systems. *Complement Ther Med* *17*, 56–62.
- Lawrence, R., Yabe, T., Hajmohammadi, S., Rhodes, J., McNeely, M., Liu, J., Lamperti, E.D., Toselli, P.A., Lech, M., Spear, P.G., et al. (2007). The principal neuronal gD-type 3-O-sulfotransferases and their products in central and peripheral nervous system tissues. *Matrix Biol.* *26*, 442–455.
- Ledin, J., Staatz, W., Li, J.-P., Götte, M., Selleck, S., Kjellén, L., and Spillmann, D. (2004). Heparan sulfate structure in mice with genetically modified heparan sulfate production. *J. Biol. Chem.* *279*, 42732–42741.
- Lee, M.S., and Kong, J. (2015). Heparin: Physiology, Pharmacology, and Clinical Application. *Rev Cardiovasc Med* *16*, 189–199.
- Leonova, E.I., and Galzitskaya, O.V. (2013). Structure and functions of syndecans in vertebrates. *Biochemistry Mosc.* *78*, 1071–1085.
- Li, J. (2010). Glucuronyl C5-epimerase an enzyme converting glucuronic acid to iduronic acid in heparan sulfate/heparin biosynthesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* *93*, 59–78.
- Li, J.P., Gong, F., Darwish, K. El, Jalkanen, M., and Lindahl, U. (2001). Characterization of the D-glucuronyl C5-epimerase involved in the biosynthesis of heparin and heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* *276*, 20069–20077.
- Li, Y., Miao, L., Cai, H., Ding, J., Xiao, Y., Yang, J., and Zhang, D. (2013). The overexpression of glypican-5 promotes cancer cell migration and is associated with shorter overall survival in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* *6*, 1565–1572.
- Li, Y., Sun, C., Yates, E.A., Jiang, C., Wilkinson, M.C., and Fernig, D.G. (2016). Heparin binding preference and structures in the fibroblast growth factor family parallel their evolutionary diversification. *Open Biol* *6*.
- Lim, H.C., Mulhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2015). Cell surface heparan sulfate proteoglycans control adhesion and invasion of breast carcinoma cells. *Mol. Cancer* *14*, 15.
- Lin, L., McCroskery, S., Ross, J.M., Chak, Y., Neuhuber, B., and Daniels, M.P. (2010). Induction of filopodia-like protrusions by transmembrane agrin: role of agrin glycosaminoglycan chains and Rho-family GTPases. *Exp. Cell Res.* *316*, 2260–2277.
- Lind, T., Tufaro, F., McCormick, C., Lindahl, U., and Lidholt, K. (1998). The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 are glycosyltransferases required for the biosynthesis of heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* *273*, 26265–26268.

- Lindahl, U., Bäckström, G., Thunberg, L., and Leder, I.G. (1980). Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *77*, 6551–6555.
- Liu, C., Sheng, J., Krahn, J.M., Perera, L., Xu, Y., Hsieh, P.-H., Dou, W., Liu, J., and Pedersen, L.C. (2014). Molecular mechanism of substrate specificity for heparan sulfate 2-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* *289*, 13407–13418.
- Liu, J., Guo, Q., Chen, B., Yu, Y., Lu, H., and Li, Y.-Y. (2006a). Cathepsin B and its interacting proteins, bikunin and TSRC1, correlate with TNF-induced apoptosis of ovarian cancer cells OV-90. *FEBS Lett.* *580*, 245–250.
- Liu, P.C.C., Liu, X., Li, Y., Covington, M., Wynn, R., Huber, R., Hillman, M., Yang, G., Ellis, D., Marando, C., et al. (2006b). Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* *5*, 657–664.
- Lofgren, L., Sahlin, L., Jiang, S., Von Schoultz, B., Fernstad, R., Skoog, L., and Von Schoultz, E. (2007). Expression of syndecan-1 in paired samples of normal and malignant breast tissue from postmenopausal women. *Anticancer Res.* *27*, 3045–3050.
- Lonardo, F., Di Marco, E., King, C.R., Pierce, J.H., Segatto, O., Aaronson, S.A., and Di Fiore, P.P. (1990). The normal erbB-2 product is an atypical receptor-like tyrosine kinase with constitutive activity in the absence of ligand. *New Biol.* *2*, 992–1003.
- Lui, N.S., van Zante, A., Rosen, S.D., Jablons, D.M., and Lemjabbar-Alaoui, H. (2012). SULF2 expression by immunohistochemistry and overall survival in oesophageal cancer: a cohort study. *BMJ Open* *2*.
- Lum, D.H., Tan, J., Rosen, S.D., and Werb, Z. (2007). Gene trap disruption of the mouse heparan sulfate 6-O-endosulfatase gene, *Sulf2*. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 678–688.
- Luo, Y., Ye, S., Kan, M., and McKeehan, W.L. (2006). Structural specificity in a FGF7-affinity purified heparin octasaccharide required for formation of a complex with FGF7 and FGFR2IIIb. *J. Cell. Biochem.* *97*, 1241–1258.
- Maccarana, M., Casu, B., and Lindahl, U. (1993). Minimal sequence in heparin/heparan sulfate required for binding of basic fibroblast growth factor. *J. Biol. Chem.* *268*, 23898–23905.
- Maccarana, M., Olander, B., Malmström, J., Tiedemann, K., Aebersold, R., Lindahl, U., Li, J.-P., and Malmström, A. (2006). Biosynthesis of dermatan sulfate: chondroitin-glucuronate C5-epimerase is identical to SART2. *J. Biol. Chem.* *281*, 11560–11568.
- Maeda, T., Desouky, J., and Friedl, A. (2006). Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth in vivo and stimulates tumor angiogenesis. *Oncogene* *25*, 1408–1412.
- Mahtouk, K., Cremer, F.W., Rème, T., Jourdan, M., Baudard, M., Moreaux, J., Requirand, G., Fiol, G., De Vos, J., Moos, M., et al. (2006). Heparan sulphate proteoglycans are essential for the myeloma cell growth activity of EGF-family ligands in multiple myeloma. *Oncogene* *25*, 7180–7191.

- Mansouri, R., Haÿ, E., Marie, P.J., and Modrowski, D. (2015). Role of syndecan-2 in osteoblast biology and pathology. *Bonekey Rep* 4, 666.
- Mao, X., Gauche, C., Coughtrie, M.W.H., Bui, C., Gulberti, S., Merhi-Soussi, F., Ramalanjaona, N., Bertin-Jung, I., Diot, A., Dumas, D., et al. (2016). The heparan sulfate sulfotransferase 3-OST3A (HS3ST3A) is a novel tumor regulator and a prognostic marker in breast cancer. *Oncogene* 35, 5043–5055.
- Marcum, J.A., Fritze, L., Galli, S.J., Karp, G., and Rosenberg, R.D. (1983). Microvascular heparin-like species with anticoagulant activity. *Am. J. Physiol.* 245, H725–H733.
- Marcum, J.A., Atha, D.H., Fritze, L.M., Nawroth, P., Stern, D., and Rosenberg, R.D. (1986a). Cloned bovine aortic endothelial cells synthesize anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 261, 7507–7517.
- Marcum, J.A., Conway, E.M., Youssoufian, H., and Rosenberg, R.D. (1986b). Anticoagulant active heparin-like molecules from cultured fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 166, 253–258.
- Maretzky, T., Evers, A., Zhou, W., Swendeman, S.L., Wong, P.-M., Rafii, S., Reiss, K., and Blobel, C.P. (2011). Migration of growth factor-stimulated epithelial and endothelial cells depends on EGFR transactivation by ADAM17. *Nat Commun* 2, 229.
- Marmor, M.D., Skaria, K.B., and Yarden, Y. (2004). Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58, 903–913.
- Marneros, A.G., and Olsen, B.R. (2005). Physiological role of collagen XVIII and endostatin. *FASEB J.* 19, 716–728.
- Martinez, P., Denys, A., Delos, M., Sikora, A.-S., Carpentier, M., Julien, S., Pestel, J., and Allain, F. (2015). Macrophage polarization alters the expression and sulfation pattern of glycosaminoglycans. *Glycobiology* 25, 502–513.
- Martin-Subero, J.I., Ammerpohl, O., Bibikova, M., Wickham-Garcia, E., Agirre, X., Alvarez, S., Brüggemann, M., Bug, S., Calasanz, M.J., Deckert, M., et al. (2009). A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS ONE* 4, e6986.
- Masola, V., Secchi, M.F., Gambaro, G., and Onisto, M. (2014a). Heparanase as a target in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 14, 286–293.
- Masola, V., Zaza, G., Secchi, M.F., Gambaro, G., Lupo, A., and Onisto, M. (2014b). Heparanase is a key player in renal fibrosis by regulating TGF- β expression and activity. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 2122–2128.
- Matsuda, K., Maruyama, H., Guo, F., Kleeff, J., Itakura, J., Matsumoto, Y., Lander, A.D., and Korc, M. (2001). Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. *Cancer Res.* 61, 5562–5569.
- Maxhimer, J.B., Pesce, C.E., Stewart, R.A., Gattuso, P., Prinz, R.A., and Xu, X. (2005). Ductal carcinoma in situ of the breast and heparanase-1 expression: a molecular explanation for more aggressive subtypes. *J. Am. Coll. Surg.* 200, 328–335.

- McCarthy, K.J. (2015). The Basement Membrane Proteoglycans Perlecan and Agrin: Something Old, Something New. *Curr Top Membr* 76, 255–303.
- McCormick, C., Duncan, G., Goutsos, K.T., and Tufaro, F. (2000). The putative tumor suppressors EXT1 and EXT2 form a stable complex that accumulates in the Golgi apparatus and catalyzes the synthesis of heparan sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 668–673.
- McKeehan, W.L., Wu, X., and Kan, M. (1999). Requirement for anticoagulant heparan sulfate in the fibroblast growth factor receptor complex. *J. Biol. Chem.* 274, 21511–21514.
- Meen, A.J., Øynebråten, I., Reine, T.M., Duelli, A., Svennevig, K., Pejler, G., Jenssen, T., and Kolset, S.O. (2011). Serglycin is a major proteoglycan in polarized human endothelial cells and is implicated in the secretion of the chemokine GRO α /CXCL1. *J. Biol. Chem.* 286, 2636–2647.
- Meneghetti, M.C.Z., Hughes, A.J., Rudd, T.R., Nader, H.B., Powell, A.K., Yates, E.A., and Lima, M.A. (2015). Heparan sulfate and heparin interactions with proteins. *J R Soc Interface* 12, 0589.
- Metzger-Filho, O., Winer, E.P., and Krop, I. (2013). Pertuzumab: optimizing HER2 blockade. *Clin. Cancer Res.* 19, 5552–5556.
- Meyer, B., Thunberg, L., Lindahl, U., Larm, O., and Leder, I.G. (1981). The antithrombin-binding sequence of heparin studied by n.m.r. spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 88, C1–C4.
- Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 4719–4733.
- Mitchell, F. (2012). Obesity: glypican-4: role in insulin signalling. *Nat Rev Endocrinol* 8, 505.
- Miyamoto, K., Asada, K., Fukutomi, T., Okochi, E., Yagi, Y., Hasegawa, T., Asahara, T., Sugimura, T., and Ushijima, T. (2003). Methylation-associated silencing of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-2 (3-OST-2) in human breast, colon, lung and pancreatic cancers. *Oncogene* 22, 274–280.
- Mochizuki, H., Yoshida, K., Gotoh, M., Sugioka, S., Kikuchi, N., Kwon, Y.-D., Tawada, A., Maeyama, K., Inaba, N., Hiruma, T., et al. (2003). Characterization of a heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-5, an enzyme synthesizing a tetrasulfated disaccharide. *J. Biol. Chem.* 278, 26780–26787.
- Mochizuki, H., Yoshida, K., Shibata, Y., and Kimata, K. (2008). Tetrasulfated disaccharide unit in heparan sulfate: enzymatic formation and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 283, 31237–31245.
- De Moerloose, L., Spencer-Dene, B., Revest, J.M., Hajihosseini, M., Rosewell, I., and Dickson, C. (2000). An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development* 127, 483–492.
- Moon, A.F., Edavettal, S.C., Krahn, J.M., Munoz, E.M., Negishi, M., Linhardt, R.J., Liu, J., and Pedersen, L.C. (2004). Structural analysis of the sulfotransferase (3-o-sulfotransferase isoform 3) involved in the biosynthesis of an entry receptor for herpes simplex virus 1. *J. Biol. Chem.* 279, 45185–45193.

- Moon, A.F., Xu, Y., Woody, S.M., Krahn, J.M., Linhardt, R.J., Liu, J., and Pedersen, L.C. (2012). Dissecting the substrate recognition of 3-O-sulfotransferase for the biosynthesis of anticoagulant heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 5265–5270.
- Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S., and Rosen, S.D. (2002). Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *J. Biol. Chem.* *277*, 49175–49185.
- Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Bistrup, A., Lum, D.H., Egeblad, M., Boudreau, N., Werb, Z., and Rosen, S.D. (2005). Sulf-2, a proangiogenic heparan sulfate endosulfatase, is upregulated in breast cancer. *Neoplasia* *7*, 1001–1010.
- Moses, J., Oldberg, A., Cheng, F., and Fransson, L.A. (1997). Biosynthesis of the proteoglycan decorin--transient 2-phosphorylation of xylose during formation of the trisaccharide linkage region. *Eur. J. Biochem.* *248*, 521–526.
- Mostovich, L.A., Prudnikova, T.Y., Kondratov, A.G., Gubanov, N.V., Kharchenko, O.A., Kutsenko, O.S., Vavilov, P.V., Haraldson, K., Kashuba, V.I., Ernberg, I., et al. (2012). The TCF4/ β -catenin pathway and chromatin structure cooperate to regulate D-glucuronyl C5-epimerase expression in breast cancer. *Epigenetics* *7*, 930–939.
- Mundhenke, C., Meyer, K., Drew, S., and Friedl, A. (2002). Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 receptor binding in breast carcinomas. *Am. J. Pathol.* *160*, 185–194.
- Nadanaka, S., Zhou, S., Kagiya, S., Shoji, N., Sugahara, K., Sugihara, K., Asano, M., and Kitagawa, H. (2013). EXTL2, a member of the EXT family of tumor suppressors, controls glycosaminoglycan biosynthesis in a xylose kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *288*, 9321–9333.
- Nagamine, S., Keino-Masu, K., Shiomi, K., and Masu, M. (2010). Proteolytic cleavage of the rat heparan sulfate 6-O-endosulfatase SulfFP2 by furin-type proprotein convertases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *391*, 107–112.
- Nagano, O., and Saya, H. (2004). Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer Sci.* *95*, 930–935.
- Nastase, M.V., Iozzo, R.V., and Schaefer, L. (2014). Key roles for the small leucine-rich proteoglycans in renal and pulmonary pathophysiology. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*, 2460–2470.
- Nawroth, R., van Zante, A., Cervantes, S., McManus, M., Hebrok, M., and Rosen, S.D. (2007). Extracellular sulfatases, elements of the Wnt signaling pathway, positively regulate growth and tumorigenicity of human pancreatic cancer cells. *PLoS ONE* *2*, e392.
- Neugebauer, J.M., Amack, J.D., Peterson, A.G., Bisgrove, B.W., and Yost, H.J. (2009). FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia. *Nature* *458*, 651–654.
- Neugebauer, J.M., Cadwallader, A.B., Amack, J.D., Bisgrove, B.W., and Yost, H.J. (2013). Differential roles for 3-OSTs in the regulation of cilia length and motility. *Development* *140*, 3892–3902.

- Nguyen, T.K.N., Arungundram, S., Tran, V.M., Raman, K., Al-Mafraji, K., Venot, A., Boons, G.-J., and Kuberan, B. (2012). A synthetic heparan sulfate oligosaccharide library reveals the novel enzymatic action of D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-3a. *Mol Biosyst* 8, 609–614.
- Nieto, L., Canales, Á., Fernández, I.S., Santillana, E., González-Corrochano, R., Redondo-Horcajo, M., Cañada, F.J., Nieto, P., Martín-Lomas, M., Giménez-Gallego, G., et al. (2013). Heparin modulates the mitogenic activity of fibroblast growth factor by inducing dimerization of its receptor. a 3D view by using NMR. *Chembiochem* 14, 1732–1744.
- Nikitovic, D., Chalkiadaki, G., Berdiaki, A., Aggelidakis, J., Katonis, P., Karamanos, N.K., and Tzanakakis, G.N. (2011). Lumican regulates osteosarcoma cell adhesion by modulating TGFβ2 activity. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 928–935.
- Nikitovic, D., Kouvidi, K., Voudouri, K., Berdiaki, A., Karousou, E., Passi, A., and Tzanakakis, G.N. (2014a). The motile breast cancer phenotype roles of proteoglycans/glycosaminoglycans. *Biomed Res Int* 2014, 124321.
- Nikitovic, D., Papoutsidakis, A., Karamanos, N.K., and Tzanakakis, G.N. (2014b). Lumican affects tumor cell functions, tumor-ECM interactions, angiogenesis and inflammatory response. *Matrix Biol.* 35, 206–214.
- Niu, J., Chang, Z., Peng, B., Xia, Q., Lu, W., Huang, P., Tsao, M.-S., and Chiao, P.J. (2007). Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor-7-regulated cell migration and invasion through activation of NF-kappaB transcription factors. *J. Biol. Chem.* 282, 6001–6011.
- Nurcombe, V., Smart, C.E., Chipperfield, H., Cool, S.M., Boilly, B., and Hondermarck, H. (2000). The proliferative and migratory activities of breast cancer cells can be differentially regulated by heparan sulfates. *J. Biol. Chem.* 275, 30009–30018.
- O'Donnell, C.D., Tiwari, V., Oh, M.-J., and Shukla, D. (2006). A role for heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 2 in herpes simplex virus type 1 entry and spread. *Virology* 346, 452–459.
- Oegema, T.R., Kraft, E.L., Jourdian, G.W., and Van Valen, T.R. (1984). Phosphorylation of chondroitin sulfate in proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *J. Biol. Chem.* 259, 1720–1726.
- Oh, J.-H., Kim, Y.K., Jung, J.-Y., Shin, J., Kim, K.H., Cho, K.H., Eun, H.C., and Chung, J.H. (2011). Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *J. Dermatol. Sci.* 62, 192–201.
- Okajima, T., Yoshida, K., Kondo, T., and Furukawa, K. (1999). Human homolog of *Caenorhabditis elegans* sqv-3 gene is galactosyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 274, 22915–22918.
- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., and Hynes, N.E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* 19, 3159–3167.
- O'Reilly, M.S., Pirie-Shepherd, S., Lane, W.S., and Folkman, J. (1999). Antiangiogenic activity of the cleaved conformation of the serpin antithrombin. *Science* 285, 1926–1928.

- Pallerla, S.R., Lawrence, R., Lewejohann, L., Pan, Y., Fischer, T., Schlomann, U., Zhang, X., Esko, J.D., and Grobe, K. (2008). Altered heparan sulfate structure in mice with deleted NDST3 gene function. *J. Biol. Chem.* *283*, 16885–16894.
- Pankonin, M.S., Gallagher, J.T., and Loeb, J.A. (2005). Specific structural features of heparan sulfate proteoglycans potentiate neuregulin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* *280*, 383–388.
- Pap, T., and Bertrand, J. (2013). Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation. *Nat Rev Rheumatol* *9*, 43–55.
- Patterson, A.M., Delday, M.I., van Kuppevelt, T.H., Loh, G., Blaut, M., Haller, D., Grant, G., and Kelly, D. (2012). Expression of heparan sulfate proteoglycans in murine models of experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* *18*, 1112–1126.
- Paulick, M.G., and Bertozzi, C.R. (2008). The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry* *47*, 6991–7000.
- Pejler, G., and David, G. (1987). Basement-membrane heparan sulphate with high affinity for antithrombin synthesized by normal and transformed mouse mammary epithelial cells. *Biochem. J.* *248*, 69–77.
- Pejler, G., Bäckström, G., Lindahl, U., Paulsson, M., Dziadek, M., Fujiwara, S., and Timpl, R. (1987). Structure and affinity for antithrombin of heparan sulfate chains derived from basement membrane proteoglycans. *J. Biol. Chem.* *262*, 5036–5043.
- Pejler, G., Abrink, M., and Wernersson, S. (2009). Serglycin proteoglycan: regulating the storage and activities of hematopoietic proteases. *Biofactors* *35*, 61–68.
- Pempe, E.H., Burch, T.C., Law, C.J., and Liu, J. (2012). Substrate specificity of 6-O-endosulfatase (Sulf-2) and its implications in synthesizing anticoagulant heparan sulfate. *Glycobiology* *22*, 1353–1362.
- Peterson, S., Frick, A., and Liu, J. (2009). Design of biologically active heparan sulfate and heparin using an enzyme-based approach. *Nat Prod Rep* *26*, 610–627.
- Petrey, A.C., and de la Motte, C.A. (2014). Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol* *5*, 101.
- Piepkorn, M., Pittelkow, M.R., and Cook, P.W. (1998). Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors. *J. Invest. Dermatol.* *111*, 715–721.
- Pikas, D.S., Eriksson, I., and Kjellén, L. (2000). Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns. *Biochemistry* *39*, 4552–4558.
- Pinhal, M.A., Smith, B., Olson, S., Aikawa, J., Kimata, K., and Esko, J.D. (2001). Enzyme interactions in heparan sulfate biosynthesis: uronosyl 5-epimerase and 2-O-sulfotransferase interact in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 12984–12989.
- Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B.J., Sela, M., et al. (1996). Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* *15*, 2452–2467.

- Poulain, F.E., and Yost, H.J. (2015). Heparan sulfate proteoglycans: a sugar code for vertebrate development? *Development* *142*, 3456–3467.
- Presto, J., Thuveson, M., Carlsson, P., Busse, M., Wilén, M., Eriksson, I., Kusche-Gullberg, M., and Kjellén, L. (2008). Heparan sulfate biosynthesis enzymes EXT1 and EXT2 affect NDST1 expression and heparan sulfate sulfation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 4751–4756.
- Princivalle, M., Hasan, S., Hosseini, G., and de Agostini, A.I. (2001). Anticoagulant heparan sulfate proteoglycans expression in the rat ovary peaks in preovulatory granulosa cells. *Glycobiology* *11*, 183–194.
- Prochazka, L., Tesarik, R., and Turanek, J. (2014). Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer. *Cell. Signal.* *26*, 2234–2239.
- Prudnikova, T.Y., Mostovich, L.A., Domanitskaya, N.V., Pavlova, T.V., Kashuba, V.I., Zabarovsky, E.R., and Grigorieva, E.V. (2010). Antiproliferative effect of D-glucuronyl C5-epimerase in human breast cancer cells. *Cancer Cell Int.* *10*, 27.
- Prudnikova, T.Y., Mostovich, L.A., Kashuba, V.I., Ernberg, I., Zabarovsky, E.R., and Grigorieva, E.V. (2012). miRNA-218 contributes to the regulation of D-glucuronyl C5-epimerase expression in normal and tumor breast tissues. *Epigenetics* *7*, 1109–1114.
- Pugia, M.J., Valdes, R., and Jortani, S.A. (2007). Bikunin (urinary trypsin inhibitor): structure, biological relevance, and measurement. *Adv Clin Chem* *44*, 223–245.
- Purushothaman, A., and Toole, B.P. (2014). Serglycin proteoglycan is required for multiple myeloma cell adhesion, in vivo growth, and vascularization. *J. Biol. Chem.* *289*, 5499–5509.
- Pye, D.A., Vives, R.R., Turnbull, J.E., Hyde, P., and Gallagher, J.T. (1998). Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *J. Biol. Chem.* *273*, 22936–22942.
- Qin, Y., Ke, J., Gu, X., Fang, J., Wang, W., Cong, Q., Li, J., Tan, J., Brunzelle, J.S., Zhang, C., et al. (2015). Structural and functional study of D-glucuronyl C5-epimerase. *J. Biol. Chem.* *290*, 4620–4630.
- Rabenstein, D.L. (2002). Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep* *19*, 312–331.
- Rahmoune, H., Turnbull, J.E., Gallagher, J.T., Rudland, P.S., and Fernig, D.G. (1996). Heparan sulphate in breast cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* *24*, 355S.
- Raman, K., Nguyen, T.K.N., and Kuberan, B. (2011). Is N-sulfation just a gateway modification during heparan sulfate biosynthesis? *FEBS Lett.* *585*, 3420–3423.
- Rapraeger, A.C., Krufka, A., and Olwin, B.B. (1991). Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science* *252*, 1705–1708.
- Rauch, U., Feng, K., and Zhou, X.H. (2001). Neurocan: a brain chondroitin sulfate proteoglycan. *Cell. Mol. Life Sci.* *58*, 1842–1856.

- Richardsen, E., Uglehus, R.D., Johnsen, S.H., and Busund, L.-T. (2015). Macrophage-colony stimulating factor (CSF1) predicts breast cancer progression and mortality. *Anticancer Res.* *35*, 865–874.
- Richman, S.D., Southward, K., Chambers, P., Cross, D., Barrett, J., Hemmings, G., Taylor, M., Wood, H., Hutchins, G., Foster, J.M., et al. (2016). HER2 overexpression and amplification as a potential therapeutic target in colorectal cancer: analysis of 3256 patients enrolled in the QUASAR, FOCUS and PICCOLO colorectal cancer trials. *J. Pathol.* *238*, 562–570.
- Ringvall, M., and Kjellén, L. (2010). Mice deficient in heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 1. *Prog Mol Biol Transl Sci* *93*, 35–58.
- Rong, J., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U., and Kusche-Gullberg, M. (2001). Substrate specificity of the heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase. *Biochemistry* *40*, 5548–5555.
- Rönnerberg, E., Melo, F.R., and Pejler, G. (2012). Mast cell proteoglycans. *J. Histochem. Cytochem.* *60*, 950–962.
- Rosen, S.D., and Lemjabbar-Alaoui, H. (2010). Sulf-2: an extracellular modulator of cell signaling and a cancer target candidate. *Expert Opin. Ther. Targets* *14*, 935–949.
- Rosenberg, R.D., and Damus, P.S. (1973). The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J. Biol. Chem.* *248*, 6490–6505.
- Roskoski, R. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* *79*, 34–74.
- De Rossi, G., and Whiteford, J.R. (2014). Syndecans in angiogenesis and endothelial cell biology. *Biochem. Soc. Trans.* *42*, 1643–1646.
- De Rossi, G., Evans, A.R., Kay, E., Woodfin, A., McKay, T.R., Nourshargh, S., and Whiteford, J.R. (2014). Shed syndecan-2 inhibits angiogenesis. *J. Cell. Sci.* *127*, 4788–4799.
- Rühland, C., Schönherr, E., Robenek, H., Hansen, U., Iozzo, R.V., Bruckner, P., and Seidler, D.G. (2007). The glycosaminoglycan chain of decorin plays an important role in collagen fibril formation at the early stages of fibrillogenesis. *FEBS J.* *274*, 4246–4255.
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H.-M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., and Blobel, C.P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* *164*, 769–779.
- Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *19*, 183–232.
- Samson, S.C., Ferrer, T., Jou, C.J., Sachse, F.B., Shankaran, S.S., Shaw, R.M., Chi, N.C., Tristani-Firouzi, M., and Yost, H.J. (2013). 3-OST-7 regulates BMP-dependent cardiac contraction. *PLoS Biol.* *11*, e1001727.
- Sanderson, R.D., and Iozzo, R.V. (2012). Targeting heparanase for cancer therapy at the tumor-matrix interface. *Matrix Biol.* *31*, 283–284.

- Santra, M., Eichstetter, I., and Iozzo, R.V. (2000). An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 275, 35153–35161.
- Sarrazin, S., Lamanna, W.C., and Esko, J.D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G., and Narayanasami, U. (2002). Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 521–528.
- Schick, B.P. (2010). Serglycin proteoglycan deletion in mouse platelets: physiological effects and their implications for platelet contributions to thrombosis, inflammation, atherosclerosis, and metastasis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 93, 235–287.
- Schick, B.P., Ho, H.-C.K., Brodbeck, K.C., Wrigley, C.W., and Klimas, J. (2003). Serglycin proteoglycan expression and synthesis in embryonic stem cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1593, 259–267.
- Schnepp, A., Komp Lindgren, P., Hülsmann, H., Kröger, S., Paulsson, M., and Hartmann, U. (2005). Mouse testican-2. Expression, glycosylation, and effects on neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 280, 11274–11280.
- Schulze, W.X., Deng, L., and Mann, M. (2005). Phosphotyrosine interactome of the ErbB-receptor kinase family. *Mol. Syst. Biol.* 1, 2005.0008.
- Scully, O.J., Chua, P.-J., Harve, K.S., Bay, B.-H., and Yip, G.W. (2012). Serglycin in health and diseases. *Anat Rec (Hoboken)* 295, 1415–1420.
- Senay, C., Lind, T., Muguruma, K., Tone, Y., Kitagawa, H., Sugahara, K., Lidholt, K., Lindahl, U., and Kusche-Gullberg, M. (2000). The EXT1/EXT2 tumor suppressors: catalytic activities and role in heparan sulfate biosynthesis. *EMBO Rep.* 1, 282–286.
- Seppinen, L., and Pihlajaniemi, T. (2011). The multiple functions of collagen XVIII in development and disease. *Matrix Biol.* 30, 83–92.
- Sergina, N.V., and Moasser, M.M. (2007). The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets. *Trends Mol Med* 13, 527–534.
- Shen, H., Du, G., Liu, Z., Bao, J., Yu, Q., Jia, C., Liang, X., and Shan, L. (2015). Assessment and prognostic analysis of EGFR mutations or/and HER2 overexpression in Uygur's Non-small Cell Lung Cancer. *Int J Clin Exp Med* 8, 22300–22309.
- Sheng, J., Xu, Y., Dulaney, S.B., Huang, X., and Liu, J. (2012). Uncovering biphasic catalytic mode of C5-epimerase in heparan sulfate biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 287, 20996–21002.
- Shimo, T., Gentili, C., Iwamoto, M., Wu, C., Koyama, E., and Pacifici, M. (2004). Indian hedgehog and syndecans-3 coregulate chondrocyte proliferation and function during chick limb skeletogenesis. *Dev. Dyn.* 229, 607–617.
- Shivapurkar, N., Sherman, M.E., Stastny, V., Echebiri, C., Rader, J.S., Nayar, R., Bonfiglio, T.A., Gazdar, A.F., and Wang, S.S. (2007). Evaluation of candidate methylation markers to detect cervical neoplasia. *Gynecol. Oncol.* 107, 549–553.

- Shriver, Z., Capila, I., Venkataraman, G., and Sasisekharan, R. (2012). Heparin and heparan sulfate: analyzing structure and microheterogeneity. *Handb Exp Pharmacol* 159–176.
- Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N.W., Bai, X., Esko, J.D., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., Rosenberg, R.D., and Spear, P.G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99, 13–22.
- Shworak, N.W., Liu, J., Petros, L.M., Zhang, L., Kobayashi, M., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Rosenberg, R.D. (1999). Multiple isoforms of heparan sulfate D-glucosaminyl 3-O-sulfotransferase. Isolation, characterization, and expression of human cdnas and identification of distinct genomic loci. *J. Biol. Chem.* 274, 5170–5184.
- Shworak, N.W., HajMohammadi, S., de Agostini, A.I., and Rosenberg, R.D. (2002). Mice deficient in heparan sulfate 3-O-sulfotransferase-1: normal hemostasis with unexpected perinatal phenotypes. *Glycoconj. J.* 19, 355–361.
- Sikora, A.-S., Delos, M., Martinez, P., Carpentier, M., Allain, F., and Denys, A. (2016). Regulation of the Expression of Heparan Sulfate 3-O-Sulfotransferase 3B (HS3ST3B) by Inflammatory Stimuli in Human Monocytes. *J. Cell. Biochem.* 117, 1529–1542.
- Sirkisoon, S.R., Carpenter, R.L., Rimkus, T., Miller, L., Metheny-Barlow, L., and Lo, H.-W. (2016). EGFR and HER2 signaling in breast cancer brain metastasis. *Front Biosci (Elite Ed)* 8, 245–263.
- Sivan, S.S., Wachtel, E., and Roughley, P. (2014). Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 3181–3189.
- Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783–792.
- Slevin, M., Krupinski, J., Gaffney, J., Matou, S., West, D., Delisser, H., Savani, R.C., and Kumar, S. (2007). Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biol.* 26, 58–68.
- Smeds, E., Feta, A., and Kusche-Gullberg, M. (2010). Target selection of heparan sulfate hexuronic acid 2-O-sulfotransferase. *Glycobiology* 20, 1274–1282.
- Smith, S.M.-L., West, L.A., and Hassell, J.R. (2007). The core protein of growth plate perlecan binds FGF-18 and alters its mitogenic effect on chondrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* 468, 244–251.
- Smith, S.O., Smith, C.S., and Bormann, B.J. (1996). Strong hydrogen bonding interactions involving a buried glutamic acid in the transmembrane sequence of the neu/erbB-2 receptor. *Nat. Struct. Biol.* 3, 252–258.
- Solomon, L. (1964). HEREDITARY MULTIPLE EXOSTOSIS. *Am. J. Hum. Genet.* 16, 351–363.
- Stanley, E.R., and Chitu, V. (2014). CSF-1 receptor signaling in myeloid cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6.

Staub, J., Chien, J., Pan, Y., Qian, X., Narita, K., Aletti, G., Scheerer, M., Roberts, L.R., Molina, J., and Shridhar, V. (2007). Epigenetic silencing of HSulf-1 in ovarian cancer: implications in chemoresistance. *Oncogene* *26*, 4969–4978.

Stepp, M.A., Pal-Ghosh, S., Tadvalkar, G., and Pajooresh-Ganji, A. (2015). Syndecan-1 and Its Expanding List of Contacts. *Adv Wound Care (New Rochelle)* *4*, 235–249.

Stern, D.F., Kamps, M.P., and Cao, H. (1988). Oncogenic activation of p185neu stimulates tyrosine phosphorylation in vivo. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 3969–3973.

Stewart, J., James, J., McCluggage, G.W., McQuaid, S., Arthur, K., Boyle, D., Mullan, P., McArt, D., Yan, B., Irwin, G., et al. (2015). Analysis of wntless (WLS) expression in gastric, ovarian, and breast cancers reveals a strong association with HER2 overexpression. *Mod. Pathol.* *28*, 428–436.

Sueyoshi, T., Kakuta, Y., Pedersen, L.C., Wall, F.E., Pedersen, L.G., and Negishi, M. (1998). A role of Lys614 in the sulfotransferase activity of human heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase. *FEBS Lett.* *433*, 211–214.

Sugahara, K., and Kitagawa, H. (2000). Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *10*, 518–527.

Sugahara, K., and Kitagawa, H. (2002). Heparin and heparan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life* *54*, 163–175.

Takahashi, I., Noguchi, N., Nata, K., Yamada, S., Kaneiwa, T., Mizumoto, S., Ikeda, T., Sugihara, K., Asano, M., Yoshikawa, T., et al. (2009). Important role of heparan sulfate in postnatal islet growth and insulin secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *383*, 113–118.

Takashima, Y., Keino-Masu, K., Yashiro, H., Hara, S., Suzuki, T., van Kuppevelt, T.H., Masu, M., and Nagata, M. (2016). Heparan sulfate 6-O-endosulfatases, Sulf1 and Sulf2, regulate glomerular integrity by modulating growth factor signaling. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *310*, F395–F408.

Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., and Shaw, S. (1993). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* *361*, 79–82.

Tang, R., and Rosen, S.D. (2009). Functional consequences of the subdomain organization of the sulfs. *J. Biol. Chem.* *284*, 21505–21514.

Teclé, E., Diaz-Balzac, C.A., and Bülow, H.E. (2013). Distinct 3-O-sulfated heparan sulfate modification patterns are required for kal-1-dependent neurite branching in a context-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. *G3 (Bethesda)* *3*, 541–552.

Thacker, B.E., Xu, D., Lawrence, R., and Esko, J.D. (2014). Heparan sulfate 3-O-sulfation: a rare modification in search of a function. *Matrix Biol.* *35*, 60–72.

Thacker, B.E., Seamen, E., Lawrence, R., Parker, M.W., Xu, Y., Liu, J., Vander Kooi, C.W., and Esko, J.D. (2016). Expanding the 3-O-Sulfate Proteome--Enhanced Binding of Neuropilin-1 to 3-O-Sulfated Heparan Sulfate Modulates Its Activity. *ACS Chem. Biol.* *11*, 971–980.

- Thelin, M.A., Bartolini, B., Axelsson, J., Gustafsson, R., Tykesson, E., Pera, E., Oldberg, Å., Maccarana, M., and Malmstrom, A. (2013). Biological functions of iduronic acid in chondroitin/dermatan sulfate. *FEBS J.* *280*, 2431–2446.
- Thunberg, L., Bäckström, G., and Lindahl, U. (1982). Further characterization of the antithrombin-binding sequence in heparin. *Carbohydr. Res.* *100*, 393–410.
- Tiwari, V., O'Donnell, C.D., Oh, M.-J., Valyi-Nagy, T., and Shukla, D. (2005). A role for 3-O-sulfotransferase isoform-4 in assisting HSV-1 entry and spread. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *338*, 930–937.
- Tkachenko, E., Rhodes, J.M., and Simons, M. (2005). Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ. Res.* *96*, 488–500.
- Tone, Y., Pedersen, L.C., Yamamoto, T., Izumikawa, T., Kitagawa, H., Nishihara, J., Tamura, J.-I., Negishi, M., and Sugahara, K. (2008). 2-o-phosphorylation of xylose and 6-o-sulfation of galactose in the protein linkage region of glycosaminoglycans influence the glucuronyltransferase-I activity involved in the linkage region synthesis. *J. Biol. Chem.* *283*, 16801–16807.
- Turkson, J., and Jove, R. (2000). STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* *19*, 6613–6626.
- Turnbull, J.E., Fernig, D.G., Ke, Y., Wilkinson, M.C., and Gallagher, J.T. (1992). Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* *267*, 10337–10341.
- Turner, N., and Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 116–129.
- Uchimura, K., Morimoto-Tomita, M., Bistrup, A., Li, J., Lyon, M., Gallagher, J., Werb, Z., and Rosen, S.D. (2006). HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochem.* *7*, 2.
- Ueno, M., Yamada, S., Zako, M., Bernfield, M., and Sugahara, K. (2001). Structural characterization of heparan sulfate and chondroitin sulfate of syndecan-1 purified from normal murine mammary gland epithelial cells. Common phosphorylation of xylose and differential sulfation of galactose in the protein linkage region tetrasaccharide sequence. *J. Biol. Chem.* *276*, 29134–29140.
- Ussar, S., Bezy, O., Blüher, M., and Kahn, C.R. (2012). Glypican-4 enhances insulin signaling via interaction with the insulin receptor and serves as a novel adipokine. *Diabetes* *61*, 2289–2298.
- Valla, S., Li, J., Ertesvåg, H., Barbeyron, T., and Lindahl, U. (2001). Hexuronyl C5-epimerases in alginate and glycosaminoglycan biosynthesis. *Biochimie* *83*, 819–830.
- Vannahme, C., Schübel, S., Herud, M., Gösling, S., Hülsmann, H., Paulsson, M., Hartmann, U., and Maurer, P. (1999). Molecular cloning of testican-2: defining a novel calcium-binding proteoglycan family expressed in brain. *J. Neurochem.* *73*, 12–20.

- Vigushin, D.M., Ali, S., Pace, P.E., Mirsaidi, N., Ito, K., Adcock, I., and Coombes, R.C. (2001). Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin. Cancer Res.* 7, 971–976.
- Vivès, R.R., Seffouh, A., and Lortat-Jacob, H. (2014). Post-Synthetic Regulation of HS Structure: The Yin and Yang of the Sulfs in Cancer. *Front Oncol* 3, 331.
- Viviano, B.L., Paine-Saunders, S., Gasiunas, N., Gallagher, J., and Saunders, S. (2004). Domain-specific modification of heparan sulfate by Qsulf1 modulates the binding of the bone morphogenetic protein antagonist Noggin. *J. Biol. Chem.* 279, 5604–5611.
- van der Voort, R., Taher, T.E., Wielenga, V.J., Spaargaren, M., Prevo, R., Smit, L., David, G., Hartmann, G., Gherardi, E., and Pals, S.T. (1999). Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *J. Biol. Chem.* 274, 6499–6506.
- Waaijer, C.J.F., de Andrea, C.E., Hamilton, A., van Oosterwijk, J.G., Stringer, S.E., and Bovée, J.V.M.G. (2012). Cartilage tumour progression is characterized by an increased expression of heparan sulphate 6O-sulphation-modifying enzymes. *Virchows Arch.* 461, 475–481.
- Wang, H., Jin, H., Beauvais, D.M., and Rapraeger, A.C. (2014). Cytoplasmic domain interactions of syndecan-1 and syndecan-4 with $\alpha 6\beta 4$ integrin mediate human epidermal growth factor receptor (HER1 and HER2)-dependent motility and survival. *J. Biol. Chem.* 289, 30318–30332.
- Wang, L., Fuster, M., Sriramarao, P., and Esko, J.D. (2005). Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat. Immunol.* 6, 902–910.
- Wang, S., Ai, X., Freeman, S.D., Pownall, M.E., Lu, Q., Kessler, D.S., and Emerson, C.P. (2004). QSulf1, a heparan sulfate 6-O-endosulfatase, inhibits fibroblast growth factor signaling in mesoderm induction and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 4833–4838.
- Wang, W., Zhong, B., Sun, J., Cao, J., Tian, J., Zhong, N., Zhao, W., Tian, L., Xu, P., Guo, D., et al. (2011). Down-regulated HS6ST2 in osteoarthritis and Kashin-Beck disease inhibits cell viability and influences expression of the genes relevant to aggrecan metabolism of human chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)* 50, 2176–2186.
- Wang, W., Ju, X., Sun, Z., Hou, W., Yang, L., and Zhang, R. (2015). Overexpression of heparan sulfate 6-O-sulfotransferase-2 enhances fibroblast growth factor-mediated chondrocyte growth and differentiation. *Int. J. Mol. Med.* 36, 825–832.
- Wei, W., Liu, W., Serra, S., Asa, S.L., and Ezzat, S. (2015). The breast cancer susceptibility FGFR2 provides an alternate mode of HER2 activation. *Oncogene*.
- Weiner, D.B., Liu, J., Cohen, J.A., Williams, W.V., and Greene, M.I. (1989). A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* 339, 230–231.
- Weller, M., Stupp, R., Reifenberger, G., Brandes, A.A., van den Bent, M.J., Wick, W., and Hegi, M.E. (2010). MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol* 6, 39–51.

- Whisstock, J.C., Pike, R.N., Jin, L., Skinner, R., Pei, X.Y., Carrell, R.W., and Lesk, A.M. (2000). Conformational changes in serpins: II. The mechanism of activation of antithrombin by heparin. *J. Mol. Biol.* *301*, 1287–1305.
- Wight, T.N., Kinsella, M.G., Evanko, S.P., Potter-Perigo, S., and Merrilees, M.J. (2014). Versican and the regulation of cell phenotype in disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1840*, 2441–2451.
- Wise, C.A., Clines, G.A., Massa, H., Trask, B.J., and Lovett, M. (1997). Identification and localization of the gene for EXTL, a third member of the multiple exostoses gene family. *Genome Res.* *7*, 10–16.
- Witt, R.M., Hecht, M.-L., Pazyra-Murphy, M.F., Cohen, S.M., Noti, C., van Kuppevelt, T.H., Fuller, M., Chan, J.A., Hopwood, J.J., Seeberger, P.H., et al. (2013). Heparan sulfate proteoglycans containing a glypican 5 core and 2-O-sulfo-iduronic acid function as Sonic Hedgehog co-receptors to promote proliferation. *J. Biol. Chem.* *288*, 26275–26288.
- Wlodarczyk, J., Mukhina, I., Kaczmarek, L., and Dityatev, A. (2011). Extracellular matrix molecules, their receptors, and secreted proteases in synaptic plasticity. *Dev Neurobiol* *71*, 1040–1053.
- Wong, A., Lamothe, B., Lee, A., Schlessinger, J., Lax, I., and Li, A. (2002). FRS2 alpha attenuates FGF receptor signaling by Grb2-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Cbl. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 6684–6689.
- Wood, M.W., Breitschwerdt, E.B., and Gookin, J.L. (2011). Autocrine effects of interleukin-6 mediate acute-phase proinflammatory and tissue-reparative transcriptional responses of canine bladder mucosa. *Infect. Immun.* *79*, 708–715.
- Wuyts, W., Van Hul, W., Hendrickx, J., Speleman, F., Wauters, J., De Boulle, K., Van Roy, N., Van Agtmael, T., Bossuyt, P., and Willems, P.J. (1997). Identification and characterization of a novel member of the EXT gene family, EXTL2. *Eur. J. Hum. Genet.* *5*, 382–389.
- Wuyts, W., Van Hul, W., De Boulle, K., Hendrickx, J., Bakker, E., Vanhoenacker, F., Mollica, F., Lüdecke, H.J., Sayli, B.S., Pazzaglia, U.E., et al. (1998). Mutations in the EXT1 and EXT2 genes in hereditary multiple exostoses. *Am. J. Hum. Genet.* *62*, 346–354.
- Xia, G., Chen, J., Tiwari, V., Ju, W., Li, J.-P., Malmstrom, A., Shukla, D., and Liu, J. (2002). Heparan sulfate 3-O-sulfotransferase isoform 5 generates both an antithrombin-binding site and an entry receptor for herpes simplex virus, type 1. *J. Biol. Chem.* *277*, 37912–37919.
- Xiang, Y.Y., Ladeda, V., and Filmus, J. (2001). Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer. *Oncogene* *20*, 7408–7412.
- Xu, D., Tiwari, V., Xia, G., Clement, C., Shukla, D., and Liu, J. (2005). Characterization of heparan sulphate 3-O-sulphotransferase isoform 6 and its role in assisting the entry of herpes simplex virus type 1. *Biochem. J.* *385*, 451–459.
- Xu, D., Song, D., Pedersen, L.C., and Liu, J. (2007a). Mutational study of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase and chondroitin sulfate 2-O-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* *282*, 8356–8367.

- Xu, D., Moon, A.F., Song, D., Pedersen, L.C., and Liu, J. (2008). Engineering sulfotransferases to modify heparan sulfate. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 200–202.
- Xu, X., Rao, G., Quiros, R.M., Kim, A.W., Miao, H.-Q., Brunn, G.J., Platt, J.L., Gattuso, P., and Prinz, R.A. (2007b). In vivo and in vitro degradation of heparan sulfate (HS) proteoglycans by HPR1 in pancreatic adenocarcinomas. Loss of cell surface HS suppresses fibroblast growth factor 2-mediated cell signaling and proliferation. *J. Biol. Chem.* *282*, 2363–2373.
- Yamada, S., Yoshida, K., Sugiura, M., Sugahara, K., Khoo, K.H., Morris, H.R., and Dell, A. (1993). Structural studies on the bacterial lyase-resistant tetrasaccharides derived from the antithrombin III-binding site of porcine intestinal heparin. *J. Biol. Chem.* *268*, 4780–4787.
- Yang, X., Zhang, Z., Qiu, M., Hu, J., Fan, X., Wang, J., Xu, L., and Yin, R. (2013). Glypican-5 is a novel metastasis suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett.* *341*, 265–273.
- Yang, Y., Macleod, V., Miao, H.-Q., Theus, A., Zhan, F., Shaughnessy, J.D., Sawyer, J., Li, J.-P., Zcharia, E., Vlodaysky, I., et al. (2007). Heparanase enhances syndecan-1 shedding: a novel mechanism for stimulation of tumor growth and metastasis. *J. Biol. Chem.* *282*, 13326–13333.
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M.X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 127–137.
- Ye, S., Luo, Y., Lu, W., Jones, R.B., Linhardt, R.J., Capila, I., Toida, T., Kan, M., Pelletier, H., and McKeehan, W.L. (2001). Structural basis for interaction of FGF-1, FGF-2, and FGF-7 with different heparan sulfate motifs. *Biochemistry* *40*, 14429–14439.
- Yiu, G.K., Kaunisto, A., Chin, Y.R., and Toker, A. (2011). NFAT promotes carcinoma invasive migration through glypican-6. *Biochem. J.* *440*, 157–166.
- Yoneda, A., Lendorf, M.E., Couchman, J.R., and Multhaupt, H.A.B. (2012). Breast and ovarian cancers: a survey and possible roles for the cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Histochem. Cytochem.* *60*, 9–21.
- Zak, B.M., Crawford, B.E., and Esko, J.D. (2002). Hereditary multiple exostoses and heparan sulfate polymerization. *Biochim. Biophys. Acta* *1573*, 346–355.
- Zang, X.-P., Siwak, D.R., Nguyen, T.X., Tari, A.M., and Pento, J.T. (2004). KGF-induced motility of breast cancer cells is dependent on Grb2 and Erk1,2. *Clin. Exp. Metastasis* *21*, 437–443.
- Zetser, A., Bashenko, Y., Edovitsky, E., Levy-Adam, F., Vlodaysky, I., and Ilan, N. (2006). Heparanase induces vascular endothelial growth factor expression: correlation with p38 phosphorylation levels and Src activation. *Cancer Res.* *66*, 1455–1463.
- Zhang, L., Lawrence, R., Schwartz, J.J., Bai, X., Wei, G., Esko, J.D., and Rosenberg, R.D. (2001). The effect of precursor structures on the action of glucosaminyl 3-O-sulfotransferase-1 and the biosynthesis of anticoagulant heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* *276*, 28806–28813.
- Zhang, L., Sullivan, P., Suyama, J., and Marchetti, D. (2010). Epidermal growth factor-induced heparanase nucleolar localization augments DNA topoisomerase I activity in brain metastatic breast cancer. *Mol. Cancer Res.* *8*, 278–290.

Zhang, X., Ibrahimi, O.A., Olsen, S.K., Umemori, H., Mohammadi, M., and Ornitz, D.M. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J. Biol. Chem.* *281*, 15694–15700.

Zhang, Y., Li, J., Partovian, C., Sellke, F.W., and Simons, M. (2003). Syndecan-4 modulates basic fibroblast growth factor 2 signaling in vivo. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *284*, H2078–H2082.

Zittermann, S.I., Capurro, M.I., Shi, W., and Filmus, J. (2010). Soluble glypican 3 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Int. J. Cancer* *126*, 1291–1301.

Zuo, T., Wang, L., Morrison, C., Chang, X., Zhang, H., Li, W., Liu, Y., Wang, Y., Liu, X., Chan, M.W.Y., et al. (2007). FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell* *129*, 1275–1286.

L'héparane sulfate 3-O-sulfotransférase 3A (3-OST3A) : une enzyme de maturation des glycosaminoglycane en tant que nouveau régulateur tumoral dans le cancer du sein

Les protéoglycane à héparane-sulfate (HSPGs) sont des macromolécule ubiquitaire situées à la surface des cellule et au sein des matrice extracellulaire jouant un rôle clé dans le contrôle des interaction cellule-matrice et du micro-environnement tumoral. Leur biosynthèse est assurée par une machinerie enzymatique complexe impliquant des glycosyltransférases et sulfotransférases, lesquelles ajoutent des motifs sulfatés en différentes position des résidu de la chaîne glucidique. Ces modification confèrent aux HSPGs la capacité d'interagir avec de nombreux ligand comme les facteur de croissance et leurs récepteur permettant de réguler divers processus physiopathologique tels que la prolifération et la survie cellulaire, l'angiogénèse et le développement tumoral. J'ai focalisé mon étude sur une famille de sulfotransférases, les 3-O-sulfotransférases (3-OSTs) responsables d'une modification rare et terminale des chaînes de HS et en particulier sur l'isoforme 3A (3-OST3A) dont le rôle dans le développement tumoral a été précédemment mis en évidence par notre équipe. L'objectif de ce travail de thèse est d'explorer le rôle de la 3-OST3A dans la régulation du développement du cancer du sein. Ces travaux mettent en évidence que le gène *3-OST3A* est régulé épigénétiquement dans un panel de lignées cellulaires cancéreuses mammaires. Les tests cellulaires de prolifération et d'apoptose montrent que la 3-OST3A exerce une action oncogénique ou suppresseur de tumeur dépendante de la signature moléculaire des cellule cancéreuses mammaires. Au niveau clinique, un fort taux d'expression de la 3-OST3A dans les tumeurs est corrélé négativement avec la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein de sous-type HER2+. Ces travaux sont les premiers à mettre en évidence un rôle fonctionnel de la 3-OST3A en tant que régulateur du comportement tumoral des cellule cancéreuses mammaires et permettent de l'envisager comme marqueur pronostique de l'évolution du sous-type de tumeur mammaire HER2. La poursuite de cette étude a pour objectif de comprendre les mécanismes qui expliquent les conséquences délétères de la forte expression de la 3-OST3A sur l'agressivité du cancer du sein HER2+. Mes résultats suggèrent que la 3-OST3A induirait l'activation du récepteur HER2 par une voie dépendante de la formation du complexe ternaire HS 3-O-sulfatés/FGF-7/FGFR2IIIb dans les cellule SKBR3, un modèle de cellule cancéreuses mammaires surexprimant le récepteur HER2 responsable du caractère agressif du cancer du sein HER2+. **Mots-clés** : HSPG, 3-OST3A, régulateur tumoral, marqueur pronostique, cancer du sein

The heparan sulfate sulfotransferase 3-OST3A (HS3ST3A) : an enzyme involved in the maturation of glycosaminoglycans as a novel tumor regulator in breast cancer

Heparan sulfate proteoglycans (HSPG) are ubiquitous macromolecules located at the cell plasma membrane and in extracellular matrices playing a key role in the control of cell-matrix interactions and in the tumor micro-environment. Their biosynthesis is performed by a complex enzymatic machinery involving glycosyltransferases and sulfotransferases, the latter adding a sulfate group at different residue positions of the polysaccharide chain. These modifications provide to the HSPG the ability to interact with many ligands such as growth factors and their receptors, and to regulate multiple pathophysiological processes such as cell proliferation and survival, angiogenesis and tumor development. I focused on a sulfotransferase family, the heparan sulfate 3-O-sulfotransferases (HS3STs) responsible for a rare, terminal modification of HS chains. Specifically, we investigated the HS3ST3A isoform whose role in tumor development has been previously demonstrated by our team. Here I explored the role of HS3ST3A in breast cancer. My studies demonstrate that *HS3ST3A* gene is epigenetically regulated in a panel of breast cancer cell lines. Cell proliferation and apoptosis assays *in cellulo* showed that HS3ST3A exerts an oncogenic or tumor suppressor effect in a cell-dependent context. A clinical study performed in a cohort of breast cancer patients showed that a high expression level of HS3ST3A in tumors is associated with reduced relapse-free survival in HER2+ patients. For the first time, we report a functional role of HS3ST3A as a tumor regulator of breast cancer cells behavior and this study allows considering it as a prognostic marker of the HER2 breast cancer evolution. The last part of my work attempted to understand the mechanisms that explain the deleterious consequences of the high expression level of HS3ST3A on the aggressiveness of HER2+ breast cancer. In this regard, my results suggested that the HS3ST3A may induce HER2 receptor activation following the formation of the ternary complex HS 3-O-sulphated/FGF-7/FGFR2IIIb in SKBR3 (HER2+) cells. **Key words** : HSPG, HS3ST3A, tumor regulator, prognostic marker, breast cancer