



HAL
open science

Implication de glycosyltransférases dans la tumorigenèse colorectale : POFUT1 et ST3GAL2

Marlene Deschuyter

► To cite this version:

Marlene Deschuyter. Implication de glycosyltransférases dans la tumorigenèse colorectale : POFUT1 et ST3GAL2. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2021. Français. NNT : 2021LIMO0065 . tel-03868788

HAL Id: tel-03868788

<https://theses.hal.science/tel-03868788>

Submitted on 24 Nov 2022

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.

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

Laboratoire PEIRENE (EA 7500), Équipe « Glycosylation et Différenciation Cellulaire »

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue par

Marlène Deschuyter

Le 23 novembre 2021

**Implication de glycosyltransférases dans la tumorigenèse
colorectale : POFUT1 et ST3GAL2**

Thèse co-dirigée par le Pr. **Abderrahman MAFTAH** et le Pr. **Jean-Michel PETIT**

JURY

Président du jury

M. François LABROUSSE, PU-PH, Université de Limoges-CHU Dupuytren Limoges

Rapporteurs

Mme. Ikram EL YAZIDI-BELKOURA, Professeur, Université de Lille

M. Laurent MOREL, Professeur, Université Clermont Auvergne

Examineurs

M. Mohamed OUZZINE, Directeur de Recherche INSERM, Université de Lorraine

M. Abderrahman MAFTAH, Professeur, Université de Limoges

M. Jean-Michel PETIT, Professeur, Université de Limoges



Dédicace

A Tatie Mylène

Il n'y a pas de magie à accomplir. Il s'agit vraiment de travail acharné, de choix et de persévérance.

Michelle Obama

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury. Merci à Madame **Ikram El Yazidi-Belkoura**, Professeur à l'Université de Lille et à Monsieur **Laurent Morel**, Professeur à l'Université Clermont Auvergne d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en tant que rapporteurs, merci pour votre temps ainsi que votre investissement. Je remercie également Monsieur **Mohamed Ouzzine**, Directeur de Recherche INSERM à l'Université de Lorraine, d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur, et merci à Monsieur **François Labrousse**, PU-PH à l'Université de Limoges et au CHU Dupuytren de Limoges d'avoir accepté de présider ce jury.

Je remercie mes deux co-directeurs de thèse, Monsieur **Jean-Michel Petit** et Monsieur **Abderrahman Maftah**, Professeurs à l'Université de Limoges. Merci pour votre encadrement, vos conseils, votre aide et votre temps au cours de ces trois années. Certes il y a eu quelques prises de bec, ce qui n'est pas étonnant au vue de nos caractères respectifs, mais nous avons toujours su dépasser cela et faire avancer les différents projets mis en place. M. Petit (JMP pour les intimes), j'aurais été votre dernière doctorante avant la retraite, j'espère vous avoir laissé un bon souvenir !

Je remercie tout particulièrement Monsieur **Sébastien Legardinier**, maître de conférences à l'Université de Limoges. Ces trois années n'auraient pas été les mêmes sans vous, votre aide sur le plan scientifique a été précieuse et essentielle, mais au-delà de nos discussions scientifiques je pense avoir trouvé une oreille sincère pour écouter mes plaintes ! POFUT1 et WIF, alias « Fifou », nous ont donné du fil à retordre mais nous en sommes ressortis plus forts ! Nos nombreuses « crises » de nettoyage nous auront rapprochées, et en auront sans doute agacé plus d'un ! Nous avons instauré ensemble le « placard à bouffe » devenu un incontournable du labo 104, certes nous cherchons toujours nos abdos mais il vaut mieux faire envie que pitié ! Merci de m'avoir appris ces nombreuses expressions d'un autre temps, merci

pour vos crises de folies et merci de m'avoir soutenu tout ce temps !

J'adresse un grand merci à Madame **Nelly Vallat**, adjoint technique au sein de l'équipe. Tu es arrivée lorsque j'ai commencé ma thèse, nos bureaux étant côte à côte nous avons noués des liens. Tu as été d'une grande aide sur le plan technique bien sûr, mais tu es également devenue une amie sincère qui a su m'écouter et me comprendre. Notre trio infernal avec Sébastien a dû en déranger plus d'un ! Merci pour tous ces rires et ces moments de partage !

Merci à Madame **Tiffany Guerrenne-Del-Ben**, aujourd'hui Docteure, nous nous sommes rencontrées en tant que doctorantes lors de ma première année, ce fut court mais intense ! Merci pour ces nombreuses discussions (scientifiques bien sûr mais pas que !), nous avons apporté un peu de verdure dans ce labo, en espérant que tes plantes survivent toujours !

Merci à Monsieur **Florian Pennarubia** et Monsieur **Julien Chabanais**, anciens doctorants, vous étiez là quand j'ai commencé mes stages de Master et vous m'avez beaucoup appris ! Je ne compte plus le nombre de fois où je vous ai posé des questions inutiles ! Merci de m'avoir toujours répondu et merci pour vos nombreux conseils !

Merci à **Layla Haymour**, dernière doctorante arrivée. Ne parlant pas français les débuts furent un peu compliqués, mais finalement nous avons appris l'une de l'autre. Je ne doute pas que tu feras une belle thèse, je te souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie M. **Alain Chaunavel** Ingénieur, Attaché de Recherche Clinique au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges. Merci pour ces nombreux échanges, et ces explications techniques très complètes sur l'histologie du colon !

Merci à M. **David Léger**, vice-doyen de la faculté de Pharmacie de Limoges. Grâce à vous j'ai pu entrevoir le monde des souris ! Malheureusement le confinement s'en est mêlé.... Merci d'être venu pendant ce confinement afin de réaliser les différentes tâches nécessaires au bon déroulement des xénogreffes !

Je remercie tous les membres du **laboratoire PEIRENE** qui ont participé de près ou de

loin au bon déroulement de ma thèse.

Mes derniers remerciements vont à ma famille, et comment ne pas remercier Madame **Lucie Paulus**, doctorante à l'Université de Limoges. Nous nous connaissons depuis la L2, tu es devenue « mon chaton », ma meilleure amie, ma sœur, ma famille... Merci d'avoir été là lors des moments de « crise » (et il y en a eu beaucoup...), mais aussi lors des bons moments ! On se comprend, nous sommes pareil, nous aimons râler et manger, que demander de plus ! Mille fois merci de faire partie de ma vie !

Maman, un simple merci ne suffit pas, je n'ai pas les mots pour exprimer ce que je ressens. Tu m'as toujours poussé vers le haut, tu as toujours cru en moi, tu as toujours été là même si tu vis à l'autre bout du monde. Tu m'as écouté râler, me plaindre, tu as été l'épaule (à distance) sur laquelle j'ai pleuré, j'espère réellement que tu es fière de ton « lapin ».

Luc, « mon Choupinou », merci de m'avoir supporté pendant ces 3 années de thèse, heureusement que tu étais là. Il faut du courage pour supporter quelqu'un en thèse, mais tu es devenu incollable sur POFUT1 ! Ma vie ne serait pas la même sans toi, cette thèse tu y as contribué c'est sûr ! Merci d'avoir patienté le temps que je termine mes études, merci de m'avoir toujours encouragé, merci de m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin et tout simplement merci d'être là.

Martine et Roger, ma seconde famille, heureusement que vous étiez là ! Trois ans c'est long, mais vous ne les avez pas vu passer ! Les weekends aux Granges étaient nécessaires à ma bonne santé mentale ! Simplement merci d'être toujours présents dans les bons comme dans les mauvais moments.

Table des matières

Remerciements	9
Table des matières	15
Table des illustrations	19
Table des tableaux	23
Liste des abréviations	25
Résumé	31
Abstract	33
Publications et Communications	35
Avant-Propos	37
Chapitre I. Le cancer colorectal : Histoire et Compréhension	43
I.1. Le cancer dans l’histoire	43
I.2. Généralités sur le cancer	47
I.3. Le cancer colorectal	49
I.3.1. Épidémiologie et facteurs de risque.....	49
I.3.2. Classification du cancer colorectal	51
I.3.2.1. Anatomie du colon	51
I.3.2.2. Anatomie du rectum.....	55
I.3.2.3. Classification de Dukes.....	57
I.3.2.4. Classification TNM.....	59
I.3.3. Dépistage	61
I.3.3.1. Les différentes techniques de dépistage.....	61
I.3.3.2. Les marqueurs tumoraux associés au cancer colorectal.....	65
I.3.4. Mécanismes associés au cancer colorectal	69
I.3.4.1. Instabilité chromosomique.....	69
I.3.4.2. Instabilité microsatellitaire.....	73
I.3.4.3. Hyperméthylation des îlots CpG.....	75
I.3.4.4. Mutations associées au cancer colorectal.....	79
I.3.4.5. Transformation d’une cellule saine en cellule tumorale	81
Chapitre II. Glycosylations : Modifications clés dans la vie d’une cellule	85
II.1. Différents types de glycosylation	85
II.1.1. La <i>S</i> -glycosylation.....	85
II.1.2. La <i>C</i> -glycosylation	87
II.1.3. La <i>N</i> -glycosylation	89
II.1.4. La <i>O</i> -glycosylation	91
II.2. O-fucosylation médiée par POFUT1	93
II.2.1. Structure de la protéine POFUT1	93

II.2.2. O-fucosylation des motifs EGF-like.....	97
II.2.3. Conséquence sur la voie NOTCH	103
II.3. La sialylation	107
II.3.1. Les différentes familles de sialyltransférases.....	107
II.3.2. Structure des sialyltransférases	109
II.3.3. Les différentes fonctions de la sialylation.....	113
II.4. α2-3 sialylation médiée par ST3GAL2	119
II.4.1. Structure de ST3GAL2.....	119
II.4.2. Gangliosides et α 2-3 sialylation.....	119
II.4.3. Activité de ST3GAL2	123
Chapitre III. Implication des altérations de glycosylation dans le contexte tumoral	127
III.1. POFUT1 et cancer colorectal.....	127
III.2. Sialylation et cancer	129
III.2.1. Sialyltransférases et cancers.....	129
III.2.2. ST3GAL2 et cancers.....	135
III.3. Modèles cellulaires du cancer colorectal.....	139
Chapitre IV. Objectifs de thèse.....	143
Chapitre V. Résultats	147
V.1. Article 1.....	147
V.2. Article 2.....	181
Chapitre VI. Résultats complémentaires	235
VI.1. Le KD de <i>ST3GAL2</i> affecte la sialylation des glycoprotéines membranaires dans la lignée colorectale HT29	235
VI.2. La surexpression de <i>POFUT1</i> et <i>ST3GAL2</i> dans 3 cancers digestifs serait liée à des mécanismes différents.....	237
VI.3. Acteur commun dans la régulation des expressions de <i>POFUT1</i> et <i>ST3GAL2</i> .	241
VI.4. Matériels et Méthodes.....	243
VI.4.1. Extraction protéique.....	243
VI.4.2. Lectine-Blot	245
VI.4.3. Western Blot	247
VI.4.4. Analyse des données TCGA (The Cancer Genome Atlas).....	249
VI.4.5. Analyses statistiques	249
Chapitre VII. Discussion générale et perspectives	251
Références bibliographiques	277

Table des illustrations

Figure 1 : Premier cas de cancer chez un hominidé datant de 1,7 millions d'années	42
Figure 2 : Les principaux cancers diagnostiqués par pays en 2020.....	46
Figure 3 : Les principaux cancers en chiffres, en 2020	48
Figure 4 : Épidémiologie du cancer colorectal en France de 1955 à 2015.....	50
Figure 5 : Anatomie de l'appareil digestif humain.....	52
Figure 6 : Composition tissulaire de la paroi intestinale	54
Figure 7 : Développement d'une tumeur colorectale	58
Figure 8 : Les différents moyens de dépistage du cancer colorectal.....	60
Figure 9 : Représentation schématique des instabilités chromosomiques couramment observées dans les tumeurs	68
Figure 10 : Distribution des microsatellites dans le génome humain	72
Figure 11 : Processus de transformation d'une cellule saine en cellule tumorale.....	80
Figure 12 : La <i>N</i> -glycosylation	88
Figure 13 : Les différents types de <i>N</i> -glycanes	88
Figure 14 : Synthèse des différents cores <i>O</i> -glycaniques, à partir de l'antigène Tn	90
Figure 15 : Les différents types de glycosylations	92
Figure 16 : Structure de l'enzyme POFUT1 humaine	94
Figure 17 : Motif EGF-like	96
Figure 18 : Représentation schématique des différents domaines du récepteur Notch.....	102
Figure 19 : Schématisation de la voie d'activation de Notch.....	102
Figure 20 : Structure chimique des principaux types d'acide sialique.....	108
Figure 21 : Structure linéaire d'une sialyltransférase	110
Figure 22 : Structure 3D des sialyltransférases.....	110
Figure 23 : Organisation du gène codant <i>ST3GAL2</i>	118
Figure 24 : Voie de synthèse des glycosphingolipides	120
Figure 25 : Voie de synthèse détaillée des gangliosides.....	120
Figure 26 : Voie de synthèse des GSLs de la série globo.....	122
Figure 27 : Substrats de <i>ST3GAL2</i>	122
Figure 28 : Le knock-down de <i>POFUT1</i> corrèle avec la diminution de la localisation nucléaire du NICD.....	126
Figure 29 : Analyse de données RNAseq de 613 patients atteints de tumeurs colorectales	126
Figure 30 : Synthèse des différents TACAs à partir de l'antigène Tn	130
Figure 31 : Synthèse des antigènes de la famille sialyl-Lewis.....	130

Figure 32 : Rôles des différentes sialyltransférases dans les processus liés aux cancers	134
Figure 33 : Lectine-blots sur des protéines issues des cellules HT29-shctrl et HT29-shST3GAL2	234
Figure 34 : Expressions de <i>POFUT1</i> et <i>ST3GAL2</i> dans 3 cancers digestifs	238
Figure 35 : Analyses de corrélation entre les expressions de <i>POFUT1</i> et <i>ST3GAL2</i>	238
Figure 36 : Estimation du nombre de copies de <i>POFUT1</i> et <i>ST3GAL2</i> dans les 3 types de cancers	240
Figure 37 : Analyses de corrélation entre les expressions de <i>POFUT1/ST3GAL2</i> et le nombre de copies.....	240
Figure 38 : Expressions géniques des 9 acteurs pouvant favoriser les expressions de <i>POFUT1</i> et <i>ST3GAL2</i>	242
Figure 39 : Figure de synthèse.....	274

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification TNM du cancer colorectal.....	58
Tableau 2 : Correspondance entre les différentes classifications du cancer colorectal.....	60
Tableau 3 : Chromosomes les plus souvent touchés par les LOH dans le cancer colorectal.....	70
Tableau 4 : Liste des gènes méthylés et inactivés couramment utilisés comme marqueurs des tumeurs colorectales.....	76
Tableau 5 : Liste des protéines cibles de POFUT1.....	98
Tableau 6 : Liste des 20 gènes de sialyltransférases humaines.....	106
Tableau 7 : Expression de <i>ST6GAL1</i> dans différents cancers.....	132
Tableau 8 : Liste des principales lignées cellulaires colorectales couramment utilisées, avec leur origine tissulaire et le stade du cancer correspondant (lorsque que celui-ci est connu)......	138
Tableau 9 : Rôles des 9 protéines pouvant se lier à <i>ST3GAL2</i> et <i>POFUT1</i> :.....	242
Tableau 10 : Données RNA-Seq Firebrowse pour les 3 cancers digestifs étudiés.....	249

Liste des abréviations

ACE : Antigène Carcino Embryonnaire	Fuc : Fucose
AChR : AcetylCholine Receptor	FUT : Fucosyltransférase
ADN : Acide Désoxyribonucléique	Gal : Galactose
AJCC : American Joint Committee on Cancer	GalNAc : <i>N</i> -acétylgalactosamine
APC : Adenomatous Polyposis Coli	G-CSFR : Granulocyte Colony Stimulating Factor Receptor
Asn : Asparagine	G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor
BRAF : B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase	GDP : Guanosine Diphosphate
CAZy : Carbohydrate-Active enZYmes	gFOBT : gaiac Fecal Occult Blood Test
CCR : Cancer Colorectal	Glc : Glucose
CEAs : Cancer Events Associated	GlcNAc : <i>N</i> -acétylglucosamine
Ce : Caenorhabditis elegans	Gly : Glycine
CHO : Chinese Hamster Ovary	GSK-3β : Glycogen Synthase Kinase 3 β
CIMP : CpG Island Methylator Phenotype	GTP : Guanosine Triphosphate
CIN : Chromosomal Instability	HNPCC : Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
CK1α/ϵ : Casein Kinase 1 α/ϵ	HRA : High Risk Adenoma
CMP : Cytidine Mono-Phosphate	ICAM : InterCellular Molecule Adhesion
CSC : Cellule Souche Cancéreuse	ICD : Intracellular Domain
Cys : Cysteine	JAG : Jagged
DDD : Dewling-Degos Disease	KD : Knock-down
DII : Delta-like	Kdn : 2-keto-3-deoxy-D-glycero-D-galactono-nononic acid
DNMT : DNA MethylTransferase	KO : Knock-out
Dol-P-Man	KRAS : Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog 2
EGF-LD : Epidermal Growth Factor Like Domain	LNR : Lin-12 Notch Repeats
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor	LOH : Loss of Heterozygotie
EIF6 : Eukaryotic translocation Initiation Factor 6	LRA : Low Risk Adenoma
EOGT : EGF specific <i>O</i> -GlcNAc transferase	MAA : Maackia Amurensis
EpCAM : Epithelial Cell Adhesion Molecule	Man : Mannose
ESCA : Esophageal Carcinoma	MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
FADD : Fas Associated Death Domain	
FIT : Fecal Immunochemical Test	

MLH1 : MultL Homolog 1
MMP : Matrix Metallopreinase
MMR : MisMatch Repair
MSI : Microsatellite Instability
MSI-H : MSI-High
MSI-L : MSI-Low
MSS : Microsatellite Stable
NCAM : Neural Cell Adhesion Molecule
Neu5Ac : Acide *N*-acétylneuraminique
Neu5Gc : Acide *N*-glycolylneuraminique
NFATC1 : Nuclear Factor Activated T cells 1
NFκB : Nuclear Factor kappa B
NICD : Notch Intracellular Domain
NLS : Nuclear Localization Signal
NRR : Negative Regulatory Region
NSE : Neuron Specific Enolase
OGA : *O*-GlcNAcase
OGT : *O*-GlcNAc transférse
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction
PI3K : Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PNA : Peanut Agglutinin
POFUT1 : Protéine *O*-fucosyltransférse de type 1
POFUT2 : Protéine *O*-fucosyltransférse de type 2
POGLUT : Protéine *O*-glucosyltransférse
Pro : Proline
PTM : Post-Translational Modification
SAC : Spindel Assembly Checkpoint
Ser : Serine
SFRP2 : Secreted Frizzled Related Protein 2
SL : Sialyl Lewis

SLa : Sialyl Lewis a
SLe : Sialyl Lewis e
SLx : Sialyl Lewis x
SMC1A : Structural Maintenance of Chromosome 1A
SNV : Single-Nucleotide Variation
STn : Sialyl Thomsen-nouvelle
SSEA-3 : Stage Specific Embryonic Antigen 3
SSEA-4 : Stage Specific Embryonic Antigen 4
SSPs : Polypes Festonnés Sessiles
STAD : Stomach Adenocarcinoma
RAM : Regulation of Amino-acid Metabolism
RPRD1B : Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B
RE : Réticulum Endoplasmique
RNase : Ribonucléase
RSEM : RNA-Seq Expectation-Maximization
RSS : Recto-sigmoïdoscopie
RSOF : Recherche de Sang Occult Fécal
TACA : Tumor Associated Carbohydrate Antigen
TAD : Transcriptional Activation Domain
TADs : Topologically Associating Domains
TBS : Tris Buffered Saline
TCGA : The Cancer Genome Atlas
TF : Transcription Factor
Thr : Threonine
TIMP : Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase
Tn : Thomsen-nouvelle
TNM : Tumor Node Metastasis
TP53 : Tumor Protein 53
Trp : Tryptophane
TSR : Thrombospondin Repeat
UDP : Uridine Di-Phosphate

UMP : Uridine Mono-Phosphate

Val : Valine

VS : Very Small

WIF1 : Wnt Inhibitory Factor

Xyl : Xylose

Résumé

Le cancer colorectal est un problème de santé mondial, caractérisé par de nombreuses modifications géniques, notamment des changements d'expressions de glycosyltransférases. La protéine *O*-fucosyltransférase 1 (POFUT1) est surexprimée dans plusieurs types de tumeurs, les tumeurs gastriques, hépatiques, mammaires ou encore colorectales. Cette enzyme catalyse le transfert d'un *O*-fucose sur une sérine ou une thréonine de motifs EGF-like, selon une séquence consensus de *O*-fucosylation C²-X₁₋₄-S/T-C³. Les protéines cibles de POFUT1 ont été identifiées sur la présence de cette séquence consensus, la plus étudiée étant le récepteur membranaire NOTCH. Dans les tumeurs colorectales, la surexpression est due à une amplification de la région chromosomique 20q11.21 dans laquelle se situe le gène *POFUT1*. Dans de rares cas où *POFUT1* n'est ni surexprimé ni amplifié, on retrouve 7 mutations dans la séquence codante de *POFUT1* sans que les conséquences fonctionnelles de ces dernières ne soient connues. Ce travail révèle que 6 des 7 variants protéiques de POFUT1 produits de façon recombinante ont des activités de *O*-fucosylation *in vitro* significativement supérieures à la forme sauvage de l'enzyme, en particulier sur le motif EGF 26 du récepteur NOTCH. Ces résultats laissent supposer que des patients possédant ces mutations de POFUT1 ont une activité de *O*-fucosylation supérieure qui favoriserait la tumorigenèse via entre autres la voie de signalisation NOTCH.

Après une étude approfondie de l'expression des sialyltransférases dans les bases de données RNA-Seq, *ST3GAL2* s'est avéré être le seul gène codant une sialyltransférase significativement surexprimé dans les tumeurs colorectales. Ce travail de recherche montre qu'un KD de *ST3GAL2* dans une lignée cancéreuse colorectale aboutit à une diminution significative des capacités de prolifération, migration et d'invasion des cellules, à un changement de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire et à une augmentation de la mort cellulaire par apoptose *in vitro*. Des xénogreffes de ces mêmes cellules chez des souris montrent que le KD de *ST3GAL2* ralentit l'évolution tumorale. Nous montrons que le KD de *ST3GAL2* altère l' α 2-3 sialylation de glycoprotéines membranaires ainsi que de glycolipides. *ST3GAL2* pourrait être considéré comme un nouvel oncogène impliqué, avec *POFUT1*, dans la tumorigenèse colorectale. Tous deux partageraient un régulateur commun, *SMC1A*, capable de se fixer sur les séquences des deux gènes et également surexprimé dans les tumeurs colorectales.

Abstract

Colorectal cancer is a global health problem characterized by numerous gene alterations, including changes in the expression of glycosyltransferases. The protein *O*-fucosyltransferase 1 (POFUT1) is overexpressed in several tumor types, including gastric, liver, breast and colorectal tumors. This enzyme catalyzes the transfer of an *O*-fucose onto a serine or threonine of EGF-like motifs, according to a consensus *O*-fucosylation sequence C²-X₁₋₄-S/T-C³. POFUT1 target proteins have been identified on the presence of this consensus sequence, the most studied being the membrane receptor NOTCH. In colorectal tumors, overexpression is due to an amplification of the 20q11.21 chromosomal region in which the *POFUT1* gene is located. In rare cases where *POFUT1* is neither overexpressed nor amplified, 7 mutations are found in the coding sequence of *POFUT1* without knowing the consequences. This work reveals that 6 of the 7 recombinantly produced POFUT1 protein variants have significantly higher *in vitro* *O*-fucosylation activities *in vitro* than the wild-type form of the enzyme, more particularly on the EGF motif 26 of the NOTCH receptor. These results suggest that patients with these POFUT1 mutations have a higher *O*-fucosylation activity that would promote tumorigenesis *via* NOTCH signaling pathway, among others.

After an extensive study of sialyltransferase expression in RNA-Seq databases, *ST3GAL2* was found to be the only gene encoding a sialyltransferase significantly overexpressed in colorectal tumors. Our works shows that a KD of *ST3GAL2* in a colorectal cancer line results in a significant decrease in cell proliferation, migration and invasion capacities, a change in cell cycle distribution and an increase in cell death by apoptosis *in vitro*. Xenografts of these same cells in mice show that the KD of *ST3GAL2* slows tumor progression. We show that the KD of *ST3GAL2*, alters the α 2-3 sialylation of glycolipids as well as membrane glycoproteins. *ST3GAL2* could be considered a novel oncogene involved, along with *POFUT1*, in colorectal tumorigenesis. Both would share a common regulator, *SMCIA*, also overexpressed in colorectal tumors, able of binding to both gene sequences to promote their expression.

Publications et Communications

Publications :

- **Functional Characterization of POFUT1 Variants Associated with Colorectal Cancer.**

Marlène Deschuyter, Florian Pennarubia, Émilie Pinault, Sébastien Legardinier, Abderrahman Maftah. *Cancers* 2020, 12(6), 1430; (<https://doi.org/10.3390/cancers12061430>) (Impact Factor en 2020 : 6.162).

- ***ST3GAL2* knock-down decreases tumoral character of colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo*.**

Marlène Deschuyter, David Léger, Anne Verboom, Alain Chaunavel, Abderrahman Maftah, Jean-Michel Petit. *American Journal of Cancer Research*. 23 Juillet 2021 (Impact Factor en 2020 : 6.166)

Communications :

- **Sialylation et *O*-fucosylation de glycoprotéines de surface associées à des tumeurs colorectales.**

Marlène Deschuyter, Abderrahman Maftah, Jean-Michel Petit. Séminaire thématique École doctorale SBS 615, 6-8 mars 2019.

- **Caractérisation des mutations de POFUT1 retrouvées dans des tumeurs colorectales.**

Marlène Deschuyter, Florian Pennarubia, Émilie Pinault, Sébastien Legardinier, Abderrahman Maftah. 2^{ème} Journée Recherche en Cancérologie, Limoges, France, 14 Novembre 2019 (Poster).

- ***ST3GAL2* knock-down decreases tumoral character of colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo*.**

Marlène Deschuyter, David Léger, Alain Chaunavel, Jean-Michel Petit, Abderrahman Maftah. 16^{ème} Cancéropôle GSO Virtual Meeting, 24-27 Novembre 2020 (ePoster).

- **Expressions of *POFUT1* and *ST3GAL2* are positively correlated in digestive tumors.**

Marlène Deschuyter, Abderrahman Maftah, Jean-Michel Petit. EACR 2021 Virtual Congress 9-12 Juin 2021 (ePoster).

Avant-Propos

Les glycosylations des protéines sont les modifications post-traductionnelles les plus répandues au sein des cellules eucaryotes. Ces glycosylations correspondent à l'ajout d'un ou plusieurs monosaccharides sur une structure peptidique. Elles concernent également les lipides. Les glycosylations sont catalysées par des enzymes, des glycosyltransférases, spécifiques du sucre et de la liaison qu'elles engagent. On peut classer les glycosylations peptidiques en 4 grands types selon la nature du sucre greffé et l'acide aminé receveur : la *S*-glycosylation (sucre greffé sur une cystéine), la *C*-glycosylation (sucre greffé sur un tryptophane), la *N*-glycosylation (sucre greffé sur une asparagine) et la *O*-glycosylation (sucre greffé sur une sérine ou une thréonine). Les glycosylations sont impliquées dans de nombreux processus biologiques comme le repliement protéique, la stabilité, l'adressage, l'interaction entre protéines ou encore l'activité biologique de la protéine (Very, Lefebvre, and El Yazidi-Belkoura 2017). Des glycosylations anormales seraient impliquées dans des processus pathologiques notamment les cancers. L'augmentation de certains glycolipides ou glycoprotéines ou encore le changement de structures glycaniques peuvent conduire à des changements du comportement cellulaire et conduire à l'apparition et/ou au maintien de cellules tumorales ainsi qu'à leur évolution (Varki et al. 2015).

L'équipe de recherche « Glycosylation et Différenciation Cellulaire » au sein de laquelle j'ai réalisé mes travaux de thèse, est une équipe pluridisciplinaire appartenant au laboratoire PEIRENE (EA 7500) de l'Université de Limoges. L'équipe étudie depuis plusieurs années les fonctions biologiques de glycosyltransférases, notamment les sialyltransférases et les fucosyltransférases. Plus récemment, elle a axé ses travaux sur l'étude de ces enzymes dans le contexte du cancer colorectal.

La protéine *O*-fucosyltransférase 1 (POFUT1), a été longuement étudiée au sein de l'équipe, d'abord pour des caractéristiques fonctionnelles (Loriol et al. 2006)(Loriol et al. 2007)

puis pour son rôle dans la différenciation myogénique chez la souris (Der Vartanian et al. 2015)(Al Jaam et al. 2016), et enfin dans un contexte pathologique avec le choix du cancer colorectal comme modèle, 3^{ème} cancer le plus diagnostiqué au niveau mondial.

POFUT1 est responsable de la *O*-fucosylation de domaines EGF-like possédant une séquence consensus connue C²-X₁₋₄-S/T-C³ (où C² et C³ sont respectivement les deuxième et troisième cystéines). La liste des protéines cibles potentielles de POFUT1 est courte (moins d'une centaine) (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017), la cible la plus connue et la plus étudiée étant le récepteur NOTCH.

Un précédent travail de thèse porté par M. Julien Chabanais (thèse soutenue en 2019) a montré que *POFUT1* était surexprimé dans la majorité des cas de cancers colorectaux, et que cette surexpression était due en grande majorité à une augmentation du nombre de copies de ce gène. Cependant, dans de rares cas de cancer, des mutations dans la séquence codante de *POFUT1* ont été identifiées sans que les conséquences de ces mutations ne soient déterminées. Une partie de mes travaux de thèse a porté sur l'étude de ces mutations. Un précédent travail de thèse porté par M. Florian Pennarubia (thèse soutenue en 2018), a permis l'étude de la *O*-fucosylation par chimie-click. Grâce à ses travaux, j'ai pu étudier l'incidence de ces mutations sur les capacités de *O*-fucosylation des variants correspondants. En effet, j'ai produit les protéines recombinantes correspondantes aux mutations identifiées et j'en ai évalué les conséquences sur l'activité enzymatique en utilisant des motifs EGF-like de NOTCH recombinants comme substrat et une technique de chimie-click *in vitro* (Pennarubia et al. 2018).

L'étude des sialyltransférases au sein de cette équipe est une histoire de longue date. De nombreux travaux ont porté sur l'étude de différentes sialyltransférases au fil des années (Mercier et al. 1999)(Laporte et al. 2009)(Petit et al. 2015)(Petit et al. 2018). Un des derniers travaux de thèse a porté sur l'étude de la sialylation par ST6GAL1 dans le contexte myogénique murin (Vergé et al. 2020). A l'occasion de ma thèse, l'équipe a abordé la sialylation dans le

contexte du cancer colorectal. Ce deuxième aspect de mes travaux de thèse portait sur l'étude d'une sialyltransférase, ST3GAL2. Après une étude bioinformatique, nous avons constaté que *ST3GAL2* est surexprimé dans les tumeurs colorectales. En partenariat avec le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges j'ai pu confirmer ces résultats en travaillant sur des échantillons de patients atteints de tumeurs colorectales. Peu de travaux portent sur l'étude de cette sialyltransférase dans le contexte tumoral, et aucun dans le cas du cancer colorectal. Je me suis donc attachée à déréguler l'expression de ce gène dans une lignée cellulaire colorectale et à étudier les conséquences sur le comportement des cellules *in vitro* puis après xénogreffe chez la souris.



Figure 1 : Premier cas de cancer chez un hominidé datant de 1,7 millions d'années

Photo du 5^{ème} métatarse d'hominidé, présentant une masse osseuse hémisphérique en proximo-ventrale.

P : Proximal, D : Distal, V : Ventral. D'après Odes et al. 2016.

Chapitre I. Le cancer colorectal : Histoire et Compréhension

I.1. Le cancer dans l'histoire

Le cancer n'est pas une maladie de l'Homme moderne contrairement à ce que l'on pourrait penser. La plus ancienne preuve de néoplasie maligne avérée chez les hominidés remonte à 1,7 millions d'années. Il s'agit d'un ostéosarcome retrouvé sur le 5^{ème} métatarse gauche (Figure 1)(Odes et al. 2016). La plus ancienne description de cancer a été retrouvée dans le Papyrus d'Edwin Smith, écrit en 3000 avant JC, elle concernait un cancer du sein (Cunha 1949). Le papyrus d'Ebers datant de 1500 avant JC décrit quant à lui des cas de cancers de la peau, de l'utérus, de l'estomac ou encore du rectum (Major 1930). Les égyptiens soignaient ces maladies avec principalement des ablations au couteau, des sels ou encore des onguents à base d'arsenic. Des populations plus à l'est comme les Chinois, les Indous ou les Sumériens étaient favorables à l'utilisation d'onguents à base de plantes, mais n'hésitaient pas à appliquer des cataplasmes de cuivre, fer, sulfure ou mercure dans les cas les plus avancés (Karpozilos and Pavlidis 2004). La civilisation grecque a façonné la médecine moderne. C'est Hippocrate qui donna en premier son nom au cancer au V^{ème} siècle avant JC. La vision d'une tumeur mammaire qui s'étendait à la peau lui rappela l'apparence d'un crabe, « cancer » en latin (Hippocrates and Littré 1839)(Zheng, Nan, and Zheng 2010). Les romains, en particulier Aulus Cornelius Celsus, furent les premiers à décrire la chirurgie curative complète et précoce en traitement des cancers (Aulus Cornelius Celsus (1478) 2016). La théorie dite des humeurs faisait loi jadis, une perturbation de la bile était la cause de nombreuses maladies dont le cancer, selon le grec Claudius Galen pratiquant la médecine à Rome (Jacques 1998)(Hajdu 2004). Il était convaincu que la cause d'un cancer était un excès de bile noire, et pouvait donc se soigner grâce à des saignées. Les écrits de Galen furent traduits en latin et traversèrent les continents. Pendant des siècles ses théories ont satisfait les religions (christianisme, islam) mais ont empêché une meilleure compréhension du mécanisme tumoral. Le premier à pratiquer une ablation complète

du sein en guise de traitement contre le cancer du sein fut Aetius, un médecin de l'Empire Byzantin à Constantinople au VI^{ème} siècle (Aetius, Ricci, and Cornarius 1950). Au fil des années de nombreux médecins/physiciens décrivent des cas de cancers et tentèrent de les traiter par ablation et/ou différents cataplasmes. Mais en 1215, l'Église abolit les opérations chirurgicales. Malgré cette interdiction, certains continuèrent clandestinement l'étude de cancers, comme Theodoric, évêque et physicien pratiquant à Salerne, qui arrive à la conclusion qu'un examen physique approfondi est nécessaire avant l'acte chirurgical lui-même (Hajdu 2011). De nombreux scientifiques travaillèrent sur des cas de cancers, chacun à son tour décrivant un peu plus en détails les différents types de tumeurs. John Arderne, un Londonien du XIV^{ème} siècle, fut le premier proctologue. Il décrit dans ses textes que lésions bénignes anorectales et cancer du rectum ont des symptômes identiques, mais que les cancers à proprement dit peuvent être diagnostiqués grâce à un « simple » touché rectal du fait de leurs irrégularités et indurations (Arderne 1999). Un des pionniers de la chirurgie colorectale est Sir William Arbuthnot-Lane, pratiquant à Londres au début du XX^{ème} siècle. Longtemps critiqué et moqué pour avoir pratiqué des résections totales du colon en cas de constipation chronique, cette technique devint par la suite courante en cas d'affections, bénignes ou malignes, du colon (Lane 1908). Un autre pionnier dans son domaine est Monsieur Alfred Donné, scientifique du XIX^{ème} siècle, qui décrivit pour la première fois, en 1839, un cas de leucémie (ce nom ne sera donné que bien des années plus tard) en examinant un échantillon de sang d'une femme décédée (Donné and Foucault 1845)(Vidal 1856)(Kampen 2012).

Les cancers n'épargnent personne, des personnages historiques célèbres sont décédés des suites d'un cancer. C'est le cas de Napoléon par exemple, son autopsie en 1821 révéla des lésions gastriques tumorales, on s'accorde à dire aujourd'hui qu'il est décédé d'un cancer gastrique. Presque un siècle plus tard, en 1926, Claude Monet décéda d'un cancer du poumon. De nos jours, les cas de cancers sont très importants mais les connaissances dans ce domaine

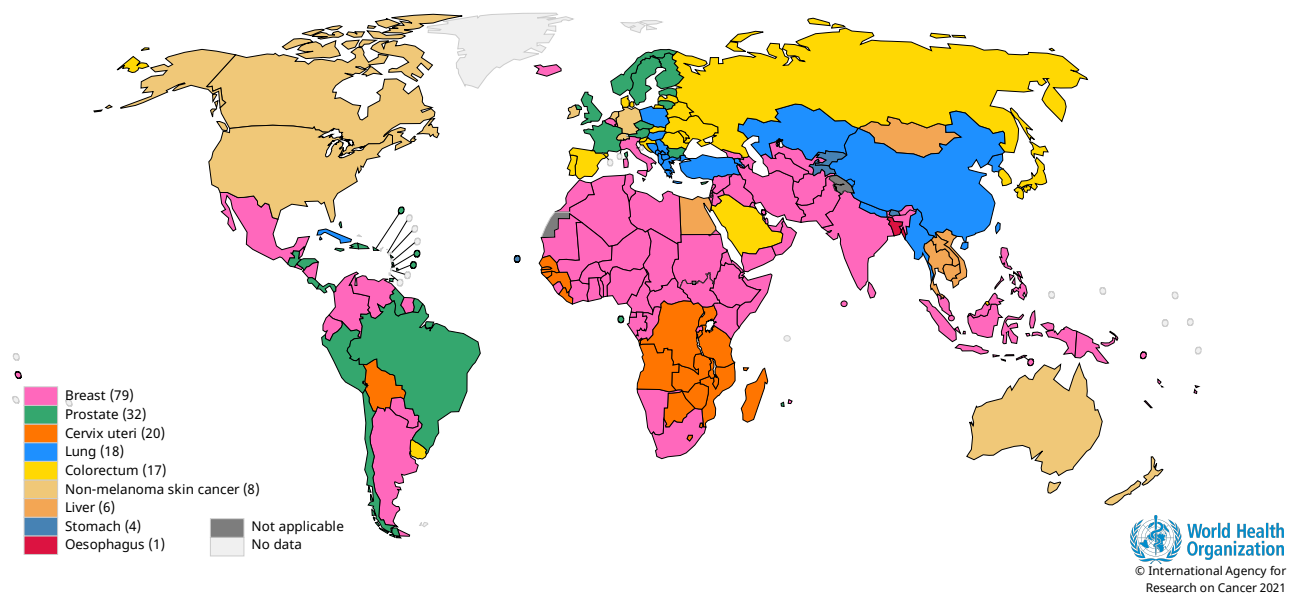


Figure 2 : Les principaux cancers diagnostiqués par pays en 2020

Répartition des différents types de cancers les plus diagnostiqués à travers le monde en 2020, tous sexes et tous âges confondus. D’après l’Organisation Mondiale de la Santé.

ne font que progresser, permettant une meilleure compréhension de cette pathologie.

I.2. Généralités sur le cancer

Le terme cancer est un terme général appliqué à un grand groupe de maladies qui peuvent toucher n'importe quelle partie de l'organisme. L'une de ses caractéristiques est la prolifération rapide et anarchique de cellules anormales qui peuvent essaimer d'autres organes, formant ce qu'on appelle des métastases. Chaque organe ou tissu peut potentiellement développer une tumeur. Il existe deux grands types de cancers : les cancers liquides et les cancers solides.

Les cancers liquides (ou sanguins) peuvent se séparer en deux groupes : les leucémies et les lymphomes. Les leucémies sont des cancers du sang et de la moelle osseuse tandis que les lymphomes sont des cancers du système lymphatique, que l'on peut eux-mêmes diviser en lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens.

Les cancers solides, qui peuvent toucher n'importe quel type de tissus, peuvent être séparés en carcinome et en sarcome. Les carcinomes sont dérivés de cellules épithéliales et peuvent donc toucher des tissus comme le sein, les poumons, l'intestin. Tandis que les sarcomes sont dérivés de tissus conjonctifs que l'on peut assimiler à un tissu de soutien, et peuvent toucher les cartilages ou les os par exemple.

En 2020, 19 292 789 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués à travers le monde, et 9 958 133 personnes sont décédées d'un cancer cette même année (Organisation Mondiale de la Santé). Mais les différents types de cancers ne se répartissent pas de manière équivalente dans la population mondiale (Figure 2). Le cancer du sein est le plus répandu, numéro un des cancers dans 79 pays en 2020. En seconde place on trouve le cancer de la prostate, le plus fréquent dans 32 pays dont la France. Chaque pays est touché différemment par le cancer. Les

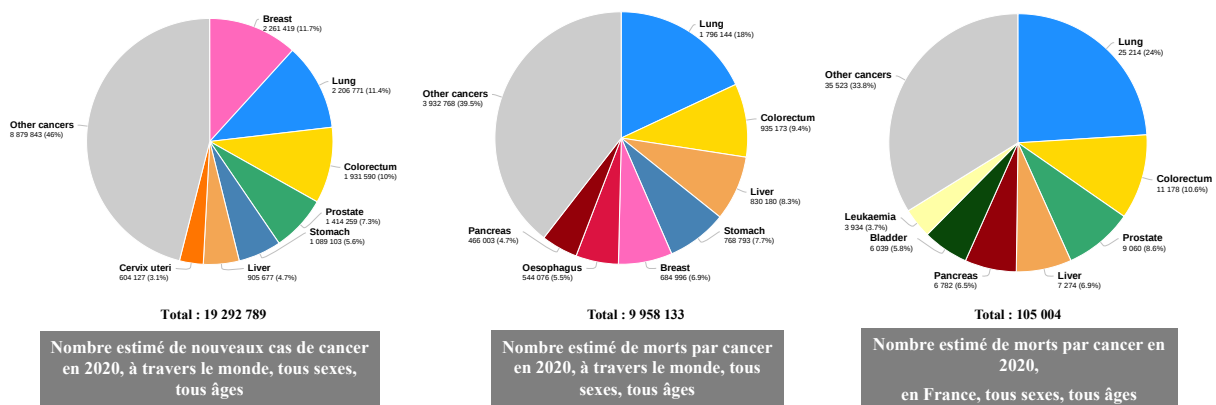


Figure 3 : Les principaux cancers en chiffres, en 2020

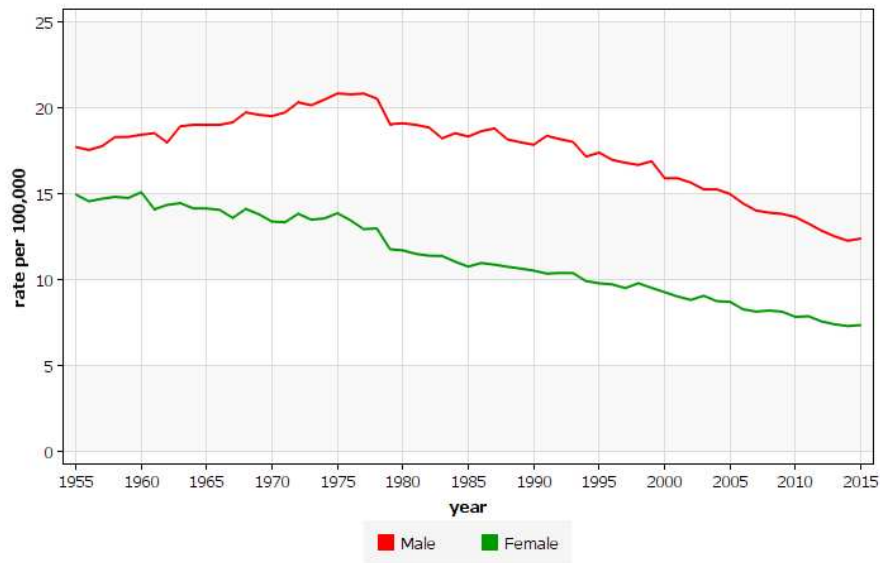
(A) Estimation du nombre de nouveaux cas de cancers diagnostiqués à travers le monde en 2020. La mortalité associée à ces cancers dans le monde représente près de 10 millions de personnes (B). En France, la mortalité associée aux cancers concerne principalement les cancers du poumon et colorectal et représente plus de 105 000 personnes (C). D’après l’Organisation Mondiale de la Santé.

populations diffèrent par leur mode de vie, leur alimentation ou encore les moyens mis en œuvre pour la prévention. Un cancer souvent diagnostiqué mais encore mal compris, est le cancer colorectal (CCR). Il arrive en première position en Russie, dans les pays de l'Est, en Arabie Saoudite, en Espagne et au Portugal. Le terme cancer colorectal regroupe les cas de cancers du côlon, du rectum et de l'anus.

I.3. Le cancer colorectal

I.3.1. Épidémiologie et facteurs de risque

Le cancer colorectal est un problème de santé mondial. En 2020, l'Organisation Mondiale de la Santé le classe à la 3^{ème} place des cancers les plus souvent diagnostiqués dans le monde tous sexes confondus avec 1 931 590 nouveaux cas, soit 10% des cancers diagnostiqués, derrière le cancer du sein (11,7% des cas) et le cancer du poumon (11,4% des cas). Chez les hommes, ce cancer est le 3^{ème} plus incident derrière le cancer du poumon et de la prostate ; et chez la femme c'est le second derrière le cancer du sein. En termes de mortalité, le cancer colorectal est le 2^{ème} cancer le plus mortel en 2020 à travers le monde tous sexes confondus avec 935 173 décès (représentant 9,4% des décès par cancer en 2020), derrière le cancer du poumon (18% des décès). Chez les femmes et chez les hommes le cancer colorectal se place en 3^{ème} position des cancers les plus meurtriers avec respectivement 9,5% et 9,3% des décès en 2020. En France, cet ordre est légèrement différent, c'est le 4^{ème} plus incident avec 10,3% de nouveaux cas de cancers diagnostiqués en 2020. Cependant, il est le second plus meurtrier avec 11,3% des décès en 2020 derrière le cancer du poumon (Figure 3). Si l'on regarde le taux de mortalité due au CCR en France depuis 1955, on constate qu'il était assez élevé dans les années 1970 (environ 14 pour 100 000 chez les femmes et 20 pour 100 000 chez les hommes), mais depuis les années 1980 ce taux tend à diminuer aussi bien chez les hommes



International Agency for Research on Cancer (IARC) - 8.3.2021

Figure 4 : Épidémiologie du cancer colorectal en France de 1955 à 2015

Nombre de décès par cancer du côlon en France, entre 1955 et 2015, chez les hommes (courbe rouge) et chez les femmes (courbe verte), tous âges confondus. D'après International Agency of Research on Cancer.

que chez les femmes (Figure 4). Cette baisse de mortalité peut s'expliquer par l'amélioration récente des méthodes permettant son dépistage précoce et donc une meilleure prise en charge des patients. Les chimiothérapies contre les cancers se sont également nettement améliorées dans les années 70-80. En effet, en 1970 on commence à utiliser des alcaloïdes contre certaines leucémies, et en 1980 des essais cliniques sont publiés avec le développement de nouvelles molécules encore utilisées aujourd'hui (épirubicine, carboplatine, vinorelbine, oxaliplatine, paclitaxel, docétaxel, topotécan et irinotécan). Tous ces phénomènes permettent d'expliquer la diminution de la mortalité par cancer colorectal (entre autres) depuis les années 80. Le taux de survie actuel à la suite d'un cancer colorectal est de l'ordre de 90%, s'il est diagnostiqué et pris en charge à un stade précoce.

La probabilité de contracter un cancer colorectal est de l'ordre de 4 à 5% à travers le monde (Mármol et al. 2017), cependant il existe différents facteurs de risque pouvant accroître ce taux. Il y a tout d'abord les facteurs sur lesquels on ne peut influencer, le principal facteur étant, malheureusement, l'âge. Au-delà de 50 ans, les chances de développer un cancer colorectal augmentent significativement (Levin et al. 2008). Les Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin (MICI), qui regroupent la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, augmentent le risque de développer un cancer colorectal de 2,5% et 3,7% respectivement (Canavan, Abrams, and Mayberry 2006)(Eaden, Abrams, and Mayberry 2001).

Puis il y a les facteurs de risque liés au mode de vie, sur lesquels l'Homme a une influence. Un mode de vie sédentaire a tendance à favoriser le développement de tumeurs colorectales, ainsi que l'obésité ou encore le tabagisme qui augmente de 10,8% le risque de polypes (Botteri et al. 2008).

I.3.2. Classification du cancer colorectal

I.3.2.1. Anatomie du colon

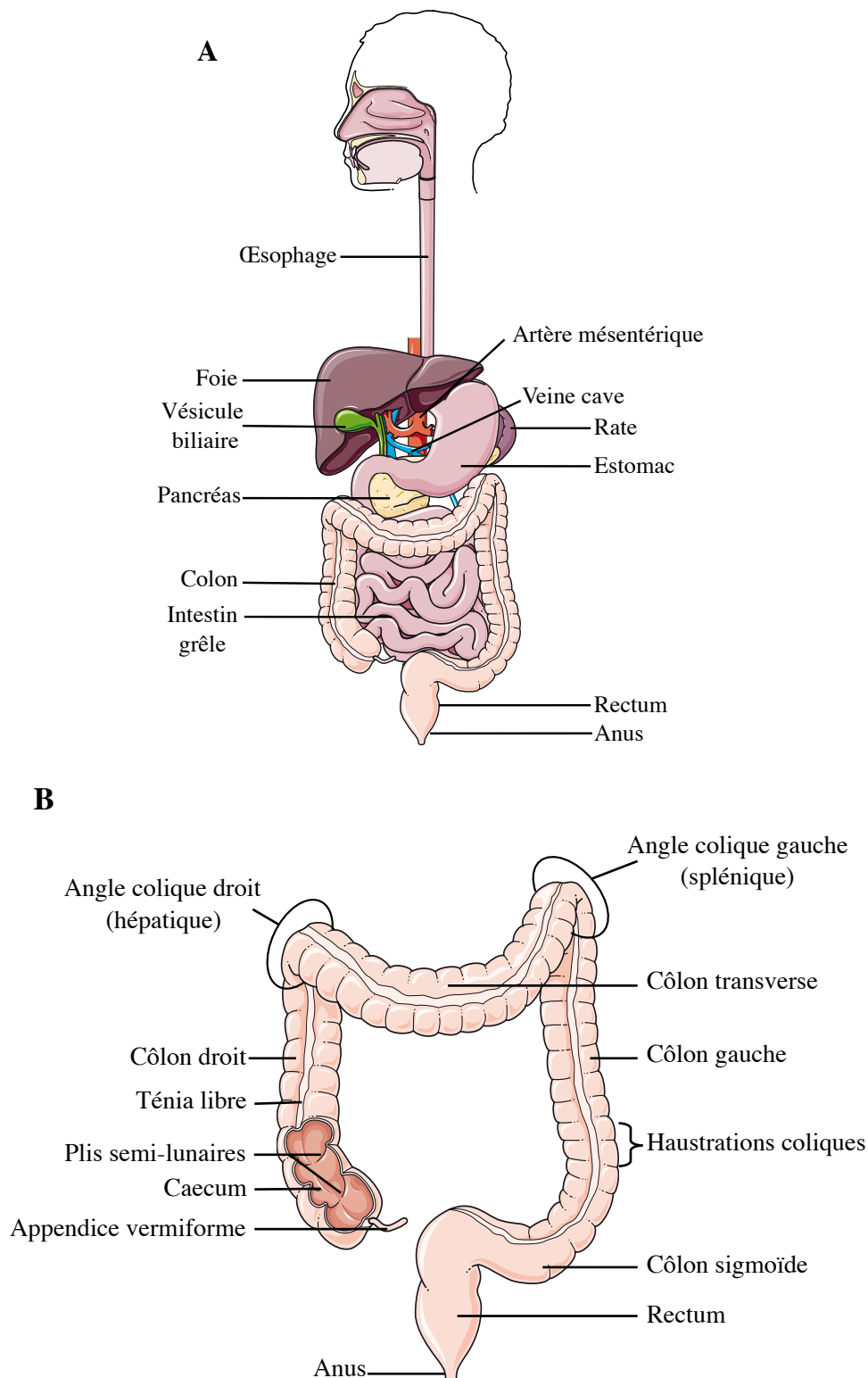


Figure 5 : Anatomie de l'appareil digestif humain

(A) Organisation anatomique de l'appareil digestif humain. L'appareil digestif débute avec l'œsophage, et se poursuit avec l'estomac, l'intestin grêle, le colon, le rectum puis se termine par l'anus. (B) Organisation anatomique du colon et du rectum. Le colon se divise en 4 segments anatomiques, le colon droit, le colon transverse, le colon gauche et le colon sigmoïde. Le rectum fait suite au colon et se termine par l'anus. D'après Servier Medical Art.

Le colon est la partie terminale du tractus gastro-intestinal, il est compris entre la valvule iléo-caecale et la jonction recto-sigmoïdienne (Figure 5A). Les résidus alimentaires qui n'ont été ni digérés ni absorbés arrivent dans le côlon sous forme liquide. Le côlon va absorber l'eau présente dans ces résidus pour former des selles semi-solides, qui passeront dans le rectum avant d'être évacuées par l'anus sous forme solide.

Le côlon peut être divisé en quatre parties (Figure 5B) :

- le colon droit (côlon ascendant) : il s'étend du cæcum à l'angle colique droit, il mesure de 8 à 15 cm pour un diamètre de 6 cm.
- le colon transverse : il est compris entre les angles coliques droit et gauche et mesure 50 cm environ.
- le côlon gauche (côlon descendant) : il fait suite à l'angle colique gauche et prend fin au niveau de la crête iliaque, il mesure 12 cm et son diamètre de 5 à 4 cm décroît de haut en bas. Il est plus ancré dans la fosse lombaire que le colon ascendant.
- le côlon sigmoïde (ou pelvien) qui relie le côlon gauche au rectum : c'est la portion terminale du colon, qui fait suite au colon descendant et précède le rectum. Il a la forme d'une anse mobile, et mesure environ 40 cm.

Le côlon fait suite à l'intestin grêle et mesure environ 1,5 mètre, son diamètre est plus important et il se différencie par la présence de « reliefs » que sont les bandelettes longitudinales, les haustrations coliques et les appendices épiploïques qui sont de petites masses graisseuses implantées le long des bandelettes longitudinales. Sa vascularisation est assurée par les artères mésentériques supérieure et inférieure (Figure 5B).

A

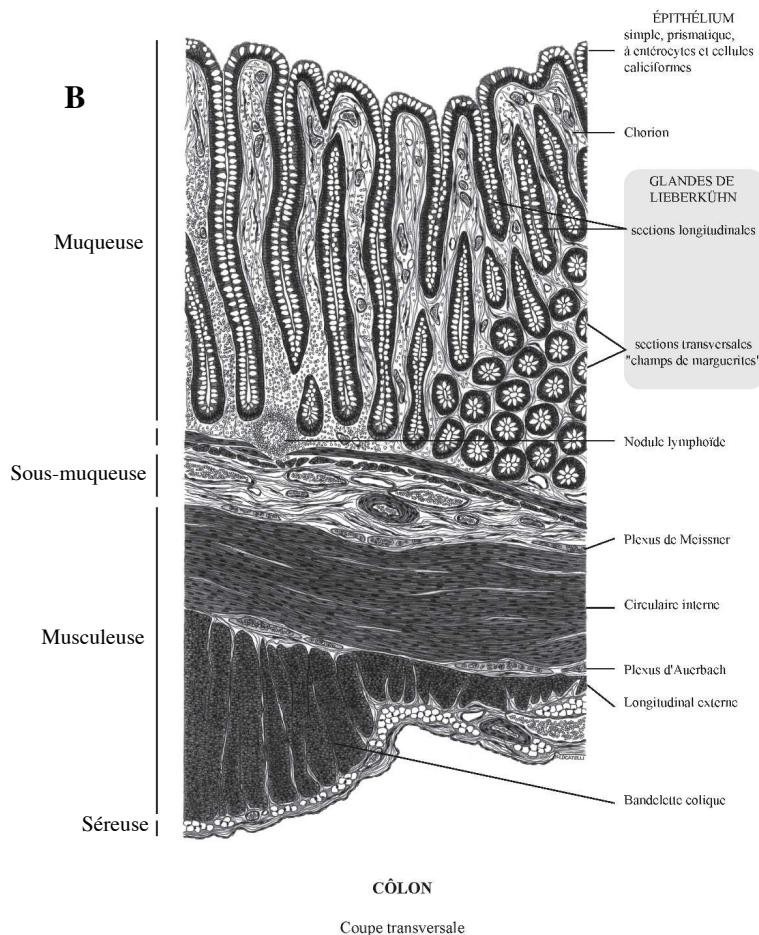
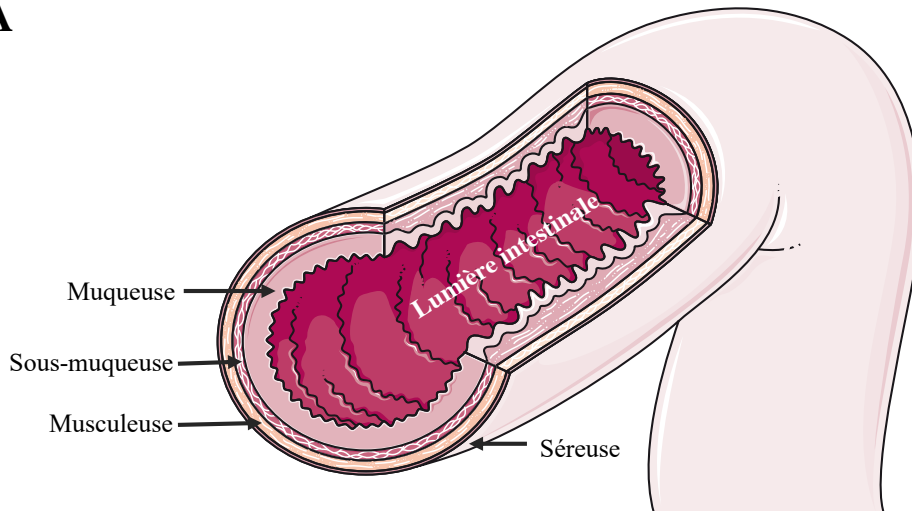


Figure 6 : Composition tissulaire de la paroi intestinale

(A) Schématisation de la paroi colique, composée de quatre couches superposées : la muqueuse, la sous muqueuse, la musculuse et la séreuse. D'après Servier Medical Art. (B) Coupe transversale de la paroi colique avec les différentes tuniques.

D'après <https://doc-pedagogie.umontpellier.fr/medecine/histologieLV>.

La paroi colique est composée de quatre couches qui se superposent (Figure 6) :

- la sous-séreuse : c'est un tissu adipeux et vascularisé entouré par la séreuse, couche externe du côlon constituée par le péritoine viscéral. Des petits amas graisseux, appelés appendices épiploïques, le recouvrent.
- la musculuse : formée d'une couche musculaire superficielle faite de fibres longitudinales, et d'une couche musculaire profonde faite de fibres circulaires. Entre ces deux couches se situe le plexus d'Auerbach responsable de l'innervation végétative du tube digestif.
- la sous-muqueuse : c'est un tissu conjonctif lâche, vascularisé et possédant de nombreux adipocytes. Cette couche est très innervée et renferme notamment le plexus sous-muqueux de Meissner appartenant au système entérique.
- la muqueuse : couche la plus interne dépourvue de plis circulaires et de villosités. Elle est composée d'un chorion occupé par de nombreux nodules lymphoïdes. Elle est recouverte par un épithélium cylindrique polarisé qui s'invagine sous forme de cryptes de Lieberkühn qui parcourent tout le colon. Les cellules calciformes forment la majeure partie de ces cryptes. Au fond des cryptes on retrouve les cellules de Paneth, cellules volumineuses, pyramidales et basophiles. L'épithélium de la couche muqueuse se renouvelle tous les 5 à 6 jours.

I.3.2.2. Anatomie du rectum

Le rectum est le segment terminal du tube digestif. Il est situé dans le petit bassin en avant du sacrum et du coccyx et fait suite au côlon sigmoïde à hauteur de la vertèbre S3, il mesure 12 à 15 cm. Il est composé de deux segments séparés par un angle :

-le rectum pelvien : oblique en bas et en avant, il s'élargit en ampoule rectale et mesure 10 à 12 cm.

- le rectum périnéal : appelé aussi canal anal, oblique en bas et en arrière. Il s'ouvre sur l'anus et mesure 2 à 3 cm.

Entre les deux segments, on retrouve le cap, ou coude du rectum, qui forme un angle de 80° degrés.

Comme le côlon, il est composé des quatre mêmes couches :

- la séreuse : à la différence du colon, le péritoine ne recouvre que la partie supérieure des faces antérieure et latérale.
- la musculuse : la face interne s'épaissit pour former le sphincter interne de l'anus.
- la sous-muqueuse : qui contient le réseau veineux hémorroïdal
- la muqueuse : identique à celle du colon.

I.3.2.3. Classification de Dukes

En 1929, le docteur Cuthbert E. Dukes, un pathologiste de l'hôpital Sant Mark à Londres, établit une classification des tumeurs rectales, qui peut être utilisée pour tous les cancers de la zone intestinale. Il base cette classification des tumeurs sur ce qu'il observe et selon l'étendue de la tumeur (Dukes 1932). Selon lui, le cancer colorectal peut se décliner en 3 stades. Le stade A où la tumeur est limitée à la paroi colorectale sans jamais dépasser la musculuse, le stade B où la tumeur a dépassé la musculuse et s'est répandue aux tissus environnants mais n'a pas envahi les nœuds lymphatiques, et le stade C où l'on observe un

Stade d'extension du cancer colorectal

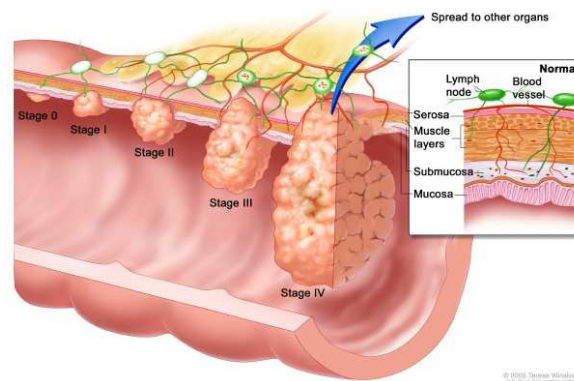


Figure 7 : Développement d'une tumeur colorectale

Le cancer colorectal se développe en cinq stades (de 0 à IV), chacun caractérisé par l'invasion de la masse tumorale. Au stade IV, les cellules tumorales se disséminent dans l'organisme formant des métastases dans d'autres organes. D'après *Cours PBC2060 du 1er avril 2009. Physiothérapie. Université de Montréal.*

Tableau 1 : Classification TNM du cancer colorectal

Bases de la classification TNM. D'après AJCC 7th Edition Colon and Rectum Cancer Staging.

T0	Aucune preuve de tumeur primaire	M0	Pas de métastase distante
Tis	Carcinome <i>in situ</i> : intraépithélial ou invasion de la lamina propria	M1	Présence de métastases distantes
T1	Invasion de la sous-muqueuse	M1a	Métastases retrouvées dans 1 organe/site
T2	Invasion de la muscularis propria	M1b	Métastases dans plus d'un organe/site ou le péritoine
T3	Invasion des tissus péri-colorectaux via la muscularis propria		
T4a	Tumeur envahit la surface du péritoine viscéral		
T4b	Tumeur envahit ou adhère à d'autres organes/structures		
Tx	L'étendue de la tumeur ne peut pas être évaluée		
N0	Pas d'invasion ganglionnaire		
N1	1 à 3 ganglions envahis		
N1a	1 ganglion envahi		
N1b	2 à 3 ganglions envahis		
N1c	Dépôts tumoraux dans la sous-séreuse, le mésentère, ou tissus péri-colorectaux non péritonisés, sans invasion des ganglions		
N2	4 ou plus ganglions envahis		
N2a	4 à 6 ganglions envahis		
N2b	7 ou plus ganglions envahis		
Nx	L'invasion ganglionnaire ne peut pas être évaluée		

envahissement ganglionnaire. Il ne décrit jamais un « stade D » mais il fit référence une seule fois à un « quatrième stade » où la tumeur s'était répandue aux organes distants (Sarma 1988). Des modifications de la classification de Dukes ont été proposées au fil des années, notamment celle de Astler-Coller en 1954 où le stade D apparaît réellement (Astler and Coller 1954). La classification d'Astler-Coller est plus précise que celle de Dukes, et comporte des sous-classes au sein des différents stades. Par exemple, le stade B se dissocie en stade B1 où la tumeur a atteint la musculature sans la dépasser, et en stade B2 où la tumeur a atteint la séreuse.

I.3.2.4. Classification TNM

De nos jours cette classification est obsolète et a laissé place à la classification établie par l'AJCC (American Joint Committee on Cancer) également connue sous le nom de classification TNM (« Tumor Node Metastasis »). Cette classification repose sur trois critères :

- l'étendue de l'invasion et/ou de la taille de la Tumeur (T),
- la présence ou l'absence de métastases dans les Nœuds lymphatiques régionaux (N),
- la présence ou l'absence de Métastases distantes (M).

Une classification TNM, disponible pour chaque type de cancer, est régulièrement mise à jour par l'AJCC. En 2018, paraissait la 8^{ème} édition de la classification TNM, mais pour cette dernière, seule quelques modifications mineures concernant le CCR furent apportées, donc la 7^{ème} édition prévaut toujours pour le cancer colorectal. Cette classification TNM est associée à une classification en stade allant de 0 à IV selon l'avancée du cancer (Figure 7). Et chaque stade est associé à une sous-classification de la classification TNM associée à un chiffre de 0 à 4 (Tableau 1). Si l'on fait une correspondance entre la classification TNM d'aujourd'hui et celles plus anciennes de Dukes et d'Astler-Coller, on constate que la classification de Dukes qui date

Tableau 2 : Correspondance entre les différentes classifications du cancer colorectal

D'après Centelles et al, 2012.

	AJCC/TNM	Dukes	Astler-Coller
Stage 0	Tis, N0, M0	—	—
Stage I	T1-T2, N0, M0	A	A, B1
Stage IIA	T3, N0, M0	B	B2
Stage IIB	T4a, N0, M0	B	B2
Stage IIC	T4b, N0, M0	B	B3
Stage IIIA	T1-T2, N1, M0 T1, N2a, M0	C	C1
Stage IIIB	T3-T4a, N1, M0 T2-T3, N2a, M0 T1-T2, N2b, M0	C	C1, C2
Stage IIIC	T4a, N2a, M0 T3-T4, N2b, M0 T4b, N1-N2, M0	C	C2, C3
Stage IV	Any T, Any N, M1a Any T, Any N, M1b	—	D

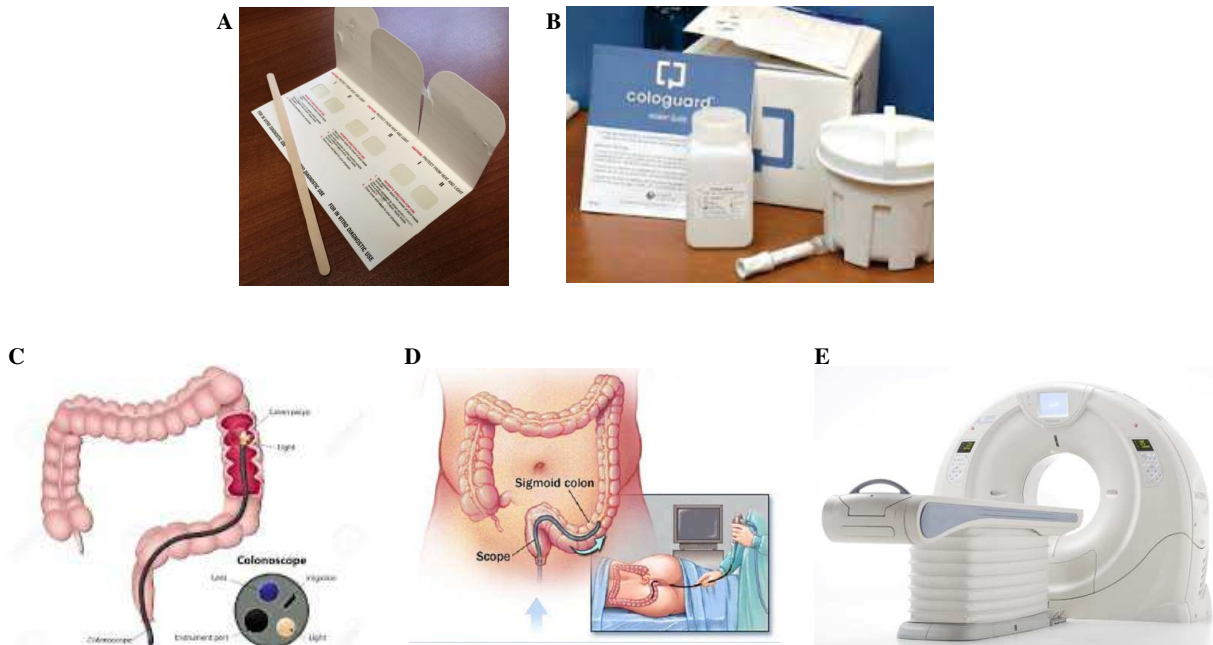


Figure 8 : Les différents moyens de dépistage du cancer colorectal

Il existe des tests non invasifs basés sur la présence de sang dans les selles, à réaliser soi-même (A) et (B). Il existe également des méthodes de visualisation directe comme la coloscopie (C), la recto-sigmoïdoscopie (D), ou la coloscopie virtuelle (E).

presque d'un siècle, était un bon précurseur de la classification TNM (Tableau 2) (Centelles 2012).

I.3.3. Dépistage

I.3.3.1. Les différentes techniques de dépistage

Les tumeurs colorectales se développent en général à partir de polypes. Un polype est une excroissance se développant à la surface d'une muqueuse. Il existe plusieurs types de polypes, certains ayant peu de chance de se transformer en cancer, comme les polypes hyperplasiques issus de la prolifération rapide des cellules dans une section de la muqueuse intestinale. Ils ne deviennent pas malins sauf si plus de 100 sont détectés dans la même zone.

Les polypes inflammatoires ont également peu de chance de se transformer en cancer colorectal, on les retrouve généralement chez les personnes affectées par une maladie inflammatoire comme la maladie de Crohn, ce sont des zones de tissus enflammés.

D'autres types de polypes sont les précurseurs des lésions cancéreuses et ont un potentiel cancéreux (appelés aussi polypes néoplasiques) : les polypes adénomateux et les polypes sessiles festonnés (SSPs). Tous ces polypes peuvent être sessiles (plats) ou pédiculés (sur pieds) (Simon 2016).

Comme pour tous types de cancers, on distingue deux types d'appellations : les adénomes et les carcinomes. Les adénomes sont des tumeurs bénignes, alors que les carcinomes désignent des tumeurs malignes. A partir de 50 ans il est conseillé de réaliser un test de dépistage du CCR tous les 2 ans. Plusieurs méthodes existent pour dépister ce type de cancer (Figure 8). Tout d'abord des tests non invasifs comme le test gFOBT (« gaiac Fecal Occult Blood Test ») ou le test FIT (« Fecal Immunochemical Test ») basés sur la Recherche de Sang Occulte Fécal (RSOF). Les lésions cancéreuses peuvent se détériorer aux passages de résidus dans le colon, et ainsi libérer du sang que l'on retrouvera dans les selles. Ces tests sont donc basés sur la

détection de sang dans les selles. Le test gFOBT repose sur une réaction chimique, basée sur l'activité peroxydase dans les selles, il consiste à déposer un échantillon sur un papier gaiac (contenant l'acide α -guaiaconique, issu de la résine de bois de gaïacs). Si du sang est présent dans les selles, en présence de peroxyde d'hydrogène une coloration bleue apparaîtra en quelques secondes. Ce test très rapide et non invasif doit être réalisé sur trois échantillons différents pendant trois jours consécutifs. Il présente néanmoins un inconvénient majeur : le manque de spécificité envers le sang humain et donc un grand nombre de faux-positifs. Quarante-vingt-dix pourcents des coloscopies réalisées après un test gaiac positif s'avèrent négatives. Le test Hemocult II commercialisé par Beckman Coulter Diagnostic, est le plus couramment utilisé (Strul and Arber 2002). Si le patient a un régime alimentaire riche en viande rouge par exemple, ces tests gFOBT ont de fortes chances de se révéler positifs, dû à la présence d'hémoglobine dans les selles.

C'est pour cette raison que les tests immunologiques (FIT) sont utilisés. Non invasifs et peu chers, comme les tests gFOBT, ils reposent sur la détection d'antigènes humains présents dans les selles. Une étude de 2008 a démontré que les tests gFOBT sous-estimaient la prévalence des adénomes avancés et des tumeurs colorectales en comparaison aux FIT (van Rossum et al. 2008).

Si ces tests non invasifs s'avèrent positifs, ou si le médecin la juge nécessaire, une coloscopie doit être réalisée. C'est la méthode de dépistage la plus utilisée pour le dépistage du CCR. À partir de 50 ans, il est recommandé de réaliser une coloscopie tous les 10 ans. Cette méthode invasive permet une visualisation directe de l'ensemble du colon, et permet de détecter une tumeur avec une sensibilité de plus de 95% lorsqu'il s'agit de détecter des polypes supérieurs à 10 mm de diamètre. Cette sensibilité descend à 88% lorsqu'il faut détecter des polypes inférieurs à 10 mm. L'avantage majeur de la coloscopie repose sur la visualisation des tumeurs et leur retrait à un stade précoce. Des tumeurs peuvent être masquées à cause de plis ou de

résidus. Cependant cette méthode présente des inconvénients. En effet, cette pratique nécessite une préparation intestinale importante et le patient doit être sous anesthésie générale ce qui peut être un facteur limitant pour les sujets à risque. Cette pratique n'est pas sans danger, il y a possibilité de perforations coliques associées à des saignements (0,3 à 2,3%) (Pilleul 2010).

La Recto-Sigmoïdoscopie (RSS) est une technique qui repose sur le même principe que la coloscopie, cette méthode permet la visualisation de la moitié distale du colon. Ne nécessitant pas d'anesthésie générale, cette technique a une sensibilité supérieure à 95% pour la partie du colon examinée. Elle présente les mêmes avantages et inconvénients que la coloscopie si ce n'est que la RSS se pratique sans anesthésie et procure donc un inconfort pour le patient.

La tomographie computerisée (CT) scan, aussi appelée « coloscopie virtuelle » ou « coloscanner », est une technique non invasive qui consiste à créer une image en trois dimensions du colon pour visualiser des lésions. C'est une forme particulière de scanner basée sur l'utilisation de rayon X. Cette technique présente l'avantage d'avoir une visualisation complète du colon sans nécessité d'anesthésie et sans les risques qui en découlent. La coloscopie virtuelle permet de détecter 90% des polypes ayant un diamètre supérieur ou égal à 10 mm. Mais ce taux descend à 78% pour des polypes inférieurs à 6 mm de diamètre (Johnson et al. 2008).

I.3.3.2. Les marqueurs tumoraux associés au cancer colorectal

Un autre moyen de dépister une tumeur colorectale est par une simple prise de sang. Beaucoup moins invasif pour le patient, on recherche dans le sang la présence (ou l'augmentation) de marqueurs spécifiques des tumeurs. Malheureusement il n'existe pas de marqueur spécifique exclusif du CCR.

Le principal marqueur tumoral utilisé pour le CCR est l'antigène carcino-embryonnaire (ACE),

une glycoprotéine de surface impliquée dans l'adhésion des tissus épithéliaux (Imamura et al. 1990)(Fukushima et al. 1995). Le taux sanguin d'ACE augmente dans 60% à 85% des cas de cancers colorectaux, malheureusement ce dernier n'est pas spécifique puisqu'il augmente également en cas de cancers du poumon, du foie, de l'estomac, du pancréas ou encore du sein (Duffy et al. 2003), et également chez les fumeurs (Sajid et al. 2007). Un second biomarqueur couramment utilisé est le CA 19-9 (Carbohydre Antigen 19-9 aussi appelé antigène Sialyl Lewis a) (Koprowski et al. 1979). Le taux sérique de cet antigène est augmenté de 35 à 40% dans les stades tardifs de cancers colorectaux, mais également dans d'autres cancers. Ces deux biomarqueurs sont généralement utilisés en association, mais une étude de 2014 a montré que chez 19,3% des patients atteints par un cancer colorectal, ces deux biomarqueurs n'augmentaient pas (Stikma, Grootendorst, and van der Linden 2014).

Une étude récente montre que certains membres de la famille des métalloprotéinases (MMPs) et leurs inhibiteurs (TIMPs) pourraient être utilisés comme marqueurs tumoraux du cancer colorectal. En effet, les niveaux sériques de MMP-7, MMP-9, MMP-11, TIMP-1, TIMP-2 ainsi que ceux de ACE et CA 19-9 sont significativement plus élevés chez les patients atteints de cancers colorectaux. Les niveaux de MMP-7 sont plus élevés dans les cancers du côlon (*versus* rectum) et dans les métastases ganglionnaires alors que de plus hauts niveaux de TIMP-1 sont observés pour des stades élevés (III et IV), des métastases ganglionnaires et des métastases à distance. La détection de ces trois marqueurs ACE, MMP-7 et TIMP-1 en combinaison serait un outils diagnostique plus spécifique et plus sensible que la détection de chaque marqueur pris individuellement (Huang et al. 2021). D'autres marqueurs sont étudiés, comme l'antigène carbohydre 242 (Yang et al. 2012) ou la NSE (Neurone-Spécifique Enolase), enzyme glycolytique spécifique des neurones (Isgrò, Bottoni, and Scatena 2015). Les taux sériques de ces deux marqueurs augmentent également chez des patients atteints de cancer colorectal. Le taux sérique de NSE augmente dans des stades tardifs de CCR, mais également dans les cancers

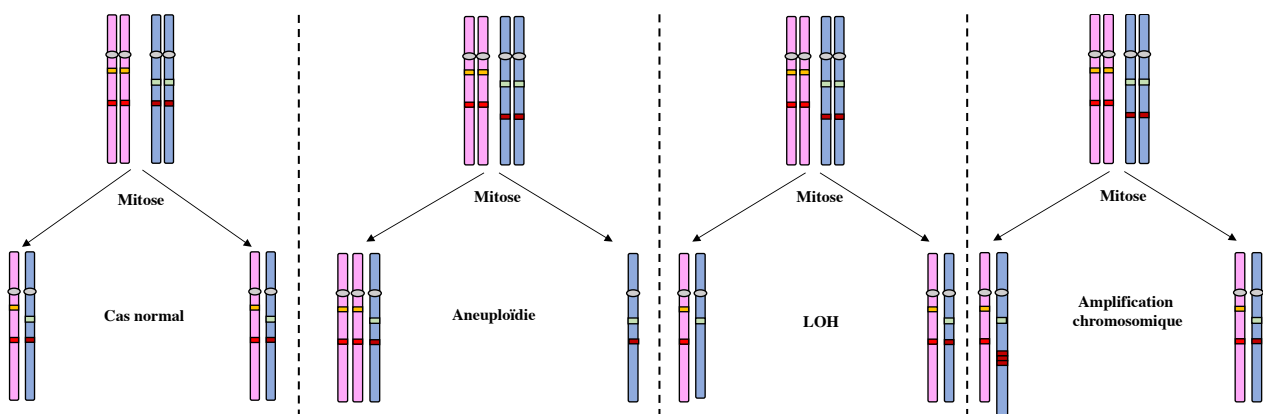


Figure 9 : Représentation schématique des instabilités chromosomiques couramment observées dans les tumeurs

Dans un cas normal, une cellule mère se divise et donne deux cellules filles identiques. Dans les tumeurs colorectales on observe fréquemment une instabilité chromosomique pouvant aboutir à un changement du nombre de chromosome (aneuploïdie), une perte d'hétérozygotie (LOH) c'est à dire une perte d'un des deux allèles parentaux, ou encore à des amplifications.

gastriques (Luo et al. 2020). Toutes ces données démontrent l'importance d'identifier des marqueurs plus spécifiques du cancer colorectal et qui permettraient d'identifier la maladie à des stades précoces.

I.3.4. Mécanismes associés au cancer colorectal

Les tumeurs colorectales, comme d'autres tumeurs, sont caractérisées par des instabilités génomiques. A ce jour, trois types d'instabilités génomiques ont été caractérisées : l'instabilité chromosomique (Chromosomal Instability (CIN)) retrouvée dans 75% des CCR, l'instabilité microsatellitaire (MSI) dans 15% des CCR, et l'hyperméthylation des îlots CpG (CIMP) dans 25% des cas. Ces mécanismes ne sont pas exclusifs les uns des autres (Grady and Carethers 2008).

I.3.4.1. Instabilité chromosomique

L'instabilité chromosomique est un phénomène dynamique se traduisant par des gains ou des pertes de portions chromosomiques conduisant à des remaniements chromosomiques importants (Lengauer, Kinzler, and Vogelstein 1998) et conduisant à une hétérogénéité intratumorale. Ces CIN entraînent des aneuploïdies (changement du nombre de chromosomes (en entier ou des portions)), avec des amplifications de certaines régions chromosomiques ou encore à des pertes d'hétérozygotie (LOH) c'est à dire la perte d'un des allèles parentaux présents dans les cellules normales (Figure 9).

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine des instabilités chromosomiques :

Le mécanisme de séparation des chromosomes peut être altéré. Pendant la mitose, un point capital de contrôle du cycle cellulaire se situe entre la métaphase et l'anaphase (aussi appelé SAC pour Spindel Assembly Checkpoint). Ce point de contrôle permet de stopper le cycle si

Tableau 3 : Chromosomes les plus souvent touchés par les LOH dans le cancer colorectal
 (LOH : Loss of Heterozygoty). D'après Thiagalingam. 2001.

	Chromosome				
	1	5	8	17	18
% avec LOH	53,2	46,8	55,8	72,5	78,1
% avec LOH sur le bras p	51,6	0	48,1	41,9	0
% avec LOH sur le bras q	1,6	35,5	0	0	14,5
% avec perte chromosomique complète	0	11,3	7,7	30,6	63,6

les chromosomes ne sont pas correctement fixés au fuseau mitotique via leurs kinétochores (Lara-Gonzalez, Westhorpe, and Taylor 2012). Un défaut à ce point de contrôle conduira à un défaut dans la séparation des chromosomes et à une aneuploïdie à la génération suivante. Un dysfonctionnement dans l'activité télomérase peut également être en cause. Les télomères sont de courtes séquences d'ADN hexamériques situées aux extrémités des chromosomes, et les protégeant des « fusions et des cassures ». Une petite partie des séquences télomériques est perdue à chaque cycle cellulaire due à l'incapacité de l'ADN polymérase à synthétiser la partie 3'. Un dysfonctionnement de cette activité peut engendrer un phénomène de « breakage-fusion-bridge » (fusion de deux chromatides sœurs ayant perdu leurs télomères) qui peut s'amplifier avec les générations suivantes causant des réorganisations importantes du génome (O'Hagan et al. 2002). Des télomères plus courts sont observés dans 77 à 90% des tumeurs colorectales en comparaison à des échantillons sains (Engelhardt et al. 1997). Mais étonnement, une augmentation de l'activité télomérase a également été observée dans des tumeurs colorectales (Chadeneau et al. 1995). En regardant plus attentivement, on s'aperçoit que des télomères plus courts concernent des tumeurs colorectales à des stades précoces, alors que des tumeurs à des stades avancées ont une activité télomérase plus importante participant sans nul doute au maintien des cellules tumorales ainsi qu'à leur immortalité et donc à la tumorigénèse (Engelhardt et al. 1997)(Gertler et al. 2004).

La perte d'hétérozygotie représente la perte de matériel génétique provenant d'un des deux parents. Ce mécanisme peut survenir à la suite d'une délétion, une conversion génique, une recombinaison génique ou encore une perte chromosomique. La perte d'hétérozygotie est une caractéristique des tumeurs colorectales avec une instabilité chromosomique (tumeurs CIN positives). Les cinq chromosomes les plus impactés dans les tumeurs colorectales sont les chromosomes 1, 5, 8, 17 et 18 (Thiagalingam et al. 2001). Selon le chromosome touché, la LOH peut concerner le bras court du chromosome (p), le bras long (q) ou bien les deux (Tableau 3).

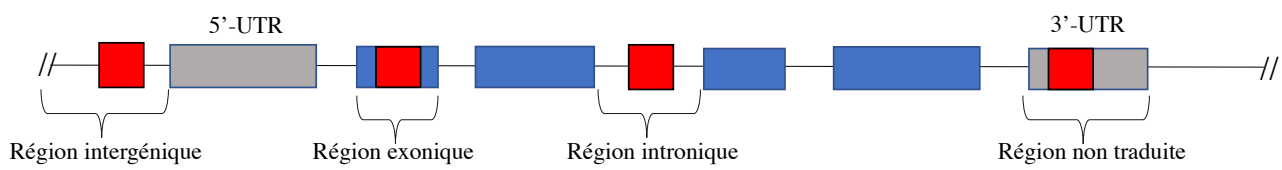


Figure 10 : Distribution des microsatellites dans le génome humain

Les microsatellites sont de courtes séquences nucléotidiques de 1 à 5 nucléotides répétées en tandem (carrés rouges) et répartis dans l'ensemble du génome. D'après Yang, Zheng, and Jin 2019.

La perte d'un chromosome entier, comme c'est le cas pour le chromosome 18, est causée par une non-disjonction mitotique. Une LOH ne touchant qu'une partie d'un chromosome serait plutôt due à des recombinaisons interchromosomiques.

Associés à la transition adénomes-carcinomes, sept changements chromosomiques sont retrouvés dans plus de 40% des carcinomes : pertes des portions 8p21-pter, 15q11-q21, 17p12-13 et 18q12-21, et gains des portions 8q23-qter, 13q14-31 et 20q13 (Hermsen et al. 2002). Ces changements chromosomiques ont été référencés comme des événements associés aux cancers (CEAs). La présence de ces CEAs dans des adénomes est un indicateur de leur progression maligne.

1.3.4.2. Instabilité microsatellitaire

Moins fréquentes que les instabilités chromosomiques, les instabilités microsatellitaires sont typiques des cancers colorectaux héréditaires sans polypose (HNPCC) ou syndrome de Lynch, représentant 2 à 3% des cancers colorectaux totaux (Hampel et al. 2005). Les microsatellites sont de courtes séquences d'ADN de 1 à 5 nucléotides répétées en tandem (Ionov et al. 1993). On estime à plus de 1 million le nombre de loci de microsatellites répartis dans le génome humain, aussi bien dans les régions introniques, exoniques, intergéniques ou non traduites (Figure 10) (Ellegren 2004). Ces séquences sont très fréquemment sujettes à des mutations. Les erreurs les plus fréquentes sont dues à l'incapacité de la cellule à réparer les erreurs introduites lors de la réplication de l'ADN en raison de problèmes dans les mécanismes de réparation de l'ADN ou MMR (DNA Mismatch Repair).

Des insertions et/ou des délétions dans les séquences microsatellitaires peuvent engendrer des décalages de cadre de lecture dans les séquences de certains gènes et aboutir à des protéines tronquées ou mutées (Jiricny 2006), c'est le cas par exemple pour les gènes *TGFBR2*, *MSH3*,

PTEN ou encore *CASPASE5* (Kim and Kang 2014). On peut détecter les MSI par amplification (PCR) de répétitions microsatellitaires appelées marqueurs. Un panel de microsatellites marqueurs a été établi dans les années 1990, appelé panel de Bethesda. Ce panel de référence contient cinq loci de microsatellites : deux mononucléotides (BAT25 et BAT26 (Big Adenin Tract)) et trois dinucléotides (D5S346, D2S123 et D17S250) (Boland et al. 1998). Sur la base de ces 5 loci, on différencie trois catégories de tumeurs colorectales selon le taux de MSI : les tumeurs MSI-H (MSI-High) avec une instabilité sur 2 ou plus de ces loci ; les tumeurs MSI-L (MSI-Low) avec une instabilité sur un seul locus ; et les MSS (MSI Stable) sans instabilité sur aucun de ces 5 loci. On reconnaît aujourd'hui que le panel de Bethesda a ses limites puisqu'il utilise des répétitions dinucléotidiques comme marqueurs, moins sensibles que les répétitions mononucléotidiques (Murphy et al. 2006). D'autres microsatellites sont utilisés comme marqueurs, basés sur un panel de 266 microsatellites, cinq s'avèrent plus spécifiques des tumeurs MSI-H (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 and MONO-27) (Bacher et al. 2004).

I.3.4.3. Hyperméthylation des îlots CpG

La méthylation de l'ADN correspond à l'ajout d'un groupe méthyl sur une cytosine par des ADN méthyltransférases (DNMT) (Bestor 2000). Les DNMT agissent préférentiellement sur les dinucléotides CG. Les îlots CpG correspondent à des régions d'au moins 200pb avec un minimum de 50% de GC, et formant des clusters de dinucléotides CpG. Souvent localisée dans les régions promotrices des gènes, la méthylation des îlots CpG réprime leur expression. L'existence d'îlots CpG méthylés dans les tumeurs colorectales est appelée CIMP (CpG Island Methylator Phenotype). Comme pour les MSI, on distingue trois catégories de tumeurs CIMP : les CIMP-High, avec de hauts niveaux de méthylation, les CIMP-Low avec de faibles niveaux de méthylation, et les CIMP-négatives (Toyota et al. 1999)(Fedorova et al. 2019) ; 25% des

Tableau 4 : Liste des gènes méthylés et inactivés couramment utilisés comme marqueurs des tumeurs colorectales

D'après Lao et al. 2011.

Gène	Protéine	Effets de la perte de fonction
<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli	Augmente la signalisation Wnt/ β -caténine
<i>MLH1</i>	MutL homologue 1	Instabilité microsatellitaire
<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA méthyltransférase	Augmente la fréquence des mutations G \rightarrow A
<i>RASSF1A</i>	Ras association domain family 1 (isoforme A)	Augmente la signalisation RAS/RAF/MAP kinase, et l'apoptose dépendante des récepteurs de mort
<i>SLC5A8</i>	Sodium solute symporter family 5 member	Inconnus
<i>RUNX3</i>	Runt-related transcription factor 3	Diminue la signalisation TGF- β /BMP
<i>MINT1</i>	Methylated in tumor locus 3	Inconnus
<i>MINT31</i>	Methylated in tumor locus 31	Inconnus
<i>SFRP1</i>	Secreted frizzled-related protein 1	Augmente la signalisation Wnt/ β -caténine
<i>SFRP2</i>	Secreted frizzled-related protein 2	Augmente la signalisation Wnt/ β -caténine
<i>CDH1</i>	E-cadhérine	Perte d'adhésion cellulaire, augmente la signalisation Wnt/ β -caténine
<i>CDH13</i>	Cadhérine 13	Augmente la signalisation PI3K/Akt/mTOR
<i>CRABP1</i>	Retinol-binding protein 1	Inconnus
<i>CDKN2A/p16</i>	Cycline-dependent kinase inhibitor 2A	Augmente la prolifération cellulaire
<i>HLTF</i>	Helicase-like transcription factor	Perturbe la réparation de l'ADN
<i>CDKN2A (p14, ARF)</i>	Protein 14	Diminue la stabilité et l'activation de p53
<i>ESR1</i>	Estrogen receptot 1	Perte de la signalisation du récepteur aux œstrogènes
<i>TIMP3</i>	Tissues inhibitor of metalloproteinase 3	Augmente la signalisation de l'EGFR et TNF α
<i>CXCL12</i>	Chemokine ligand 12	Augmente la formation de métastases
<i>ID4</i>	Inhibitor of DNA binding 4	Inconnus
<i>IRF8</i>	Interferon regulatory factor 8	Signalisation de l'interferon
<i>THBS1/TSP1</i>	Thrombospondin 1	Diminue la signalisation TGF- β 1
<i>DAPK</i>	Death Associated protein kinase	Signalisation interferon gamma, TNF α , Fas/APO1
<i>VIM</i>	Vimentine	Pas d'effet biologique connus
<i>SEPT9</i>	Septine 9	Perte des points de contrôle du cycle cellulaire

CCR présentent une méthylation des promoteurs plus importante et sont donc considérés comme CIMP-positives. Plusieurs gènes sont utilisés comme marqueurs de méthylation, le gène *vim* codant la vimentine par exemple. Une méthylation aberrante de son promoteur a été identifiée chez des patients atteints de CCR, en comparaison à des personnes saines. Il en est de même pour la méthylation du promoteur du gène *SFRP2* (Secreted-Frizzled Related Protein 2). La méthylation de plusieurs autres gènes est utilisée comme marqueur tumoral pour les CCR (Tableau 4) (Draht et al. 2012)(Lao and Grady 2011). Dans la majorité des cas de cancers colorectaux on retrouve une hyperméthylation du gène *MLH1*, impliqué dans la réparation de l'ADN (Herman et al. 1998).

Les trois types de tumeurs CIMP sont associés à d'autres modifications géniques. Les tumeurs CIMP-H sont caractérisées par des MSI (dans 80% des cas), des mutations dans la séquence du proto-oncogène *BRAF* (dans 53% des cas), et plus rarement des mutations dans les séquences des proto-oncogènes *KRAS* et *p53*. Les tumeurs CIMP-L présentent, dans 92% des cas, des mutations de *KRAS* et dans de rares cas des mutations de *p53* et *BRAF* ainsi que des MSI. Les tumeurs CIMP-négatives, quant à elles, présentent majoritairement des mutations de *p53* (dans 71% des cas) et des taux plus faibles de MSI et de mutations dans les séquences de *BRAF* et *KRAS* (Shen et al. 2007).

L'hyperméthylation est utilisée en clinique comme marqueur tumoral du CCR. Il existe des tests de dépistage du CCR basés sur la détection de l'hyperméthylation de certains gènes spécifiques (Cologuard Assay (LabCorp) ou Epi proColon assay (Epigenomics)) (Lao and Grady 2011).

I.3.4.4. Mutations associées au cancer colorectal

Comme tous les types de cancers, les tumeurs colorectales sont caractérisées par une multitude de mutations. Associées aux anomalies chromosomiques on retrouve de nombreuses mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs et/ou des oncogènes, qui vont favoriser l'apparition et le maintien de la tumeur. Une mutation, très souvent identifiée et très tôt, est la mutation du gène suppresseur de tumeur *APC* (Adenomatous Polyposis Coli). En 1992, une équipe du centre oncologique Johns Hopkins a montré que des mutations somatiques du gène *APC* sont retrouvées dans 60% des carcinomes et dans 63% des adénomes colorectaux, aboutissant dans la majorité des cas à une protéine APC tronquée (Powell et al. 1992). La protéine APC fait partie d'un complexe protéique composé de la GSK-3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 β), de la β -caténine, de la CK1 α/ϵ (Casein Kinase 1 α/ϵ) et de l'axine. La phosphorylation de la β -caténine par la GSK-3 β permet son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Il en résulte une absence d'activation de la voie de signalisation Wnt (Rubinfeld et al. 1996). Une protéine APC tronquée ne permettra pas la formation du complexe de destruction, conduisant à une accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme qui sera transloquée dans le noyau pour jouer son rôle de facteur de transcription et activer de nombreux gènes liés à la croissance tumorale ou encore à l'invasion (Clevers and Nusse 2012).

L'oncogène *KRAS* est retrouvé muté dans 45% des tumeurs colorectales (Ucar et al. 2020). Des mutations d'un seul nucléotide sont souvent retrouvées dans les codons 12 ou 13 de l'exon 2, moins souvent dans le codon 61 de l'exon 3. Ces mutations bloquent la protéine KRAS dans sa forme active liée au GTP (Takayama et al. 2001)(Pretlow and Pretlow 2005). L'activation de cette protéine GTPase régule de nombreux processus via la voie Ras/MEK/ERK.

Les protéines Ras-GTP lient également la PI3K. Une des protéines constituant la sous-unité α de la PI3K, PIK3CA, est aussi retrouvée mutée dans au moins 20% des tumeurs colorectales. Ces mutations se situent dans l'exon 9 ou 20 du gène, et favorisent le caractère oncogénique de

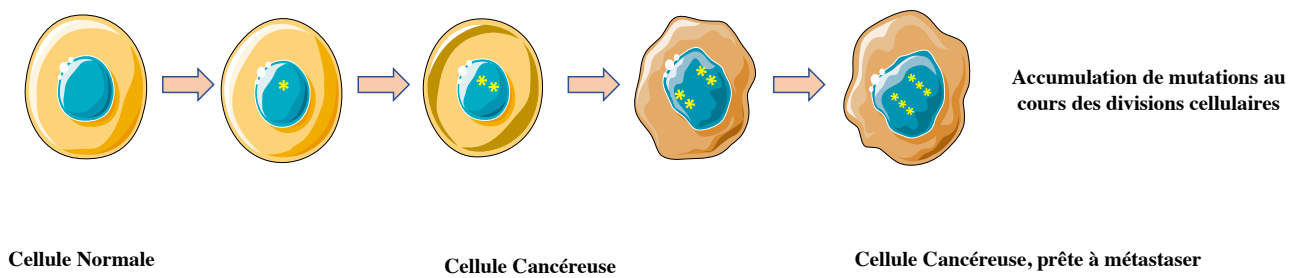


Figure 11 : Processus de transformation d'une cellule saine en cellule tumorale
 Une cellule normale accumule des mutations (étoiles jaunes) au cours de ses divisions successives et échappe au système de contrôle cellulaire, et devient cancéreuse.

la cellule en augmentant son activité kinase (Samuels and Velculescu 2004). La protéine p53 est largement impliquée dans la carcinogenèse colorectale. Situé sur le chromosome 17, le gène *p53* code un facteur de transcription de 393 acides aminés. Souvent appelée « gardienne du génome », la protéine p53 contrôle la transcription de centaines de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose, de la réponse immunitaire, de la migration, de la prolifération ou encore de la différenciation cellulaire (Menendez, Inga, and Resnick 2009). Cinquante à 75% des tumeurs colorectales présentent des mutations de *p53* associées à son dysfonctionnement. Quatre-vingt pourcents de ces mutations sont des mutations faux-sens dans 5 codons (codons 175, 245, 248, 273 et 282) (Bérout and Soussi 2003). Ces mutations conduisent à une protéine p53 inactive, ne régulant plus ses nombreuses cibles et favorisant le développement de cellules tumorales.

Connaître la présence des mutations affectant ces gènes peut être essentiel pour adapter un traitement. En effet, parmi elles certaines confèrent une résistance à des agents anti-tumoraux. Par exemple, les tumeurs présentant des mutations *KRAS* sont associées à une mauvaise réponse aux traitements utilisant le cetuximab ou le panitumumab (Karapetis et al. 2008)(Amado et al. 2008).

I.3.4.5. Transformation d'une cellule saine en cellule tumorale

La transformation d'une cellule saine en cellule tumorale est un processus long qui se déroule en plusieurs étapes. Au cours de ses divisions successives, une cellule saine peut acquérir des mutations qui, normalement, sont prises en charge par le système de réparation de l'ADN (Figure 11). Les mutations les plus importantes pour une transformation tumorale sont celles qui auront des conséquences sur la prolifération cellulaire, qui permettront d'échapper aux systèmes de contrôle du cycle cellulaire et celles qui permettront d'échapper à la mort

cellulaire. Comment apparaissent ces mutations ? Certains facteurs externes peuvent favoriser l'apparition de mutations (exposition à des agents mutagènes comme les ultra-violets ou des agents chimiques), par exemple la fumée de cigarette augmente les risques de mutations dans les cellules bronchiques et donc de cancer du poumon. Il est difficile, voire impossible, de déterminer quelle mutation est apparue en premier. Lorsque l'on identifie une mutation spécifique au sein d'une cellule tumorale il s'avère impossible de savoir si cette mutation participe au maintien de la tumeur ou si elle n'est qu'une conséquence du processus tumoral. On peut assimiler cette notion à la théorie de l'œuf et de la poule, qui est arrivé en premier ? L'apparition de mutations engendre la transformation tumorale ou bien le processus tumoral engendre l'apparition des mutations ? C'est sans nul doute un mélange des deux. Certaines mutations participent au maintien de la tumeur quand d'autres sont la conséquence d'une division tumorale anarchique. Ces mutations aboutiront à des protéines plus ou moins actives, des protéines tronquées voire une absence totale de certaines protéines. En plus des mutations, on retrouve souvent des changements d'expressions de certaines protéines associées aux cancers. Ces changements d'expressions ou ces protéines mutées peuvent avoir des conséquences directes ou bien agir sur d'autres protéines et moduler leur comportement. C'est notamment le cas pour les protéines impliquées dans toutes les transductions de signaux, dans la régulation de la mort cellulaire, dans la régulation du cycle cellulaire ou bien impliquées dans les modifications post-traductionnelles.

Chapitre II. Glycosylations : Modifications clés dans la vie d'une cellule

II.1. Différents types de glycosylation

Les glycosylations des protéines sont des modifications post-traductionnelles d'une importance capitale puisqu'elles sont retrouvées chez les eucaryotes, les bactéries et les archaebactéries (Dell et al. 2010). On estime que 1 à 2% du génome code pour des glycosyltransférases, et que 80% des protéines humaines sont glycosylées (Henrissat, Surolia, and Stanley 2009). Ces glycosylations correspondent à l'ajout d'un monosaccharide sur une structure peptidique. Le monosaccharide greffé en premier lieu peut être varié (fucose, mannose, galactose, glucose, xylose, *N*-acétylglucosamine, *N*-acétylgalactosamine). Ces sucres peuvent par la suite être rallongés par un ou plusieurs autres sucres, grâce à des glycosyltransférases spécifiques du sucre et de la liaison. Les glycosyltransférases se répartissent en 43 familles chez l'Homme (Varki et al. 2009). La synthèse des glycanes nécessite également des glycosidases qui sont responsables de la suppression de certains oses (notamment des précurseurs), ainsi que des transporteurs de nucléotides sucres. En effet chaque famille de glycosyltransférases va utiliser un nucléotide sucre donneur spécifique (GDP-fucose pour les fucosyltransférases et CMP-acide sialique pour les sialyltransférases par exemple). Il existe plusieurs types de glycosylations, la *N*-glycosylation, la *O*-glycosylation, plus rarement la *C*-glycosylation et très rarement la *S*-glycosylation, chacune caractérisée par le type de liaison entre le sucre greffé et l'acide aminé receveur.

II.1.1. La *S*-glycosylation

La *S*-glycosylation est une forme de glycosylation très rare identifiée pour la première fois en 1971 dans des échantillons d'urine (Lote and Weiss 1971), et dans la membrane d'érythrocytes humains (Weiss, Lote, and Bobinski 1971). Cette modification correspond à

l'ajout de sucres sur l'atome de soufre de cystéines. Les peptides analysés dans les échantillons d'urine ou d'érythrocytes contenaient une cystéine en *N*-terminal sur laquelle était lié un digalactose ou un triglucose, dans les deux cas un résidu glutamate était adjacent à la cystéine (Weiss, Lote, and Bobinski 1971)(Lote and Weiss 1971). À ce jour, seulement deux glycosyltransférases ont été identifiées comme des *S*-glycosyltransférases : SunS produite chez *Bacillus subtilis* 168 (Oman et al. 2011), qui catalyse la *S*-glycosylation du glycopeptide sublancine ; et ThuS produite chez *Bacillus thuringiensis* serovar *andalousiensis* (Wang et al. 2014), première glycosyltransférase catalysant à la fois une réaction de *O*-glycosylation et de *S*-glycosylation *in vitro* sur le même peptide.

II.1.2. La *C*-glycosylation

La *C*-glycosylation correspond à l'ajout d'un mannose (aussi appelé *C*-mannosylation) sur le carbone 2 d'un résidu tryptophane. Le mannose sera transféré à partir du dolicholphosphate-mannose (Dol-P-Man), issu du GDP-mannose (Doucey et al. 1998). Cette modification a été identifiée pour la première fois en 1994 sur le tryptophane 7 de la RNase 2 d'urine humaine (Hofsteenge et al. 1994). La *C*-mannosylation requiert un résidu tryptophane appartenant à une séquence consensus « Trp-X-X-Trp » (où X représente n'importe quel acide aminé) (Furmanek and Hofsteenge 2000). La plupart des protéines potentiellement *C*-mannosylables appartiennent principalement à la famille des thrombospondines de type-1 (TSR) et à la famille des récepteurs cytokine de type I (Furmanek and Hofsteenge 2000). La *C*-mannosylation est impliquée dans des processus biologiques important comme la sécrétion protéique et les voies de signalisation (Fujiwara et al. 2016)(Sasazawa et al. 2015), ou la différenciation des granulocytes via une meilleure affinité de la protéine mannosylée G-CSFR pour son ligand le G-CSF (Otani et al. 2018).

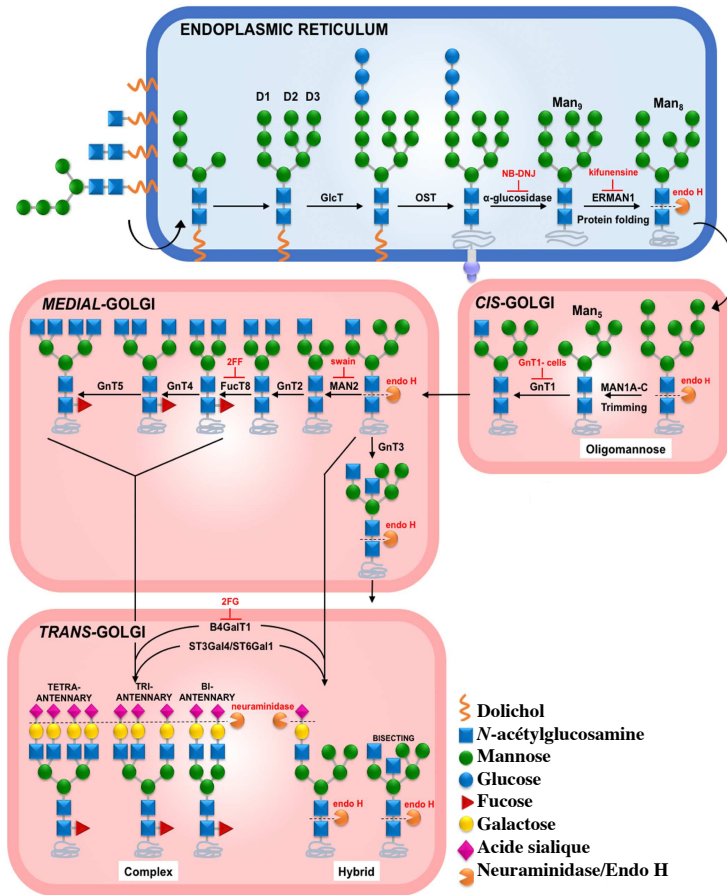


Figure 12 : La N-glycosylation

Représentation schématique du processus de *N*-glycosylation débutant par l'ajout de 2 GlcNAc et 5 mannoses à la face externe du réticulum endoplasmique. Après un flip-flop dans la lumière du réticulum endoplasmique, le *N*-glycane est rallongé par différentes glycosyltransférases. L'allongement du glycane se poursuit dans les différents compartiments de l'appareil de Golgi. D'après (Crooks et al. 2018).

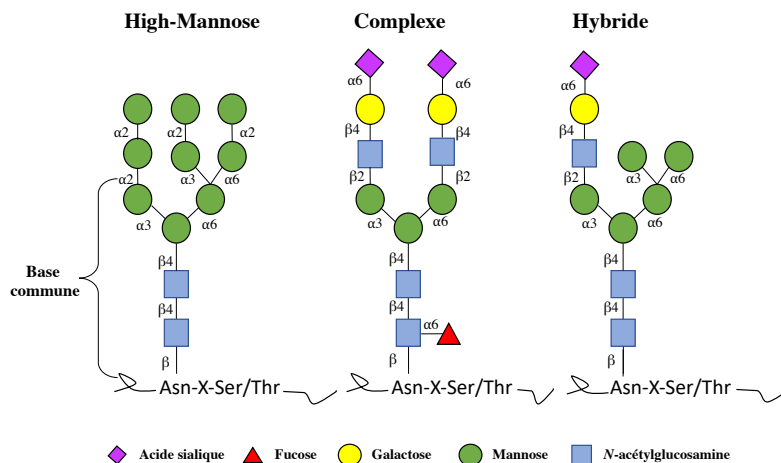


Figure 13 : Les différents types de *N*-glycans

Il existe trois types de *N*-glycans tous composés d'une base pentasaccharidique commune faite de deux *N*-acetylglucosamines et trois mannoses.

On trouve les *N*-glycans de types High-mannose, complexe et hybride. D'après Higuel et al. 2016.

II.1.3. La *N*-glycosylation

La *N*-glycosylation se caractérise par l'addition d'un ose lié de façon covalente sur l'azote d'une asparagine appartenant à une séquence consensus, identifiée dans 96,5% comme étant « Asn-X-Ser/Thr » (X pouvant être n'importe quel acide aminé sauf la proline). Cette séquence peut être, dans 1,3% des cas, Asn-X-Cys. Il a été montré que ce site pouvait contenir d'autres résidus comme la valine ou encore la glycine, aussi dans 2,2% des cas aucune de ces 2 séquences n'est utilisée mais plutôt Asn-Gly ou Asn-X-Val (Zielinska et al. 2010). D'autres variantes de cette séquence ont été identifiées. Par exemple chez *C. elegans*, cette séquence peut être étendue à Asn-X-Ser/Thr-X (X pouvant être n'importe quel acide aminé sauf la proline) (Kaji et al. 2007). Cette séquence consensus est nécessaire mais pas suffisante, une séquence protéique possédant ce motif sera potentiellement *N*-glycosylable.

Cette *N*-glycosylation débute dans le réticulum endoplasmique (RE) par l'ajout en bloc d'un précurseur glycanique composé de 14 sucres (GlcNAc₂Man₉Glc₃). Ces 14 sucres sont tout d'abord assemblés sur un précurseur lipidique, le dolichol, un lipide poly-isoprénoïde ancré dans la membrane du réticulum endoplasmique. Après transfert sur l'asparagine, certains sucres seront retirés par l'action successive de différentes glycosidases et d'autres ajoutés par des glycosyltransférases golgiennes (Figure 12) (Vasconcelos-dos-Santos et al. 2015). Chaque *N*-glycane conserve une structure commune composée de deux *N*-acétylglucosamines et trois mannoses. Trois principaux types de *N*-glycanes résultent de ces processus : les *N*-glycanes de type High-Mannose, de type complexe et de type hybride (Figure 13) (Higel et al. 2016).

Les *N*-glycanes ne sont pas spécifiques des protéines, en effet il a récemment été montré que des *N*-glycanes pouvaient être portés par des ARNs (Flynn et al. 2021), appelé alors « glycoARN ». Ces derniers appartiennent à la famille des petits ARN non codants et sont présents à la surface des cellules de mammifères (Flynn et al. 2021).

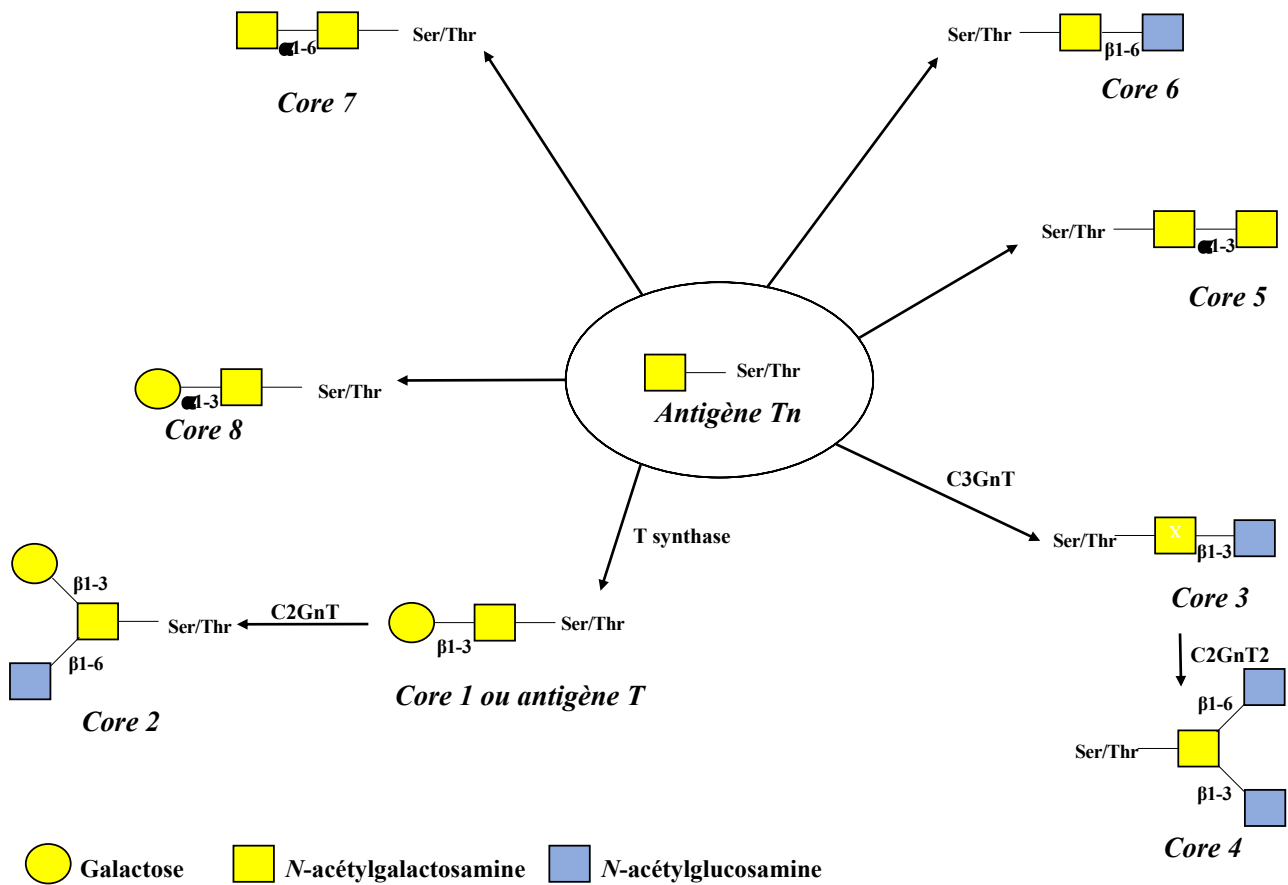


Figure 14 : Synthèse des différents cores *O*-glycaniques, à partir de l'antigène Tn

À partir de l'antigène Tn, on peut obtenir 8 cores glycaniques différents, qui seront à l'origine de structures glycaniques plus complexes. D'après Brockhausen et al. 2009.

II.1.4. La *O*-glycosylation

Ce type de glycosylation est caractérisé par l'ajout d'un ose sur une sérine ou thréonine principalement sur des protéines sécrétées ou membranaires. Historiquement, le terme *O*-glycosylation était utilisé pour désigner l'ajout d'un *O*-GalNAc sur une sérine ou thréonine. Mais les connaissances sur cette modification ont permis d'identifier d'autres sucres ajoutés en première position comme le mannose (Man), le fucose (Fuc), le glucose (Glc), le galactose (Gal), le *N*-acétylglucosamine (GlcNAc) ou encore le xylose (Xyl) (Wells and Feizi 2019). La *O*-glycosylation se manifeste en particulier sur des mucines, de longues protéines fortement glycosylées qui entrent principalement dans la composition des mucus. La *O*-glycosylation de type mucine débute généralement par le transfert d'un *O*-GalNAc (Vasconcelos-dos-Santos et al. 2015), formant l'antigène Tn (Thomsen-nouvelle). Cet *O*-GalNAc peut être rallongé par différents sucres et former différents « cores » c'est à dire des noyaux glycaniques qui seront à la base de structures plus complexes. Il existe 8 cores *O*-glycaniques tous synthétisés à partir de l'antigène Tn (Figure 14) (Brockhausen, Schachter, and Stanley 2009).

Ces *O*-glycanes peuvent par la suite être rallongés par d'autres oses, on retrouve souvent en structures terminales des fucoses (greffés par des fucosyltransférases) et des acides sialiques (greffés par des sialyltransférases) (Bennett et al. 2012); ces deux types de glycosylations seront abordés ultérieurement. Les *O*-glycanes, en particulier lorsqu'ils sont portés par les mucines, jouent un rôle dans la conformation de la protéine sur laquelle ils sont greffés. Suivant la taille et l'encombrement stérique de ces *O*-glycanes, la protéine adoptera une conformation différente. Ils peuvent également protéger la protéine d'une dégradation par les protéases (Brockhausen, Schachter, and Stanley 2009).

Un type particulier de *O*-glycosylation est la *O*-GlcNAcylation cytosolique caractérisée par l'ajout réversible d'un *N*-acétylglucosamine unique sur un peptide. Découverte par le professeur Gerald H. Hart il y a plus de 37 ans (Torres and Hart 1984), cette modification n'affecte que

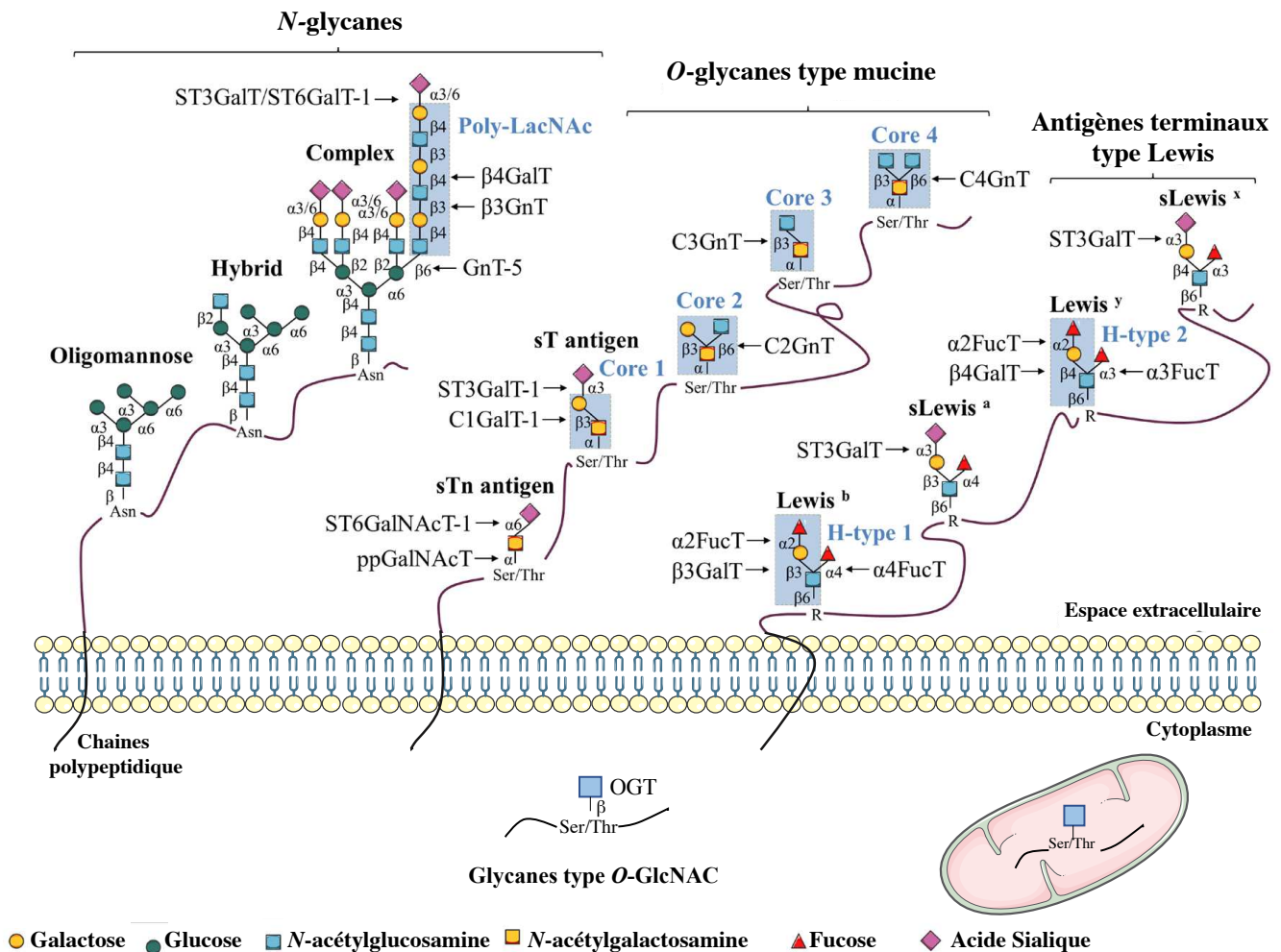


Figure 15 : Les différents types de glycosylations

Représentation schématique des structures types *N*-glycans, *O*-glycans, des structures terminales types Lewis et de la *O*-GlcNAcylation. Les glycosyltransférases responsables de l'ajout des sucres sont indiquées. La *N*-glycosylation débute par l'ajout d'un *N*-acetylglucosamine sur une asparagine. La *O*-glycosylation de type mucine donne différents cores *O*-glycaniques débutant par un *N*-acetylgalactosamine sur une sérine ou thréonine. La *O*-GlcNAcylation est caractérisée par l'ajout d'un *N*-acetylglucosamine sur une sérine ou thréonine mais principalement sur des protéines cytoplasmiques, mitochondriales ou nucléaires. D'après Very et al. 2017.

des protéines cytoplasmiques, nucléaires et mitochondriales, contrairement aux autres types de glycosylations qui se produisent principalement sur des protéines sécrétées et membranaires. Le *O*-GlcNAc est greffé à partir de UDP-GlcNAc par une *O*-GlcNAc transférase (OGT) et peut être retiré grâce à l'action d'une *O*-GlcNAcase. La *O*-GlcNAcylation est impliquée dans la régulation de la transcription, puisque plusieurs facteurs de transcription sont *O*-GlcNAcylés comme NFATc1 (Nuclear Factor Activated T cells 1) et NFκB (Nuclear Factor kappa B) (Figure 15). Cette modification est également impliquée dans la traduction, le trafic intracellulaire, la transduction du signal ou encore la dégradation protéasomale (Yang and Qian 2017)

II.2. *O*-fucosylation médiée par POFUT1

II.2.1. Structure de la protéine POFUT1

Le fucose est le seul sucre de série L utilisé par les cellules de mammifères, il peut être en position terminale de *N*-, *O*-glycanes ou glycolipides, modifier le core glycanique des *N*-glycanes ou encore être greffé directement sur une sérine ou thréonine. La fucosylation est assurée par 13 fucosyltransférases chez l'Homme, utilisant le GDP-fucose comme substrat donneur. La *O*-fucosylation est un type particulier de *O*-glycosylation réalisée uniquement par deux enzymes : POFUT1 (FUT12) et POFUT2 (FUT13). Ces deux enzymes utilisent le GDP-fucose comme substrat donneur pour greffer un fucose sur un substrat accepteur.

POFUT1 est une *O*-fucosyltransférase résidente du RE et capable de transférer un *O*-fucose sur une sérine ou une thréonine de domaines EGF-like (Epidermal Growth Factor like). L'acide aminé cible est présent dans une séquence consensus de *O*-fucosylation : C²-X₁₋₄-S/T-C³, où C² et C³ sont respectivement la seconde et la troisième cystéines des domaines EGF-like.

POFUT2 est également résidente du RE et greffe un *O*-fucose sur une sérine ou une thréonine de domaines TSR (Trombospondin Repeat) (Hofsteenge et al. 2001). Il existe deux types de domaines TSR (type 1 et type 2) possédant chacun 3 ponts disulfures mais entre différentes

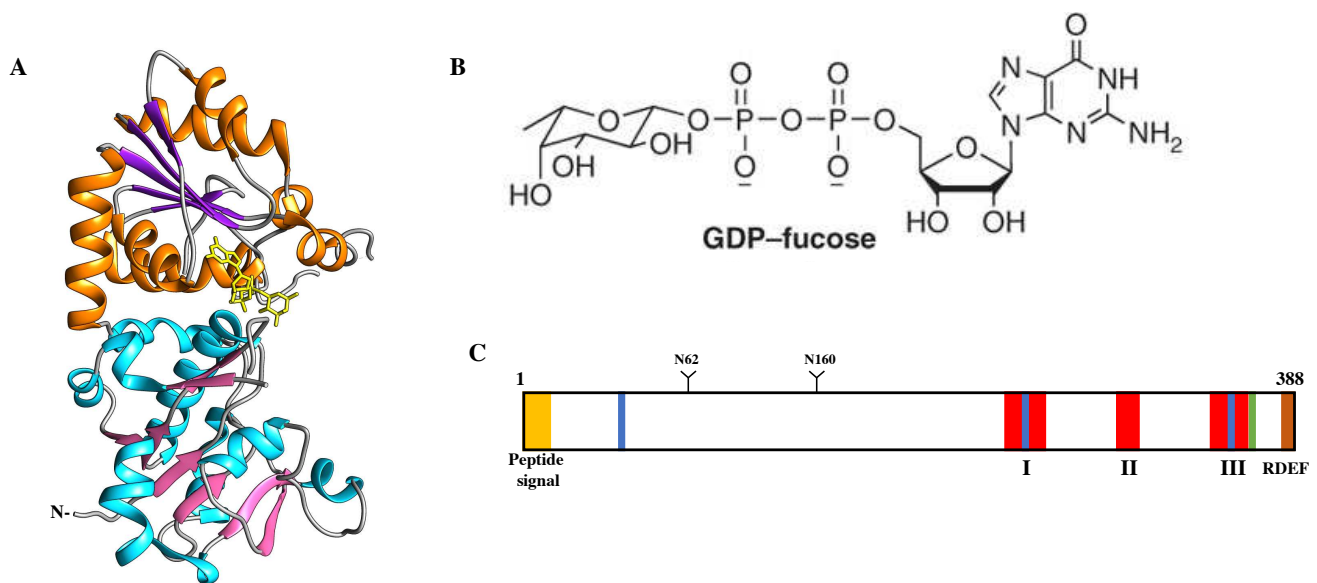


Figure 16 : Structure de l'enzyme POFUT1 humaine

(A) Structure 3D de l'enzyme POFUT1 humaine cristallisée avec le GDP-fucose (en jaune) (numéro PDB : 5UXH). Les hélices α (en bleu) et les brins β (en rose) composant le feuillet β du domaine *N*-terminal, et les hélices α (en orange) et les brins β (en violet) composant le feuillet β du domaine *C*-terminal, forment les deux domaines de Rossman. Ces deux domaines forment une cavité dans laquelle le GDP-fucose peut venir se loger. (B) Structure chimique du GDP-fucose utilisé par les cellules de mammifères, aussi appelé GDP-L-fucose. (C) Structure linéaire de POFUT1 humaine, avec un peptide signal (en jaune), 3 motifs de liaison au GDP-fucose (en bleu), un domaine KDEL-like de rétention au réticulum endoplasmique (en marron), 3 domaines peptidiques conservés entre les fucosyltransférases (en rouge), un court domaine DxD (en vert) et deux sites de *N*-glycosylation (N62 et N160).

cystéines (Leonhard-Melief and Haltiwanger 2010). L'acide aminé receveur est présent dans une séquence consensus qui diffère selon le type de domaine TSR : C¹-X-X-S/T-C² pour les types 1, C²-X-X-S/T-C³ pour les types 2 (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017). La suite de cette étude portera uniquement sur POFUT1.

La protéine *O*-fucosyltransférase de type 1 humaine est codée par le gène *POFUT1* long de 30778 pb, situé sur le bras long du chromosome 20 en q11.21. Un épissage alternatif génère cinq transcrits pour ce gène (base de données Ensembl.org). Le premier transcrit code une protéine de 388 acides aminés qui est la forme fonctionnelle de l'enzyme. Le second transcrit code pour une protéine de 194 acides aminés, tronquée en *C*-terminal, et dont la fonction n'est pas encore connue (Gerhard et al. 2004). Les trois autres transcrits ne codent aucune protéine. POFUT1 a été purifiée pour la première fois en 1998 à partir de cellules CHO (Wang and Spellman 1998), mais n'a été cristallisée qu'en 2011 par l'équipe de Lira-Navarrete, chez *Caenorhabditis elegans* (*CePOFUT1*) (Lira-Navarrete et al. 2011). *CePOFUT1* présente 41% d'homologie avec la protéine présente chez les eucaryotes supérieurs. Un modèle 3D pour la protéine humaine a été proposé en 2017 par l'équipe américaine de McMillan (McMillan et al. 2017). La protéine POFUT1 est composée de deux domaines, un domaine *N*- et un domaine *C*-terminal. Le domaine *N*-terminal contient 9 hélices α et 8 brins β . Le domaine *C*-terminal contient 10 hélices α et 5 brins β . Chacun de ces domaines adopte un repliement Rossman composé d'un feuillet β entouré d'hélices α de part et d'autre. Ces deux domaines de Rossman forment une cavité dans laquelle le substrat accepteur pourra venir se loger (Figure 16A et 16B). Cette conformation est conservée entre les espèces (Lira-Navarrete et al. 2011).

La protéine POFUT1 est organisée en plusieurs domaines peptidiques : un peptide signal d'adressage au réticulum endoplasmique, trois domaines de fixations à son substrat donneur le GDP-fucose, deux sites de *N*-glycosylations (N62 et N160) et une séquence terminale KDEL-like de rétention au RE. Elle possède également un court domaine peptidique DxD, important

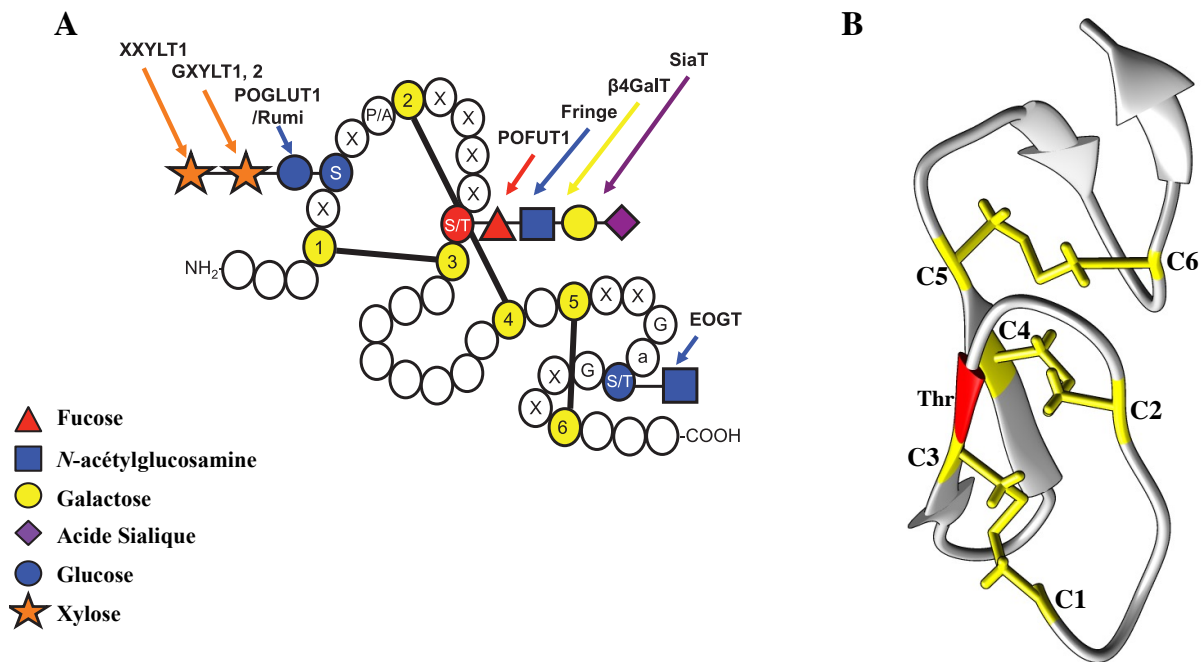


Figure 17 : Motif EGF-like

(A) Les motifs hEGF-like sont composés d'une quarantaine d'acides aminés reliés par trois ponts disulfures. Ils peuvent être modifiés par trois enzymes : POGLUT1, POFUT1 et EOGT. La O-fucosylation se produit sur une sérine ou thréonine contenue dans une séquence consensus C²-X₁₋₄-S/T-C³, où C² et C³ sont respectivement les deuxième et troisième cystéines du domaine EGF. D'après Schneider et al. 2017. (B) Modélisation du motif EGF-like 26 de NOTCH murin, avec les six cystéines formant trois ponts disulfures (en jaune) et la thréonine (en rouge) recevant le O-fucose. Numéro PDB : 5KY4. D'après Li et al. 2017.

pour son activité catalytique (Loriol et al. 2007), ainsi que 3 domaines peptidiques (I, II et III) communs aux α 1,2 et α 1,6 fucosyltransférases, et impliqués dans la reconnaissance du substrat accepteur (motif I) et dans la reconnaissance et la liaison au substrat donneur (motifs II et III) (Martinez-Duncker et al. 2003)(Mollicone et al. 2009) (Figure 16C). Les deux sites de *N*-glycosylations (N62 et N160 chez l'Homme) sont essentiels pour la protéine POFUT1 de mammifère. Le premier site de *N*-glycosylation, très conservé chez les bilatériens, se trouve dans une région très conservée de l'enzyme. Le second site se situe dans une zone moins conservée de l'enzyme et n'est pas présent chez toutes les espèces. Pour preuve, la drosophile ne possède qu'un seul site de *N*-glycosylation (N60), alors qu'aucun site n'est présent chez *Ce*POFUT1 (Loriol et al. 2006)(Loriol et al. 2007).

Une étude de la forme bovine de POFUT1 a démontré que le premier site de *N*-glycosylation était essentiel pour la solubilité de l'enzyme. Le remplacement de l'asparagine 65 (N62 chez l'Homme) par une leucine induit une agrégation de la protéine bovine dans le RE. Alors que le remplacement du second site de *N*-glycosylation n'entraîne qu'une légère diminution de l'activité *O*-fucosyltransférase (Loriol et al. 2007).

II.2.2. *O*-fucosylation des motifs EGF-like

Décrit pour la première fois en 1972 au sein de la protéine EGF elle-même (Savage, Inagami, and Cohen 1972), les motifs EGF-like sont composés d'une quarantaine d'acides aminés dont six cystéines formant trois ponts disulfures (Figure 17) (Campbell and Bork 1993). Il s'avère que de nombreuses protéines sont porteuses de motifs EGF-like. Les domaines EGFs peuvent être classés en 4 types : human EGF (hEGF), complément C1r-like (cEGF), laminine EGF (lamEGF) et intégrine like EGF (intEGF) (Wouters et al. 2005). Les domaines hEGF et cEGF possèdent trois ponts disulfures (Figure 17B), tandis que les domaines lamEGF et intEGF en possèdent quatre, et diffèrent légèrement par leur structure 3D.

Tableau 5 : Liste des protéines cibles de POFUT1

La présence d'un *O*-fucose a été démontrée pour 14 protéines (orange et bleu), mais le rôle du *O*-fucose dans la fonction biologique de la protéine n'a été démontrée que pour 2 protéines (en orange). D'après Schneider et al. 2017 et Pennarubia et al. 2020.

Gène	Protéine	Gène	Protéine
AGRIN	Agrin	LTBP2	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 2
ATRAID	All-trans retinoic acid-induced differentiation	MEGF6	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 6
CELSR1	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1	MEGF8	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 8
CELSR2	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 2	MEGF10	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 10
CELSR3	Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3	MEGF11	Multiple epidermal growth factor-like domains protein 11
CD93	Complement component C1q receptor	MMRN1	Multimerin-1
CD97	CD97 antigen	NCAN	Neurocan core protein
CFC1	Cryptic protein	NELL1	Protein kinase C-binding protein NELL1
CFC1B	Cryptic family protein 1B	NID2	Nidogen-2
CNTNAP5	Contactin-associated protein-like 5	NOTCH1	Neurogenic locus notch homolog protein 1
CRB1	Protein crumbs homolog 1	NOTCH2	Neurogenic locus notch homolog protein 2
CRB2	Protein crumbs homolog 2	NOTCH2NL	Notch homolog 2 N-terminal-like protein
CSPG2	Versican core protein	NOTCH3	Neurogenic locus notch homolog protein 3
CUBN	Cubilin	NOTCH4	Neurogenic locus notch homolog protein 4
DLK1	Protein delta homolog 1	PEAR1	Platelet endothelial aggregation receptor 1
DLK2	Protein delta homolog 2	PGBM	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein
DLL1	Delta-like protein 1	PGCB	Brevican core protein
DLL3	Delta-like protein 3	PROC	Vitamin K-dependent protein C
DLL4	Delta-like protein 4	PROZ	Vitamin K-dependent protein Z
DNER	Delta and Notch-like epidermal growth factor-related receptor	RAMP	Regeneration-associated muscle protease homolog
EDIL3	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3	RELN	Reelin
EGF	Pro-epidermal growth factor	SLIT1	Slit homolog 1 protein
EGFL7	Epidermal growth factor-like protein 7	SLIT2	Slit homolog 2 protein
EGFLAM	Pikachurin	SLIT3	Slit homolog 3 protein
EMR1	Adhesion G protein-couplet receptor E1	SNED1	Sushi, nidogen and EGF-like domain-containing protein 1
EMR2	Adhesion G protein-couplet receptor E2	SREC2	Scavenger receptor class F member 2
EYS	Protein eyes shut homolog	STAB1	Stabilin-1
FA7	Coagulation factor VII	STAB2	Stabilin-2
FA9	Coagulation factor IX	SUSD1	Sushi domain-containing protein 1
FA12	Coagulation factor XII	SVEP1	Polydom protein
FAT1	Protocadherin Fat 1	TEN1	Teneurin-1
FAT2	Protocadherin Fat 2	TEN2	Teneurin-2
FAT3	Protocadherin Fat 3	TEN4	Teneurin-4
FAT4	Protocadherin Fat 4	TIE1	Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1
FBLN1	Fibulin-1	TPA	Tissue-type plasminogen activator
FBLN7	Fibulin-7	TSP3	Thrombospondin-3
FBN2	Fibrillin-2	UMOD	Uromodulin
FBN3	Fibrillin-3	UMODL1	Uromodulin-like 1
HABP2	Hyaluronan-binding protein 2	UROK	Urokinase-type plasminogen activator
HGFAC	Hepatocyte growth factor activator	VASN	Vasorin
JAG1	Protein Jagged-1	VWDE	von Willebrand factor D and EGF domain-containing protein
JAG2	Protein Jagged-2	VWA2	AMACO
LRP1	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	WIF1	Wnt inhibitory factor 1
LRP1B	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B		

Les motifs hEGF-like peuvent être modifiés par trois *O*-glycosyltransférases : POGLUT (Protéine *O*-glucosyltransférase), EOGT (EGF spécifique *O*-GlcNAc transférase) et POFUT1. Ces sucres pourront par la suite être rallongés par l'action d'autres glycosyltransférases (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017).

La *O*-fucosylation de ces motifs EGF-like par POFUT1 a été très étudiée. De ce fait, nous connaissons précisément les résidus de la protéine POFUT1 interagissant avec les motifs hEGF like. En 2017, Li et al ont travaillé sur l'interaction entre POFUT1 murin et différents motifs EGFs. Le motif EGF accepteur prend place dans la cavité formée par les deux domaines de Rossman de la protéine POFUT1. Il s'avère que quatre résidus de POFUT1 sont très importants et en contact direct avec le motif EGF, ils forment des liaisons hydrogènes avec les motifs EGF-like, ce sont : l'asparagine 151, la glycine 47, l'asparagine 51 et la méthionine 46. Le résidu X₃ de la séquence de *O*-fucosylation C²-X₁₋₄-S/T-C³, est très important pour l'interaction entre POFUT1 et le motif EGF-like. En effet, suivant la nature de ce résidu l'interaction entre POFUT1 et le motif EGF-like peut varier. Le clash stérique sera plus ou moins important selon la chaîne latérale de ce résidu. Le plus souvent c'est une glycine (sans chaîne latérale) que l'on retrouve, mais on peut y trouver un acide aspartique, comme c'est le cas pour l'EGF 12 de NOTCH, difficile à *O*-fucosyler *in vitro* (Zhijie Li et al. 2017)(Pennarubia et al. 2018).

La liste des protéines humaines cibles potentielles de POFUT1 est courte (87 protéines) (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017). Cette liste est basée sur la présence de motifs EGF-like possédant la séquence consensus de *O*-fucosylation reconnue par POFUT1. La présence d'un *O*-fucose a été confirmée pour 14 protéines. L'implication du *O*-fucose dans l'activité biologique de ces protéines n'a été démontrée que pour 2 d'entre elles : l'Agrine et NOTCH1 (Tableau 5). La *O*-fucosylation de l'agrine est impliquée dans son activité synaptogénique d'agrégation des récepteurs acétylcholine (AChRs) (Kim et al. 2008), l'absence d'un *O*-fucose sur l'agrine entraîne un gain de fonction de cette dernière et favorise l'agrégation

des récepteurs AChR.

Les conséquences de la *O*-fucosylation sur le récepteur NOTCH sont connues et seront abordées ultérieurement.

On connaît des cas où l'enzyme POFUT1 est mutée. Une altération de l'expression de cette enzyme est associée à une pathologie en particulier, la maladie de Dowling-Degos (DDD), une genodermatose autosomique dominante se traduisant par une hyperpigmentation de la peau. Des mutations non-sens hétérozygotes de POFUT1 ont également été identifiées dans une famille atteinte de cette pathologie (Chen et al. 2014)(Li et al. 2013). Un KO de *pofut1* chez le poisson zèbre produit une hypopigmentation de la queue du poisson ainsi qu'une répartition anormale de la mélanine (Li et al. 2013), le KD de *POFUT1* dans une lignée de kératinocytes humains provoque également une diminution d'expression du gène de la kératine *KRT5* (Li et al. 2013), laissant penser que POFUT1 est impliquée dans la synthèse et le transport de la mélanine. Récemment, une mutation faux-sens de POFUT1 a été retrouvée à l'état homozygote (S162L) chez un patient présentant de graves défauts de développement, notamment un retard de croissance, un retard global de développement, des défauts cardiaques et vasculaires, une hypotonie, ainsi qu'une insuffisance hépatique légère (Takeuchi et al. 2018). La *O*-fucosylation de motifs EGF-like par POFUT1 semble impliquée dans des processus importants tels que la cardiogenèse et la vasculogenèse. On connaît les effets de ces mutations de POFUT1 sur l'organisme, on ne connaît cependant pas sur quelles protéines cibles ces formes mutées agissent.

La protéine POFUT1 aurait également une activité de protéine chaperonne. En effet, chez la drosophile, OFUT1 (équivalent de POFUT1 chez les mammifères) se lie au récepteur NOTCH et, indépendamment de son activité de *O*-fucosyltransférase, permet le repliement correct du récepteur ainsi qu'un adressage normal (Okajima et al. 2005) (Vasudevan and Haltiwanger 2014). Cette activité chaperonne sur le récepteur NOTCH n'a cependant pas été identifiée dans

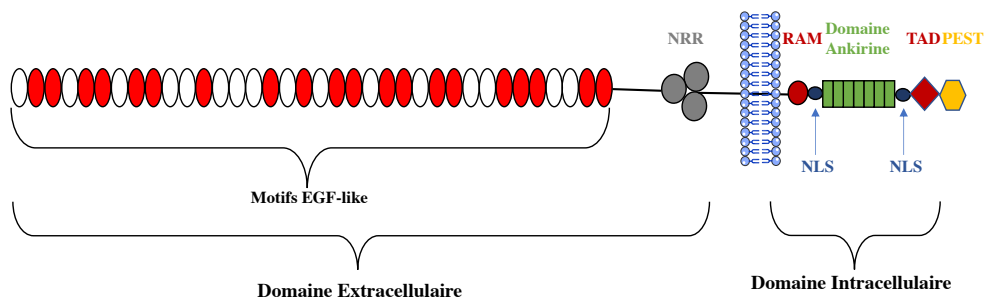


Figure 18 : Représentation schématique des différents domaines du récepteur Notch

La partie extracellulaire du récepteur NOTCH est composée de 36 domaines EGF, suivie en C-terminal par trois répétitions LNR et un domaine d'hétérodimérisation (masqué par les LNR) formant le domaine NRR. Certains de ces domaines EGF-like possèdent la séquence de *O*-fucosylation reconnue par POFUT1 (rouge). La partie intracellulaire du récepteur NOTCH est constituée de plusieurs domaines régulateurs : le domaine RAM, immédiatement suivi par un domaine de localisation nucléaire et 7 répétitions Ankirine (domaine Ankirine) et un second domaine de localisation nucléaire, suivi par le domaine TAD et la séquence PEST. D'après Rana & Haltiwanger, 2011.

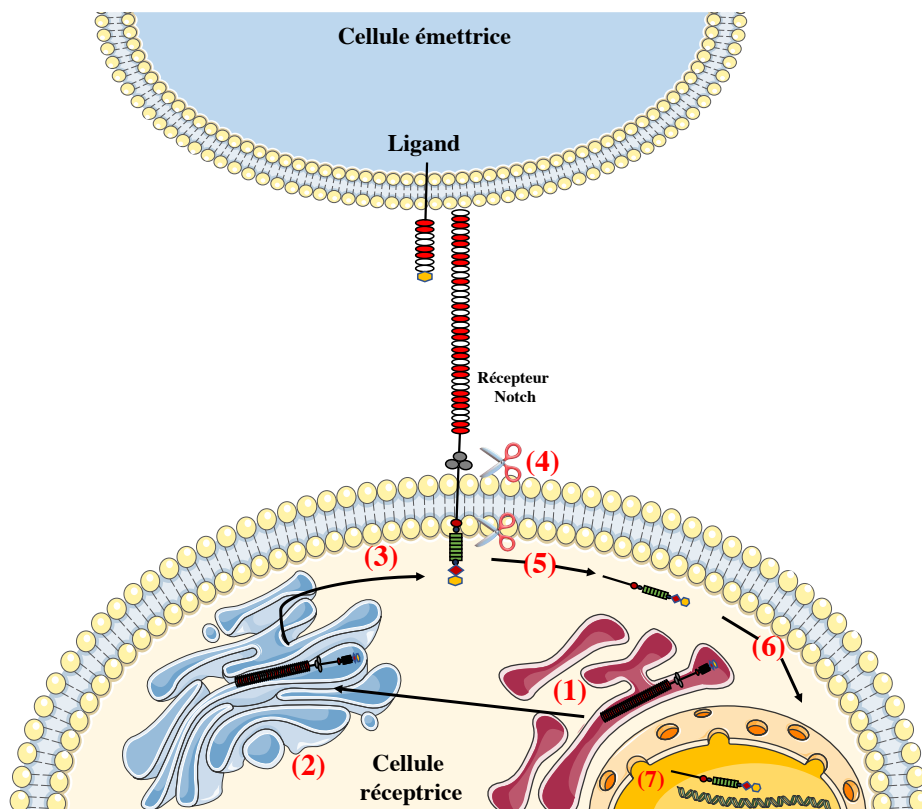


Figure 19 : Schématisation de la voie d'activation de Notch

(1) Le récepteur NOTCH est *O*-fucosylé et *O*-glucosylé dans le réticulum endoplasmique, puis il passe dans l'appareil de Golgi pour être rallongé par d'autres glycosyltransférases (2). Le récepteur est également clivé dans le Golgi par une protéase furine-like générant le récepteur mature hétérodimérique adressé à la membrane plasmique (3). Après interaction entre le récepteur et un ligand porté par une cellule émettrice, la partie extracellulaire du récepteur change de conformation et expose le site reconnu par la protéase ADAM à l'interface de la membrane plasmique (4). Un second clivage est réalisé par une gamma-sécrétase dans la membrane libérant la partie intracellulaire du récepteur (5). Le NICD libéré peut être transporté jusqu'au noyau (6) où il jouera son rôle de facteur de transcription (7). D'après Rana & Haltiwanger, 2011.

des cellules de mammifères (Stahl et al. 2008).

II.2.3. Conséquence sur la voie NOTCH

La cible la plus connue et la plus étudiée de POFUT1 est la famille des récepteurs NOTCH. Composée de quatre membres chez l'Homme (NOTCH 1-4), ces récepteurs transmembranaires se composent d'une partie extracellulaire (ECD), suivie par trois répétitions LNR (Lin12/Notch) et d'un domaine d'hétérodimérisation. Les répétitions LNR et le domaine d'hétérodimérisation forment la région régulatrice négative (NRR). La partie intracellulaire du récepteur (NICD) est composée de différents domaines, le domaine RAM (Regulation of Amino-acid Metabolism), suivi immédiatement par une séquence de localisation nucléaire (NLS), un domaine Ankirine (7 répétitions), une seconde séquence NLS, un domaine d'activation transcriptionnelle (TAD) et enfin une séquence PEST (Pro, Glu, Ser, Thr) impliquée dans le turnover de la partie intracellulaire (Rana and Haltiwanger 2011) (Figure 18). Il existe deux familles de ligands pour le récepteur NOTCH, la famille Delta-like (Dll1, 3 et 4) et la famille Jagged (JAG1 et 2). Après interaction entre le récepteur NOTCH de la cellule réceptrice et le ligand approprié porté par une cellule émettrice, la partie intracellulaire du récepteur NOTCH (NICD) est clivée, libérée elle forme un complexe avec RBP-Jk afin de jouer le rôle de facteur de transcription et d'activer les gènes cibles de NOTCH (Figure 19).

La *O*-fucosylation du récepteur NOTCH est très importante pour sa fonction. Un KO de *pofut1* chez la souris est létal dès le stade embryonnaire (Okamura and Saga 2008). Ces embryons KO pour *pofut1* présentent le même phénotype que des embryons KO pour *RBP-Jk* (Oka et al. 1995), essentiel pour le fonctionnement normal de la voie NOTCH. La partie extracellulaire du récepteur NOTCH est constituée de 36 domaines EGF-like (base de données UniprotKB). Sur ces 36 motifs EGF-like, 20 possèdent la séquence consensus de *O*-fucosylation reconnue par POFUT1 (Figure 18). Suivant les motifs EGF-like de NOTCH1 *O*-fucosylés, les conséquences

sur la signalisation NOTCH seront différentes.

Parmi ces motifs, trois sont toujours *O*-fucosylés, il s'agit des motifs EGF 12, 26 et 27. Par mutagenèse dirigée, Rampal et al, ont montré que lorsque les motifs 12 et 27 étaient mutés (incapables de recevoir un *O*-fucose), il en résulte une perte totale d'interaction avec les ligands Jagged1 et Delta1. Cependant, lorsque le motif EGF 26 est muté, l'absence de *O*-fucose a pour conséquence d'augmenter d'un facteur 4 l'activité de NOTCH due à la liaison du ligand Jagged1, et d'un facteur deux l'activité due à la liaison du ligand Delta1 (Rampal et al. 2005). Les mêmes expériences de mutagenèse dirigée mais cette fois-ci avec des motifs EGF dont la *O*-fucosylation est moins conservée (EGFs 9, 16, 20, 24 et 30) ne conduisent à aucun changement d'activité de la voie NOTCH à la suite de sa liaison à Jagged1 ou Delta1 (Rampal et al. 2005). Les *O*-fucoses greffés par POFUT1 peuvent être rallongés notamment par l'enzyme Fringe (Lunatic, Radical et Manic). L'ajout de ce *N*-acétylglucosamine par Fringe module également l'activité de NOTCH (Brückner et al. 2000)(Moloney et al. 2000). Le rallongement du *O*-fucose sur la thréonine 466 de l'EGF12 de NOTCH par Lunatic Fringe augmente l'affinité des ligands Jagged 1 et Delta1 pour les récepteurs NOTCH (Taylor et al. 2014). La présence d'un disaccharide GlcNAc β 1-3Fuc-*O*-Thr/Ser, due à l'action de Fringe, altère la liaison des ligands aux récepteurs NOTCH, le rallongement de ce glycane et l'obtention du trisaccharide Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Fuc-*O*-Thr/Ser est nécessaire pour observer l'effet de Fringe sur la signalisation NOTCH (Chen, Moloney, and Stanley 2001)(Rana and Haltiwanger 2011). Le *O*-fucose peut donc être rallongé jusqu'à obtenir un tétrasaccharide se terminant par un acide sialique : Sia α 2-3/6Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Fuc-*O*-Thr/Ser, (Chen, Moloney, and Stanley 2001)(Harris et al. 1993)(Holdener and Haltiwanger 2019)(Figure 17).

Tableau 6 : Liste des 20 gènes de sialyltransférases humaines

D'après Harduin-Lepers et al. 2012.

Famille	Gènes des Sialyltransférases	Localisation dans le génome	Type de substrats accepteurs de l'enzyme correspondante
ST3GAL	<i>ST3GAL1</i>	8q24.22	O-glycoprotéines Glycolipides
	<i>ST3GAL2</i>	16q22.1	O-glycoprotéines Glycolipides
	<i>ST3GAL3</i>	1p34.1	Glycoprotéines
	<i>ST3GAL4</i>	11q24.2	Glycoprotéines Glycolipides
	<i>ST3GAL5</i>	2p11.2	Glycolipides
	<i>ST3GAL6</i>	3q12.1	Glycoprotéines Glycolipides
ST6GAL	<i>ST6GAL1</i>	3q27.3	N-glycoprotéines
	<i>ST6GAL2</i>	2q12.3	N-glycoprotéines
ST6GALNAC	<i>ST6GALNAC1</i>	17q25.1	O-glycoprotéines
	<i>ST6GALNAC2</i>	17q25.1	O-glycoprotéines
	<i>ST6GALNAC3</i>	1p31.1	O-glycoprotéines Glycolipides
	<i>ST6GALNAC4</i>	9q34.11	O-glycoprotéines Glycolipides
	<i>ST6GALNAC5</i>	1p31.1	Glycoprotéines Glycolipides
	<i>ST6GALNAC6</i>	9q34.11	Glycolipides
ST8Sia	<i>ST8SIA1</i>	12p12.1	Glycolipides
	<i>ST8SIA2</i>	15q26.1	Glycoprotéines
	<i>ST8SIA3</i>	18q21.31	Glycoprotéines Glycolipides
	<i>ST8SIA4</i>	5q21.1	Glycoprotéines
	<i>ST8SIA5</i>	18q21.1	Glycolipides
	<i>ST8SIA6</i>	10p12.33	O-glycoprotéines

II.3. La sialylation

II.3.1. Les différentes familles de sialyltransférases

La sialylation est assurée par une classe particulière de glycosyltransférases : les sialyltransférases. On distingue quatre familles de sialyltransférases classées selon le type de liaison et le sucre sur lequel sera transféré l'acide sialique.

Tout d'abord la famille des ST3GAL qui transfère un acide sialique en alpha 2-3 sur un galactose (Gillespie, Kelm, and Paulson 1992). Elle est composée de six membres (ST3GAL1 à ST3GAL6).

On trouve ensuite la famille des ST6GAL, capable de transférer un acide sialique en alpha 2-6 sur un galactose (Paulson and Colley 1989), composée de deux membres ST6GAL1 et ST6GAL2.

La famille des ST6GALNAC peut transférer un acide sialique en alpha 2-6 sur un GalNAC (Kurosawa et al. 1994), composée de six membres (ST6GALNAC1 à ST6GALNAC6).

Et enfin la famille des ST8Sia capable de transférer un acide sialique en alpha 2-8 sur un acide sialique préalablement greffé (Kojima et al. 1995), composée de six membres (ST8Sial1 à ST8Sial6).

Les gènes de sialyltransférases sont spécifiques et se situent sur des chromosomes différents (Tableau 6). La famille des *ST6GALNAC* est la seule à avoir un schéma particulier, puisque chaque gène de *ST6GALNAC* est associé à un autre sur un chromosome (*ST6GALNAC1* est associé à *ST6GALNAC2* sur le chromosome 17, *ST6GALNAC3* est associé à *ST6GALNAC5* sur le chromosome 1 et *ST6GALNAC4* et *ST6GALNAC6* sont situés sur le chromosome 9). Cette répartition génomique particulière suggère que chaque paire de gènes provient d'un gène ancestral commun dupliqué en tandem. Les autres gènes de sialyltransférases partagent également un gène ancestral dupliqué, mais par des événements de translocation ces gènes se sont répartis sur différents chromosomes (Harduin-Lepers et al. 2005)(Takashima 2008).

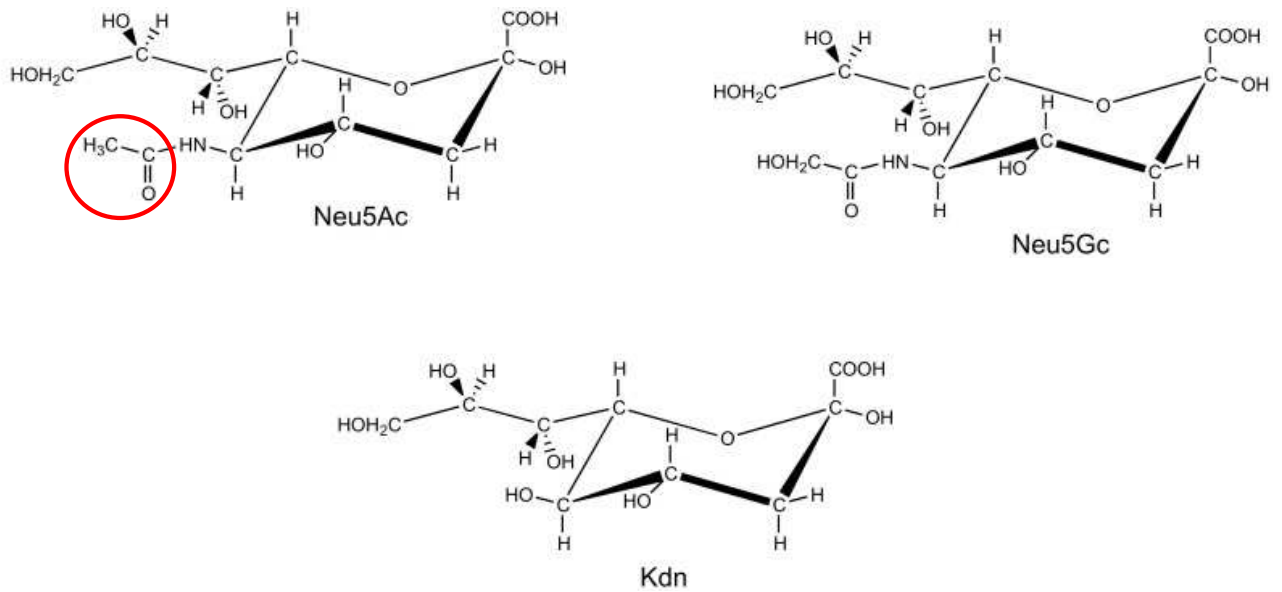


Figure 20 : Structure chimique des principaux types d'acide sialique

L'Homme utilise majoritairement le Neu5Ac caractérisé par un groupement acétyl sur le carbone 5 (cerclé en rouge). Apporté par l'alimentation on retrouve le Neu5Gc, l'Homme étant incapable de le synthétiser. Le Kdn est la forme utilisée chez les vertébrés inférieurs. D'après Schauer et al. 2018.

Les sialyltransférases ont la capacité de transférer un acide sialique sur des substrats accepteurs spécifiques, qui peuvent être des *N*-glycoprotéines, des *O*-glycoprotéines et/ou des glycolipides (Tableau 6) (Harduin-Lepers et al. 2012)(Harduin-Lepers et al. 2001). Certaines sialyltransférases ont les mêmes types de substrats accepteurs, c'est le cas de ST3GAL1 et ST3GAL2, toutes deux peuvent transférer un acide sialique en α 2-3 sur des *O*-glycoprotéines et des glycolipides, cependant ST3GAL1 sera plus affine pour les *O*-glycoprotéines alors que ST3GAL2 sera plus affine pour les glycolipides (Lee et al. 1994)(Kojima et al. 1994)(Kono et al. 1997)(Lehmann et al. 2008).

Chez l'Homme, l'acide sialique principalement utilisé par les sialyltransférases est l'acide *N*-acétylneuraminique (Neu5Ac) (Figure 20), porteur d'un groupement acétyle sur son carbone 5, moins fréquemment on trouve de l'acide *N*-glycolylneuraminique (Neu5Gc), porteur d'un groupement hydroxy-acétyl sur son carbone 5, provenant de l'alimentation, puisque l'Homme est incapable de le synthétiser (Tangvoranuntakul et al. 2003)(Schauer and Kamerling 2018). Chez les vertébrés inférieurs c'est le Kdn qui est majoritairement utilisé, avec un groupement hydroxyle sur le carbone 5. Pour être actif, le Neu5Ac doit être lié à un nucléotide, l'acide sialique est le seul sucre à être associé à un nucléotide monophosphate donnant le CMP-Neu5Ac.

II.3.2. Structure des sialyltransférases

Les sialyltransférases appartiennent à la famille CAZy GT29 et sont des protéines golgiennes transmembranaires de type 2, c'est à dire que l'extrémité *N*-terminale se situe dans le cytoplasme. Elles possèdent donc une courte queue cytoplasmique *N*-terminale, un domaine transmembranaire, une région tige de longueur variable selon la protéine et une région catalytique en *C*-terminal. Toutes les sialyltransférases partagent des séquences peptidiques que

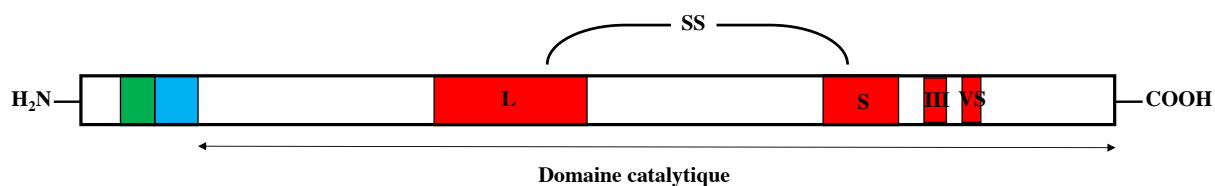


Figure 21 : Structure linéaire d'une sialyltransférase

Représentation schématique d'une sialyltransférase de mammifère, avec une courte queue cytoplasmique en *N*-terminal (en blanc), un domaine transmembranaire (en vert), une région tige (en bleu) et le domaine catalytique. Ce domaine catalytique contient les quatre sialylmotifs (en rouge), et le pont disulfure entre les sialylmotifs L et S. D'après Datta et al. 2009.

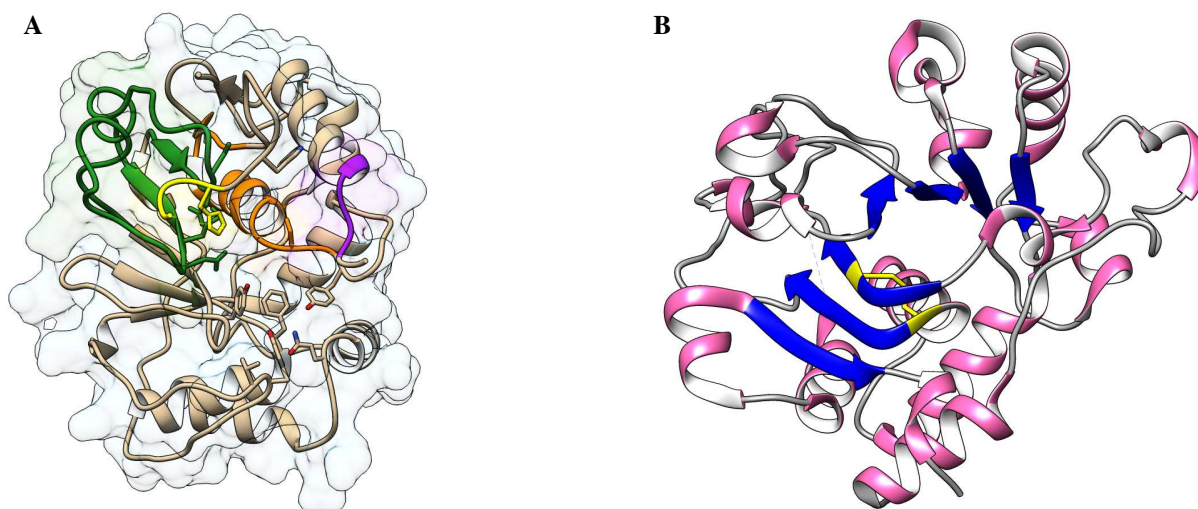


Figure 22 : Structure 3D des sialyltransférases

(A) Modélisation de ST3GAL1 de porc (Numéro PDB : 2WNB) présentant 83% d'homologie avec ST3GAL1 humaine. Les quatre sialylmotifs sont visualisables : sialylmotif L en vert, sialylmotif S en orange, sialylmotif III en jaune et sialylmotif VS en violet. D'après Rao et al, 2009. (B) Structure 3D de ST6GAL1 humaine (Numéro PDB : 6QVS) avec les sept brins β formant le feuillet β (en bleu), et les hélices α (en rose) l'entourant. Les deux cystéines formant un pont disulfure entre les sialylmotifs L et S sont montrées en jaune.

l'on appelle sialylmotifs (Harduin-Lepers et al. 2001). On en décompte quatre : L (Large), S (Small) (Livingston and Paulson 1993)(Drickamer 1993), III (Jeanneau et al. 2004), et VS (Very Small) (Geremia, Harduin-Lepers, and Delannoy 1997) (Figure 21 et 22).

Des études par mutagenèse dirigée ont permis d'identifier le rôle de chaque sialylmotif. Le sialylmotif L est impliqué dans la fixation au substrat donneur, le CMP-Neu5Ac; alors que le sialylmotif S est impliqué dans la fixation des substrats donneur et accepteur (Datta and Paulson 1995)(Datta 2009)(Datta, Sinha, and Paulson 1998). Les motifs III et VS, quant à eux, sont impliqués dans la liaison au substrat accepteur (Jeanneau et al. 2004).

Dans le sialylmotif L, parmi les résidus invariants on retrouve une cystéine. On retrouve également une cystéine dans le sialylmotif S. Il a été montré par mutagenèse dirigée sur ST6GAL1 que ces deux cystéines forment un pont disulfure qui rapprochent les motifs L et S. La forme mutée est alors inactive et retenue dans le réticulum endoplasmique. Le pont disulfure entre ces deux motifs est donc essentiel pour sa localisation golgienne et son activité (Datta, Chammas, and Paulson 2001).

Les quatre familles de sialyltransférases partagent une structure commune. Chaque sialyltransférase est organisée en domaines de Rossman composés chacun de sept brins β formant un feuillet entouré d'un nombre variable d'hélices α (Rao et al. 2009)(Kuhn et al. 2013)(Volkers et al. 2015)(Ortiz-Soto et al. 2019) (Figure 22).

Comme de nombreuses protéines, les sialyltransférases sont elles-mêmes des glycoprotéines et ces glycosylations sont importantes pour leurs activités. En 1992, une étude réalisée sur ST6GAL1 a montré que cette enzyme possède deux *N*-glycanes. En utilisant des *N*-glycanases, il a été démontré que l'enzyme dépourvue de ces *N*-glycanes était inactive *in vitro* comparée à l'enzyme native (Fast, Jamieson, and McCaffrey 1993).

ST6GALNAC2 possède trois sites de *N*-glycosylations, mais leurs fonctions ne sont pas encore connues (Moremen et al. 2018). La structure de ST8SIA3 a été déterminée en 2015, et elle

possède aussi des sites de *N*-glycosylations (Volkers et al. 2015). Une autre sialyltransférase, ST3GAL2, contient deux sites de *N*-glycosylations (Asn92 et Asn211), très conservés chez les mammifères. Des traitements à la tunicamycine, un inhibiteur de la *N*-glycosylation, ont montré que sans ses *N*-glycanes l'enzyme ST3GAL2 était retenue dans le réticulum endoplasmique. Des expériences complémentaires ont été réalisées par mutagenèse dirigée en remplaçant l'asparagine par une glutamine. Il en ressort que seule la *N*-glycosylation sur l'asparagine 211 était nécessaire à la bonne localisation de ST3GAL2 (Ruggiero et al. 2015). Les activités enzymatiques ont également été testées en utilisant le glycolipide GM1 comme substrat accepteur, et ont montré que l'enzyme mutée sur l'asparagine 211 ne possédait plus que 47% d'activité comparée à l'enzyme sauvage, alors que le double mutant ne possède plus que 24% d'activité. Une seconde expérience avec l'asialofétuine comme substrat accepteur montre que l'enzyme mutée sur l'asparagine 211 n'arbore plus que 29% d'activité alors que l'activité du double mutant est proche de celle du double mutant précédent. La *N*-glycosylation sur l'asparagine 211 de ST3GAL2 semble donc influencer la reconnaissance de son substrat accepteur (Ruggiero et al. 2015).

II.3.3. Les différentes fonctions de la sialylation

Sialylation et adhérence :

La sialylation se produit essentiellement dans l'appareil de Golgi, elle est considérée comme cruciale dans de nombreux processus biologiques. Les acides sialiques sont chargés négativement et sont essentiels pour les interactions intercellulaires et pour celles entre la cellule et la matrice extracellulaire. Si on prend l'exemple des érythrocytes, ce sont des cellules très sialylées et donc chargées négativement (Varki 2008), tout comme la surface des épithéliums vasculaires (Born and Palinski 1985). Il en résulte une répulsion entre ces charges

négatives, ce qui permet aux érythrocytes de ne pas adhérer à l'endothélium vasculaire et de circuler librement. Il a également été montré que les cellules endothéliales et les cellules plaquettaires expriment à leur surface des protéines ICAM (InterCellular Adhesion Molecule) différemment sialylées. Cette différence de sialylation favorise l'adhésion des cellules endothéliales aux lymphocytes T, comparées aux cellules plaquettaires (Weber, Alon, and Klickstein 2004). Ces données confirment l'aspect anti-adhésion des acides sialiques.

De nombreuses protéines impliquées dans l'adhésion au cours du développement embryonnaire sont sialylées, comme la E-cadhérine, les intégrines ou encore la caténine (Melo-Braga et al. 2014). Une anomalie de sialylation pourrait donc perturber la fixation de ces molécules d'adhésion à leurs récepteurs et interférer dans la transduction du signal associée au développement embryonnaire. La surexpression de *ST6GAL1* dans des cellules cancéreuses ovariennes permet une hypersialylation des *N*-glycanes de l'intégrine $\beta 1$ (Christie et al. 2008), qui améliore l'affinité de cette dernière pour les composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène, la fibronectine ou encore la laminine et favorise la motilité et la migration cellulaire (Bhide and Colley 2017). Une telle surexpression se produisant au cours du processus embryonnaire aurait un rôle crucial dans le développement.

Sialylation et développement cérébral :

La sialylation est également impliquée dans le développement du système nerveux. En effet, en comparaison avec d'autres tissus, les acides sialiques sont très abondants dans les membranes des cellules neurales (Svennerholm et al. 1989). Une des protéines les plus sialylées est la NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule). Cette glycoprotéine est polysialylée, c'est à dire qu'elle possède un homopolymère d'acides sialiques liés en $\alpha 2-8$. D'autres protéines neurales sont polysialylées comme la molécule d'adhésion cellulaire synaptique de type 1, la neuropilin-2, ou encore la sous-unité $\alpha 5$ de l'intégrine. La polysialylation des NCAM

représente environ 30% de leur masse moléculaire chez des rats nouveaux nés, alors que chez des rats âgés de 28 jours, elle ne représente plus que 4% (Margolis and Margolis 1983). Plusieurs études démontrent que le lait maternel humain est une source riche en acides sialiques (Wang et al. 2001)(Wang 2012). Les taux d'acides sialiques sont élevés dans le colostrum et décroissent au fur et à mesure de la lactation. Les préparations pour nourrissons à base de lait de vache sont beaucoup moins riches en acides sialiques. Une source exogène riche en acides sialiques chez les nouveau-nés, comme le lait maternel, contribuerait de manière significative à la sialylation de gangliosides cérébraux et de glycoprotéines, indispensables aux interactions cellulaires, à la croissance neuronale et à la connectivité synaptique (Morgan and Winick 1980) (Wang et al. 2001). En effet, des acides sialiques apportés soit par l'alimentation soit par injection chez des rats nouveau-nés sont incorporés aux gangliosides/glycoprotéines cérébraux et participent au développement cérébral (Morgan and Winick 1980).

Des études ont démontré que des porcelets nourris avec une source riche en acides sialiques avaient une augmentation significative d'acides sialiques dans le cortex frontal et dans l'hypothalamus, mais surtout qu'ils montraient des capacités d'apprentissage supérieures à des porcelets nourris avec une alimentation pauvre en acides sialiques (Wang 2012).

Sialylation et réponse immunitaire :

Les acides sialiques sont également très importants dans la réponse immunitaire. En effet, des souris KD pour *st6gal1* se développent normalement mais sont immunodéficientes. La protéine de surface CD22, présente exclusivement à la surface des lymphocytes B, est essentielle à leur activation. CD22 est porteuse du trisaccharide Sia6LacNAc, dont l'acide sialique terminal est greffé par ST6GAL1. Ces souris dépourvues de la forme sialylée du LacNAc présentent des niveaux réduits d'IgM, et de lymphocytes B (Hennet et al. 1998). Toutes ces données démontrent l'importance de la sialylation pour l'organisme.

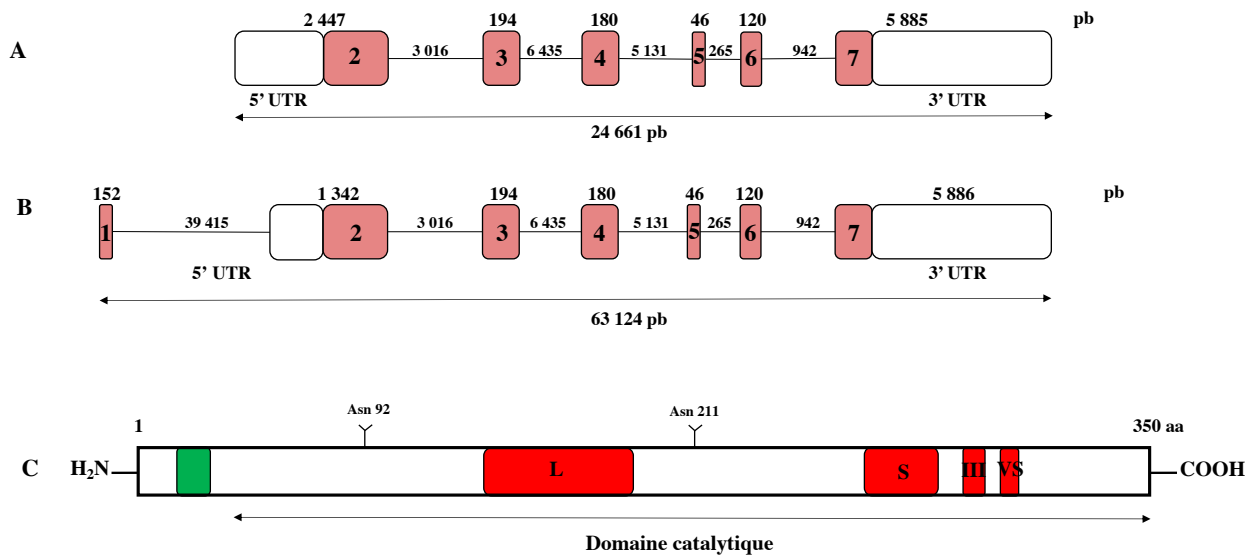


Figure 23 : Organisation du gène codant *ST3GAL2*

(A)(B) Schématisation des deux transcrits de *ST3GAL2*. Chaque transcrite contient 6 exons codants (rectangles colorés), dont la taille en paires de bases (pb) est inscrite au-dessus. Le second transcrite (B) contient un septième exon non codant dans la région 5'-UTR. D'après la base de données Ensembl.org.

(C) Ces deux transcrits codent une protéine fonctionnelle de 350 acides aminés (aa). Comme toutes les sialyltransférases, *ST3GAL2* est composée d'une courte queue cytoplasmique en N-terminal, d'un domaine transmembranaire (en vert) et des quatre sialylmotifs (en rouge). *ST3GAL2* possède également deux sites de N-glycosylations. D'après Ruggiero et al. 2015.

II.4. α 2-3 sialylation médiée par ST3GAL2

II.4.1. Structure de ST3GAL2

Cette enzyme de la famille des ST3GAL a été purifiée pour la première fois en 1994 à partir de tissu cérébral de rat (Lee et al. 1994). Il faut attendre 1997 pour que la forme humaine de l'enzyme soit clonée à partir de cellules lymphoblastoïdes d'une lignée cellulaire CCL-119 par une équipe française (Giordanengo et al. 1997). Elle est codée par le gène *ST3GAL2* (63260 pb) situé sur le chromosome 16, en q22.1, composé de six exons codants. Un épissage alternatif donne six transcrits (base de données ensembl.org). Les deux premiers transcrits codent une protéine fonctionnelle de 350 acides aminés (Figure 23). La différence entre ces deux transcrits réside dans la partie non codante 5'-UTR où l'on trouve un septième exon pour le second transcrit. Les quatre autres transcrits ne possèdent pas d'exons codants et ne donnent donc aucune protéine (base de données Ensembl.org).

II.4.2. Gangliosides et α 2-3 sialylation

Les glycosphingolipides (GSL) sont des structures glycaniques complexes portées par des céramides et reliées par une liaison β -glycosidique (D'Angelo et al. 2013). La synthèse des GSL débute par la synthèse d'un céramide à la membrane du réticulum endoplasmique à partir de son précurseur, la sphinganine (Russo et al. 2018), qui pourra par la suite être convertie en galactosylcéramide (GalCer) dans le RE ou en glucosylcéramide (GlcCer) dans le cis-Golgi (Russo et al. 2018)(Maccioni, Quiroga, and Ferrari 2011). Les GSL GlcCer sont les plus répandus et les plus étudiés. Un galactose est ajouté en β 4 sur ce GlcCer et forme un lactosylcéramide (LacCer), base de toutes les séries GSL. Les glycosphingolipides GlcCer peuvent se diviser en sept catégories (ou séries) : ganglio-, lacto-, neolacto-, globo-, isoglobo-, molly- et arthro-series.

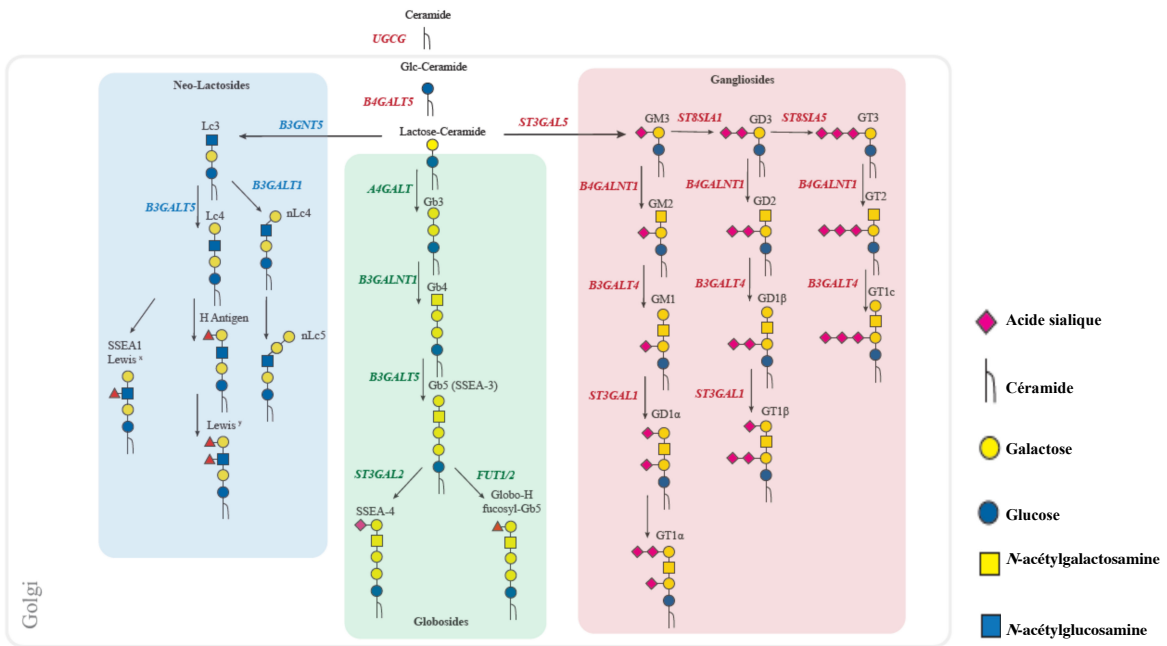


Figure 24 : Voie de synthèse des glycosphingolipides

Le céramide est glucosylé dans le cis-Golgi, puis galactosylé pour former un lactosylcéramide. À partir de ce LacCer on distingue 3 séries de glycosphingolipides chez les vertébrés : les neolactosides (en bleu), les globosides (en vert) et les gangliosides (en rouge). D'après Cumin et al. 2021.

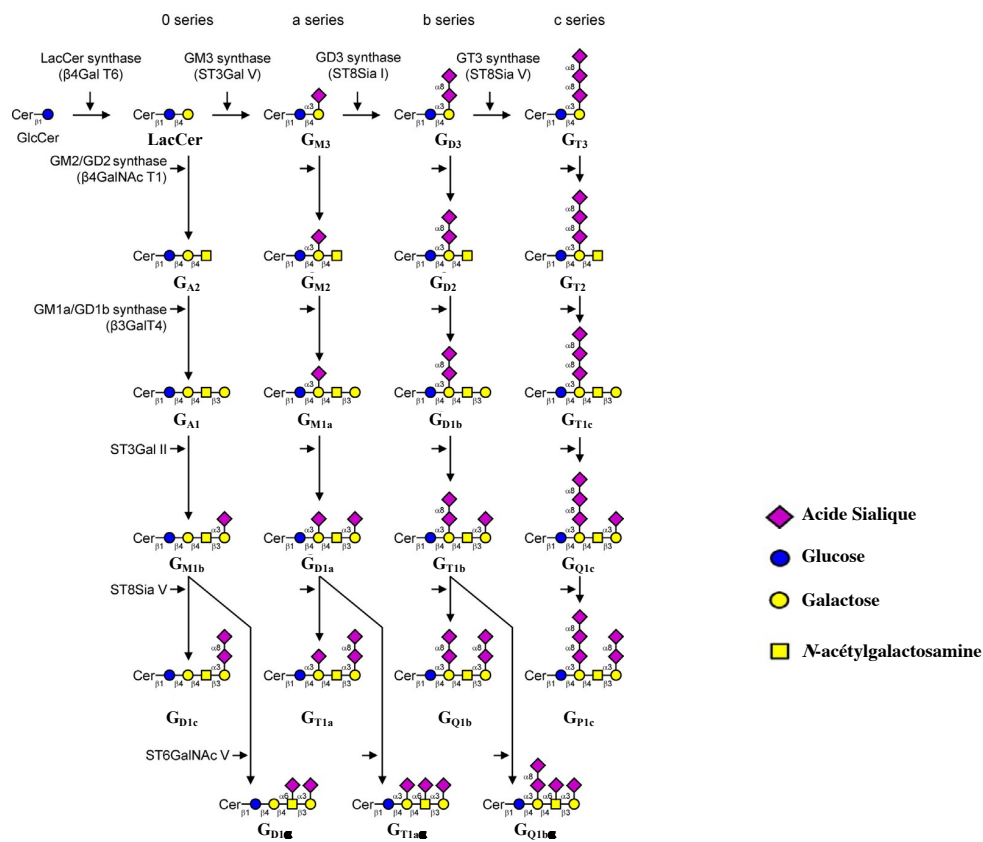


Figure 25 : Voie de synthèse détaillée des gangliosides

Synthèse des différents gangliosides, débutant par la synthèse d'un LacCer. Par ajouts successifs de différents oses, on obtient les différents gangliosides nommés selon le nombre et la position des acides sialiques. D'après Groux-Degroote et al. 2017.

Chez les vertébrés sont principalement décrits les gangliosides, globosides et neolactosides (Figure 24) (Cumin et al. 2021).

Les gangliosides constituent donc une classe particulière de GSL caractérisés par la présence d'un à cinq acides sialiques. La nomenclature des gangliosides fait référence au nombre et à la position des acides sialiques présents. Ainsi on obtient une nomenclature en 0, M, D, T, Q et P pour le nombre d'acides sialiques présents (de 0 à 5), et en a, b et c (pour un, deux ou trois acides sialiques présents sur un galactose interne). De plus, les gangliosides de série α sont caractérisés par la présence d'un acide sialique sur un *N*-acétylgalactosamine interne (Groux-Degroote, Guérardel, and Delannoy 2017).

ST3GAL2 est impliquée dans la synthèse des gangliosides et est responsable de la formation directe des gangliosides GM1b, GD1a, GT1b et GQ1c, et participe à la formation de GD1c, GT1a, GQ1b, GP1c, GD1 α , GT1 α et GQ1b α (Figure 25). Ces gangliosides sont impliqués dans de nombreux processus biologiques. Par exemple le ganglioside GD1a. Il a été montré que GD1a favorisait la prolifération des fibroblastes humains et la différenciation des ostéoblastes en activant la voie de l'EGFR (Liu, Li, and Ladisch 2004)(Kim et al. 2016). On sait également que les cellules interstitielles expriment GD1a pendant la maturation ovarienne murine (Choo et al. 1995). Kim et al, en 2016 ont réalisé une étude en utilisant un modèle de maturation d'embryons de porc *in vitro*. Ils ont démontré qu'un traitement exogène avec GD1a favorisait la qualité et le développement des blastocystes aux stades précoces du développement embryonnaire. Ils ont également montré que l'expression de *ST3GAL2* augmente significativement au cours de ce processus embryonnaire (Kim et al. 2016). GM1b, quant à lui, serait un récepteur du virus de la grippe (Suzuki et al. 1985).

ST3GAL2 est spécifiquement impliquée dans la synthèse d'un globoside : SSEA-4 (Stage-Specific Embryonic Antigen 4), aussi appelé Monosialyl globopentaosylceramide (MSGb5) (Saito et al. 2003). ST3GAL2 greffe en acide sialique sur le ganglioside SSEA-3 (ou Gb5) pour

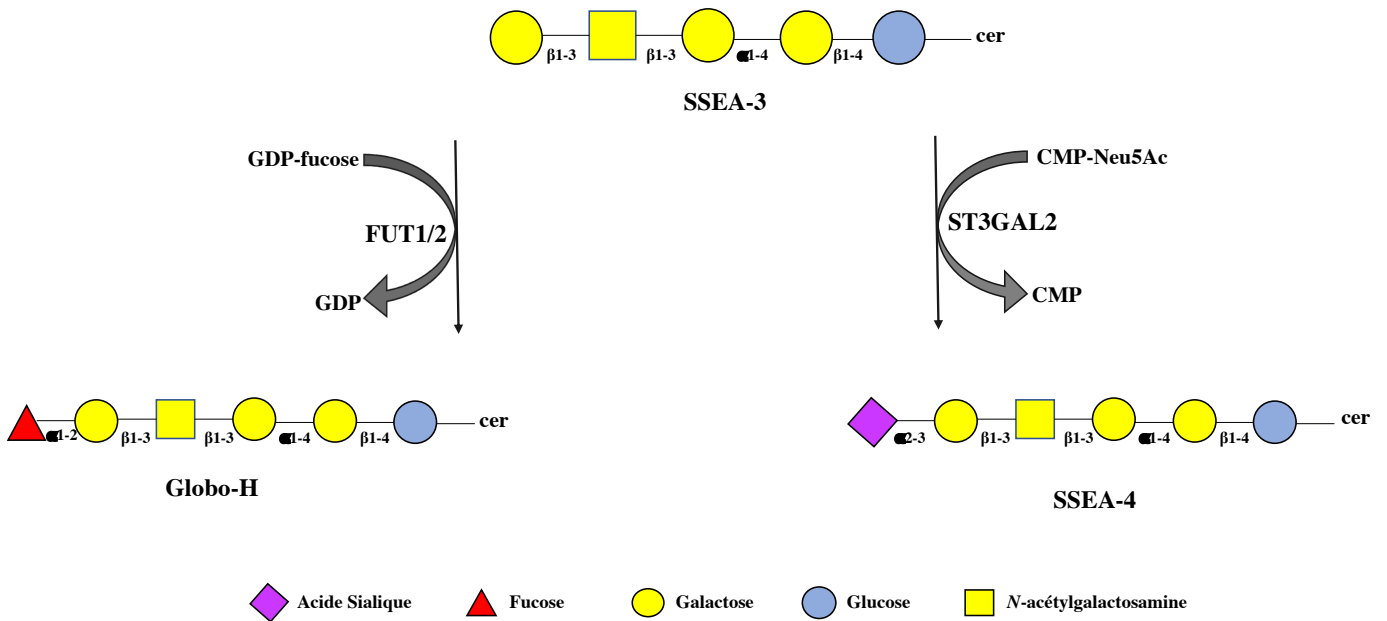


Figure 26 : Voie de synthèse des GSLs de la série globo

Le globoside SSEA-3 (Gb5) est le précurseur de deux autres globosides : SSEA-4 (MSGb5) synthétisé par ajout d'un acide sialique en α 2-3 par ST3GAL2, et globo-H (fucosyl-Gb5) synthétisé par ajout d'un fucose en α 1-2 par FUT1/2.

Disaccharide type

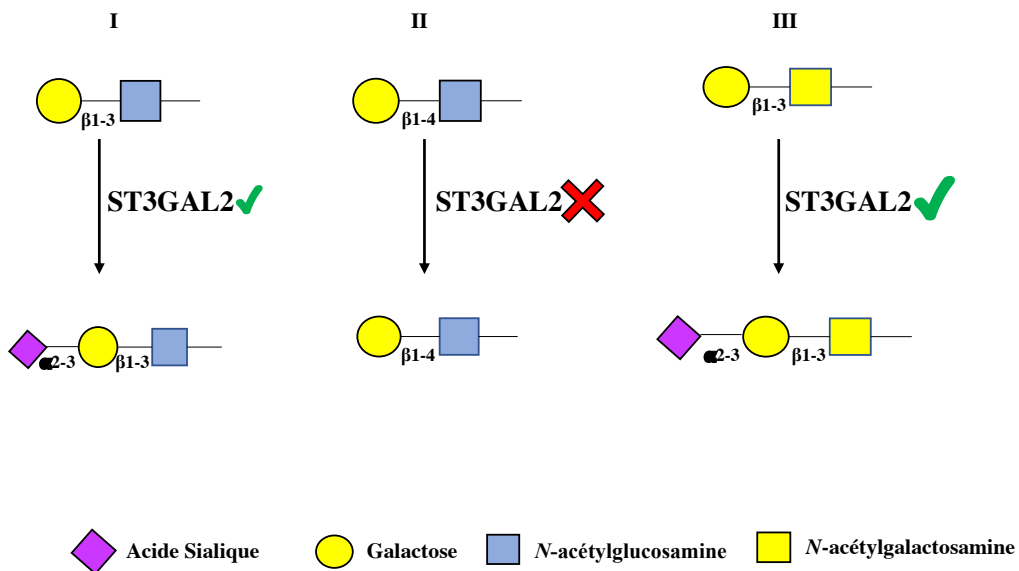


Figure 27 : Substrats de ST3GAL2

ST3GAL2 a différents types de substrats. Elle est très affine pour les structures de type III, beaucoup moins pour des structures de type I, et pas du tout pour des structures de type II.

donner SSEA-4. SSEA-3 peut également être fucosylé par FUT1 ou FUT2 pour donner le globoside globo-H (ou fucosylGb5) (Figure 26). SSEA-4 a été initialement étudié dans les tissus embryonnaires (Fenderson, Eddy, and Hakomori 1990), et dans des cas de carcinomes rénaux (Saito et al. 1997). Aujourd'hui SSEA-4 est considéré comme un marqueur des cellules souches cancéreuses (CSC) (Nakamura et al. 2019) et associé à de nombreux cancers tels que les glioblastomes (Lou et al. 2014), le cancer oral (Noto et al. 2013) ou encore le cancer du sein (Aloia et al. 2015).

II.4.3. Activité de ST3GAL2

Substrats receveurs :

ST3GAL2 est la seule sialyltransférase capable de réaliser une sialylation réversible. Elle a la capacité, comme toutes les sialyltransférases, de transférer un acide sialique sur une cible (protéique ou lipidique) à partir du CMP-Neu5Ac. Elle peut également synthétiser du CMP-Neu5Ac en transférant cet acide sialique à partir d'une sous-unité NeuAc, α 2-3Gal, β 1-3GalNAc sur une molécule de 5'-CMP. Le CMP-Neu5Ac nouvellement formé, pourra de nouveau être utilisé par d'autres sialyltransférases. ST3GAL2 peut également synthétiser de l'UMP-Neu5Ac, mais qui ne sera que très peu utilisé par les sialyltransférases (Chandrasekaran et al. 2008). ST3GAL2 transfère un acide sialique en α 2-3 sur un galactose présent sur un autre sucre. Le galactose accepteur peut faire partie de trois structures disaccharidiques différentes : il peut être préalablement greffé sur un *N*-acétylglucosamine en β 1-3 (structure de type I) ou sur un *N*-acétylglucosamine en β 1-4 (structure de type II) ou sur un *N*-acétylgalactosamine en β 1-3 (structure de type III). ST3GAL2 a une préférence pour les structures de type III, elle peut dans de rares cas greffer un acide sialique sur des structure de type I, mais jamais elle n'utilisera une structure de type II comme substrat accepteur (Figure 27) (Kono et al. 1997).

Cibles de ST3GAL2 :

Très peu d'études portent sur les cibles protéiques de ST3GAL2. Seules des études *in vitro* ont été réalisées et ont permis d'identifier aussi bien des glycolipides et des glycoprotéines comme substrats pour ST3GAL2, cependant aucune protéine spécifique n'a été identifiée comme portant un acide sialique greffé par ST3GAL2 (Lee et al. 1994) (Kojima et al. 1994)(Kono et al. 1997) (Lehmann et al. 2008).

Un KO de *st3gal2* n'est pas létal chez la souris. Ces souris expriment une quantité beaucoup plus faible des gangliosides cérébraux GD1a et GT1b, et une augmentation des gangliosides GM1 et GD1b, précurseurs de GD1a et GT1b, alors que la proportion de sialylation de protéines cérébrales est inchangée. Des souris doublement KO pour *st3gal1/st3gal2* ont le même profil d'expression des gangliosides cérébraux que les souris KO pour *st3gal2*, confirmant que la synthèse de ces gangliosides implique principalement ST3GAL2 (Sturgill et al. 2012). Une étude plus récente, a démontré que le KO de *st3gal2* chez la souris provoquait une obésité tardive (plus de 3 mois après la naissance) associée à une augmentation de la glycémie et à une résistance à l'insuline (Lopez et al. 2017). Cependant aucune cible précise n'a été identifiée comme étant impliquée dans ces phénomènes.

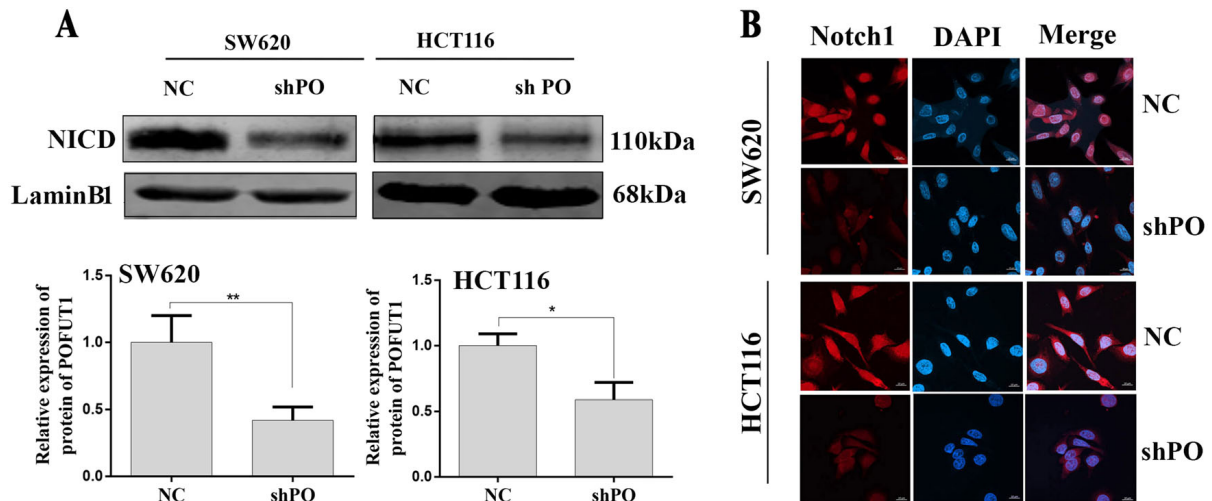


Figure 28 : Le knock-down de *POFUT1* corrèle avec la diminution de la localisation nucléaire du NICD

Le KD de *POFUT1* (shPO) dans les lignées cancéreuses SW620 et HCT116 diminue la localisation nucléaire de la partie intracellulaire du récepteur NOTCH (NICD) comme on peut le voir par western blot (A) et immunofluorescence (B), en comparaison aux cellules contrôles (NC). D'après Du et al. 2018.

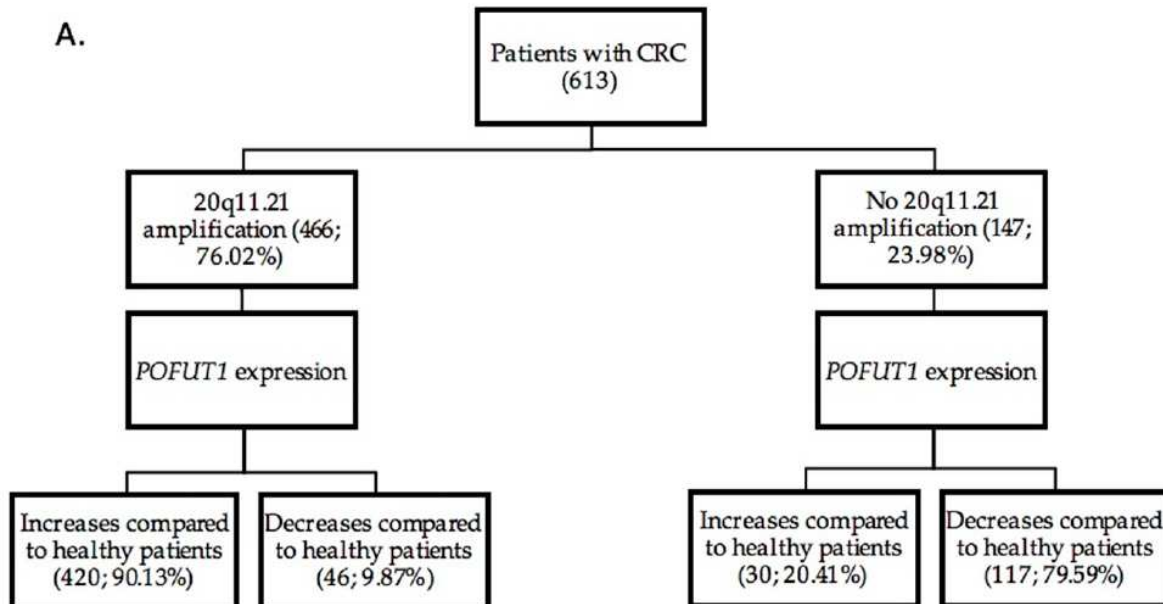


Figure 29 : Analyse de données RNAseq de 613 patients atteints de tumeurs colorectales

L'analyse de la base de données Firebrowse a montré que 76.02% des patients CCR avaient une amplification de la région chromosomique 20q11.21 (région de *POFUT1*). Parmi ces patients, 90.13% présentent une surexpression de *POFUT1* comparée à l'expression de *POFUT1* dans les tissus non cancéreux. D'après Chabanais et al, 2018.

Chapitre III. Implication des altérations de glycosylation dans le contexte tumoral

III.1. POFUT1 et cancer colorectal

Au vu de l'importance de la *O*-fucosylation par POFUT1 décrite dans le chapitre précédent, en particulier pour la signalisation NOTCH, une dérégulation de POFUT1 est souvent associée à des pathologies notamment des cas de cancer.

POFUT1 a été retrouvée surexprimée dans les cancers oraux, gastriques, du sein ou encore hépatiques (Yokota et al. 2013)(Dong et al. 2017)(Wan et al. 2017)(Ma et al. 2016). Dans tous les cas, cette surexpression de *POFUT1* est associée à des tumeurs agressives et un mauvais pronostic.

Dans le cancer colorectal, *POFUT1* est retrouvé surexprimé (d'après les bases de données). En 2018, Du et al (Du et al. 2018), démontrent que *POFUT1* est surexprimé dans les tissus cancéreux colorectaux comparé à des tissus sains. En utilisant des lignées représentant différents stades du CCR, ils ont induit un knock-down de *POFUT1* et ont observé des diminutions significatives de prolifération, migration et invasion cellulaires *in vitro* et *in vivo*. Ils ont également démontré que le KD de *POFUT1* a pour conséquence une diminution de la localisation de la fraction intracellulaire du récepteur NOTCH (NICD) dans le noyau des cellules (Figure 28) (Du et al. 2018). La même année, notre équipe a démontré l'origine de cette surexpression dans les tumeurs colorectales, en utilisant la base de données FireBrowse regroupant les données RNAseq de 623 patients atteints de cancers colorectaux. La surexpression de *POFUT1* est due en grande partie à une amplification de la région chromosomique 20q11.21 qui aboutit à une augmentation du nombre de copies de *POFUT1* (Figure 29) (Chabanais et al. 2018). Chabanais et al. ont également montré une corrélation positive entre la surexpression de *POFUT1* est celle de *NOTCH* dans les tumeurs colorectales. Cela se traduit par une augmentation significative de l'expression de certains gènes cibles de

NOTCH et impliqués dans la régulation du cycle cellulaire comme la *cycline D1* ou des oncogènes comme *c-Myc*, mais aussi par une diminution significative de l'expression de *p21*, régulateur négatif du cycle cellulaire.

Récemment, Komor et al. ont caractérisé d'un point de vue moléculaire des adénomes colorectaux, précurseurs bénins des lésions tumorales. Ils classèrent ces adénomes en HRA (High-Risk Adenoma) et LRA (Low-Risk Adenoma) selon la présence et le nombre d'instabilités microsatellitaires et des CEAs décrits précédemment. Les adénomes HRA sont donc caractérisés par la présence de CEAs, les gènes impliqués dans ces événements participeraient à l'effet observé et seraient donc nécessaires à la progression tumorale (Komor et al. 2020). Or on trouve trois gènes associés au chromosome 20 dans les CEAs : *POFUT1*, *RPRD1B* et *EIF6*. Pour chacun de ces gènes, la quantité protéique associée augmente au fur et à mesure de l'évolution (LRA, HRA puis CCR). Des marquages immunohistochimiques révèlent qu'il n'y a pas de différence significative d'expression d'EIF6 (Eukaryotic translocation Initiation Factor 6) entre tissus sains et des LRA. Il en est de même pour RPRD1B (Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1B), on n'observe pas de différence significative de marquage entre LRA et HRA. À l'inverse, l'expression de POFUT1 augmente graduellement avec les stades (tissus sains, LRA, HRA et CCR) (Komor et al. 2020). POFUT1 joue donc un rôle important dans la transition adénome-carcinome, et peut donc être considéré comme un oncogène.

III.2. Sialylation et cancer

III.2.1. Sialyltransférases et cancers

Étant donné l'importance de la sialylation dans les processus biologiques normaux, il est évident que la dérégulation des sialyltransférases peut jouer un rôle dans des processus

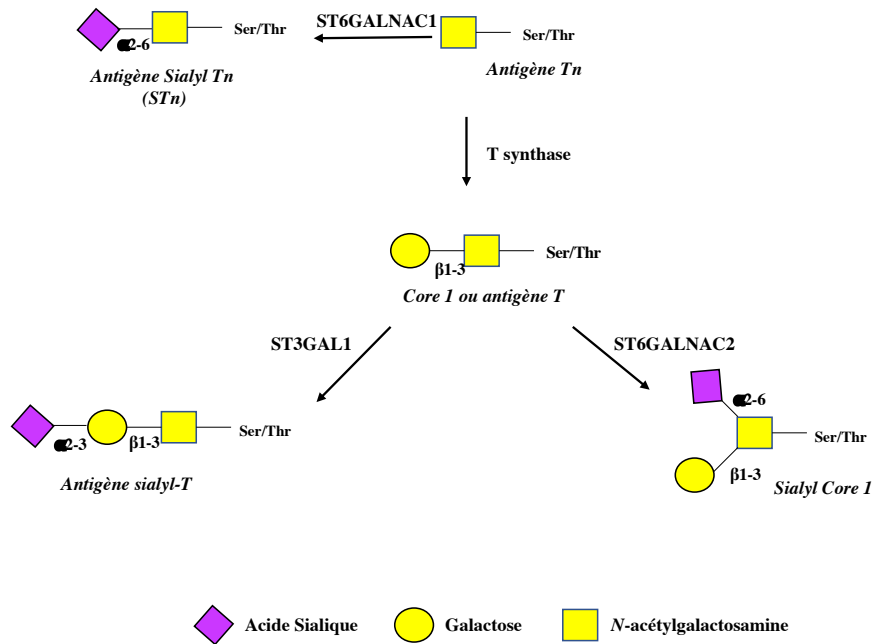


Figure 30 : Synthèse des différents TACAs à partir de l'antigène Tn

L'antigène sialyl Tn (STn) est synthétisé à partir de l'antigène Tn par action de ST6GALNAC1. Après synthèse de l'antigène T, on obtient le sialyl core 1 via l'action de ST6GALNAC2, ou l'antigène sialyl T via sialylation par ST3GAL1. D'après Brockhausen et al. 2009.

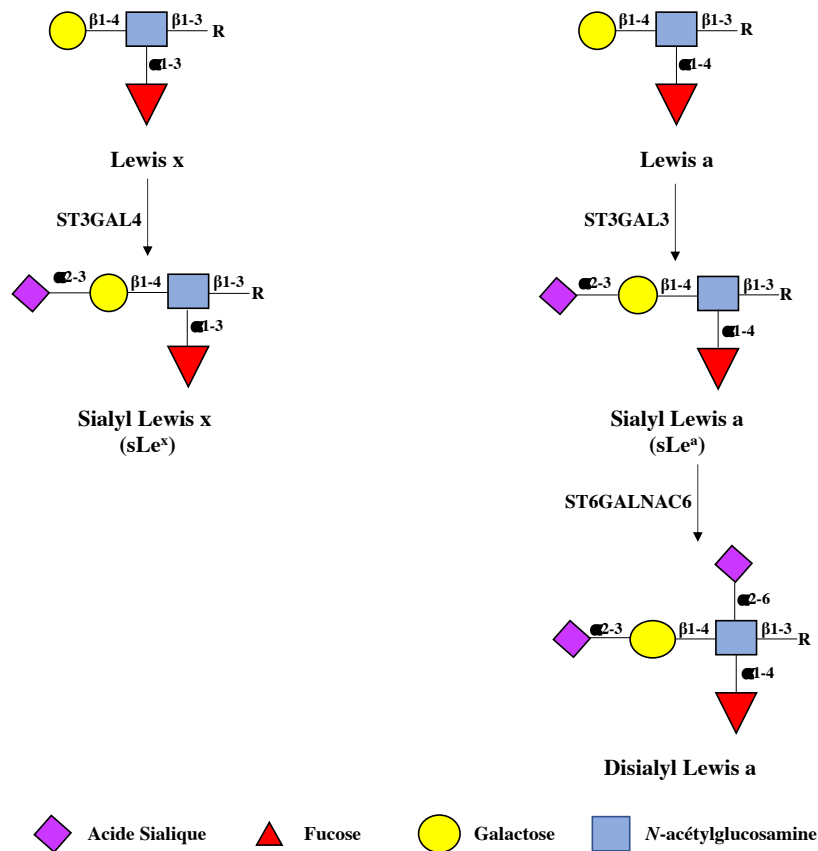


Figure 31 : Synthèse des antigènes de la famille sialyl-Lewis

Les antigènes Lewis a et Lewis x diffèrent par le type de liaison du fucose ($\alpha 1-4$ ou $\alpha 1-3$). Ces deux antigènes peuvent être sialylés et donner les antigènes sialyl Lewis x (sLe^x) et sialyl Lewis a (sLe^a).

pathologiques, notamment les cancers. Les cellules tumorales arborent souvent des structures glycaniques incomplètes, appelées TACAs (Tumors Associated Carbohydrate Antigens). Les différents noyaux *O*-glycaniques (cores) sont sialylés précocement et on retrouve des structures comme sialyl-core 1 ou l'antigène STn (sialyl Tn) synthétisé par ST6GALNAC1 (Figure 30). Cet antigène STn est très peu présent dans les tissus sains alors qu'il est surexprimé dans les tumeurs colorectales (Loureiro et al. 2018)(Itzkowitz et al. 1989). D'autres antigènes de la famille Lewis, sont aussi retrouvés sous une forme sialylée (Figure 31). Par ailleurs, l'antigène sialyl Lewis a (CA-19-9), synthétisé par ST3GAL3, est retrouvé surexprimé dans de nombreux cancers et utilisé comme marqueur tumoral (Kannagi 2007). La surexpression de l'antigène sialyl Lewis x (SLx), synthétisé par ST3GAL4, à la surface des cellules cancéreuses favorise leur interaction avec la E-sélectine à la surface des cellules endothéliales et facilite le transport des cellules cancéreuses via les vaisseaux sanguins ainsi que la formation de métastases à distance (Vajaria and Patel 2017).

Des altérations du taux d'acides sialiques total (TSA), ou de l'expression de sialyltransférases et/ou de sialidases ont été reportées dans de nombreux cancers (cancers du sein, poumon, leucémie, estomac, ovaire, colon, vessie...) (Vajaria and Patel 2017). Globalement on observe une hyper-sialylation dans les cancers, qui peut être due à une surexpression de certaines sialyltransférases, une sous-expression de certaines sialidases ou une combinaison des deux évènements. Des variations de sialylation sont parfois observées sans changement d'expression. C'est ce qui est observé pour *ST3GAL4* quand les protéines Rab11 sont dérégulées. Les protéines Rab11 sont impliquées dans le trafic des endosomes vers d'autres compartiments, et un KD de *Rab11* provoque une augmentation importante de la sialylation des *N*-glycanes par *ST3GAL4* sans changement d'expression de cette dernière. *ST3GAL4* se retrouve exclusivement bloquée dans l'appareil de Golgi au lieu d'être transportée vers des compartiments post-Golgien (endosomes, lysosomes), provoquant ainsi une hyper-sialylation

Tableau 7 : Expression de *ST6GAL1* dans différents cancers

D'après Garnham et al, 2019.

Type de cancer	Expression de <i>ST6GAL1</i>	Caractéristiques des tumeurs	Références
Vessie	Sous-exprimé	Invasives, tumeurs de stade élevée avec métastases	Antony et al, 2014
Sein	Surexprimé	Métastases	Lu et al, 2014
Cervix	Surexprimé	Invasion stromale avec métastases	Wang et al, 2003
Colon	Surexprimé	Invasives, tumeurs agressives avec chimiorésistance	Swindall et al, 2011 Chiricolo et al, 2006 Schultz et al, 2016
Estomac	Surexprimé	Métastases	Gretshel et al, 2003
Gliome	Surexprimé	Invasives avec métastases	Yamamoto et al, 2001
Leucémie	Surexprimé	Augmentation de la chimiorésistance	Ma et al, 2015
Foie	Surexprimé	Tumeur agressive, invasive avec chimiorésistance	Zhao et al, 2014 Pousset et al, 1997
Mélanome	Surexprimé	Métastases	Agrawal et al, 2017
Ovaire	Surexprimé	Invasives	Wang et al, 2005 Wichert et al 2018
Pancréas avec métastases distantes	Surexprimé	Métastases avancés	Hsieh et al, 2017
Prostate	Surexprimé	Faible pronostic et métastases	Wet et al, 2016 Munkey et al, 2016

des *N*-glycanes transitant dans le Golgi (Kitano et al. 2021). Une caractéristique des cellules tumorales est la capacité à proliférer en absence de signal. La sialylation affecte certaines voies de signalisation. ST3GAL1 est impliquée dans la tumorigenèse mammaire (Picco et al. 2010). Il a été montré que l'activité du récepteur GDNF α (GFRA1) était dépendante de ST3GAL1. Le récepteur GFRA1 est surexprimé dans le cancer du sein et sa sialylation par ST3GAL1 favorise la phosphorylation des voies de signalisation sous-jacentes et donc leur activation ce qui favorise la prolifération des cellules cancéreuses (Fan et al. 2018).

La sialyltransférase ST6GAL1 a beaucoup été étudiée en cancérologie. Il s'avère qu'elle est surexprimée dans de nombreux cancers (Tableau 7) (Garnham et al. 2019), et cette surexpression corrèle souvent avec des stades avancés. La sialylation du récepteur Fas par ST6GAL1 inhibe l'association de la queue du récepteur Fas avec FADD (Fas Associated protein with Dead Domain), et engendre une inactivation des caspases sous-jacentes et une diminution de la mort cellulaire par apoptose (Swindall and Bellis 2011). La sialylation de l'EGFR par ST6GAL1 est essentielle pour sa phosphorylation et son activation, et protège la cellule de l'apoptose induite par le gefitinib, inhibiteur de l'EGFR (Britain et al. 2018). Une surexpression de ST6GAL1 dans certains cancers pourrait donc favoriser le maintien des cellules tumorales en inhibant la mort par apoptose.

ST6GALNAC1 est impliquée dans la tumorigenèse colorectale, plus particulièrement dans le maintien des cellules souches cancéreuses (CSC), la surexpression de cette sialyltransférase dans les CSC aboutit à une surexpression de l'antigène STn porté par le marqueur de CSC CD44. Cette surexpression favorise la formation de sphéroïdes et apporterait une certaine résistance au 5-fluoracile, un agent utilisé en chimiothérapie. ST6GALNAC1 favorise également la tumorigenèse pulmonaire. En effet, un KO de *ST6GALNAC1* dans des lignées cancéreuses pulmonaires provoque une diminution drastique de l'expression de la protéine

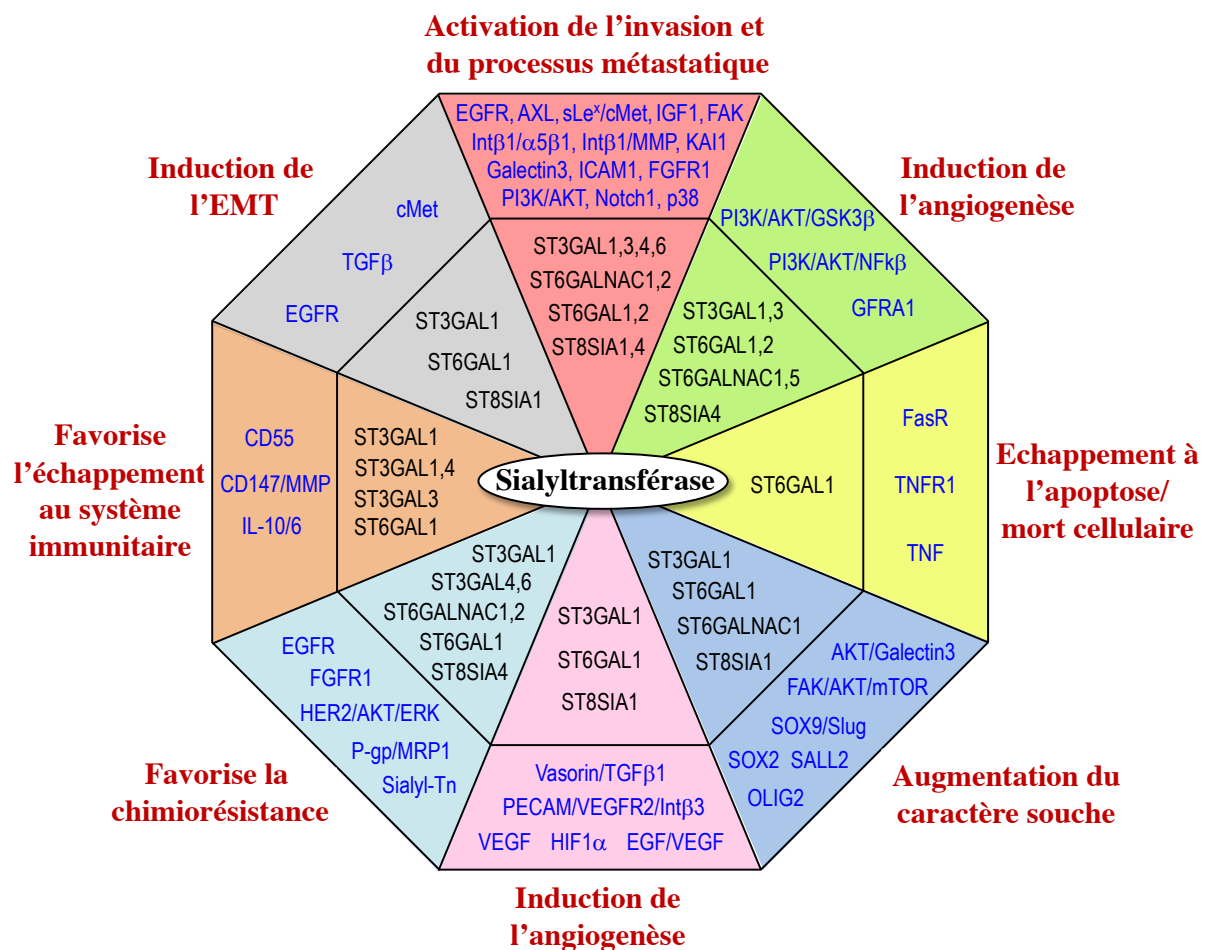


Figure 32 : Rôles des différentes sialyltransférases dans les processus liés aux cancers
 Le nom de chaque sialyltransférase est inscrit en noir, et les acteurs sur lesquels elles agissent en bleu.
 Les conséquences des modifications d'expression sont indiquées en bordeau. (EMT : Transition
 Épithélio-Mésenchymateuse). D'après Pietrobono et al. 2021.

MUC5AC ainsi que de l'antigène STn porté par cette protéine. Cette perte de sialylation par ST6GALNAC1 diminue l'interaction entre MUC5AC et son partenaire protéique, l'intégrine $\beta 4$, essentielle pour la migration des cellules pulmonaires via la voie de signalisation FAK (Focal Adhesion Kinase) (Lakshmanan et al. 2021). Des changements de sialylation sont également impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), conduisant à la formation de métastases.

Un KD de *ST3GAL1* dans des cellules tumorales ovariennes diminue les capacités d'invasion de cellules (Wen et al. 2017). *ST3GAL3* et *ST3GAL4* semblent aussi impliquées dans les processus de migration et d'invasion puisque des cellules cancéreuses pancréatiques surexprimant *ST3GAL3* possèdent des capacités migratoires augmentées *in vitro*, et une fois transfectées chez des souris ces cellules forment plus de métastases que des cellules contrôles (Pérez-Garay et al. 2010). Des résultats similaires sont observés lors de la surexpression de *ST4GAL4* dans le même modèle cellulaire (Pérez-Garay et al. 2013).

La famille des *ST8SIA* est aussi impliquée dans des cas de cancers. En effet un KD de *ST8SIA1*, ou GD3 synthase, diminue les capacités de migration et d'invasion de lignées cancéreuses du sein (Sarkar et al. 2015). *ST8SIA4* est la cible de deux miRNA : miR-146a et miR-146b. Ces deux miRNA sont surexprimés dans des lignées de carcinomes thyroïdiens et l'inhibition de *ST8SIA4* par ces deux miRNA favorise la tumorigenèse (Ma et al. 2017).

Les sialyltransférases sont donc impliquées dans de nombreux processus associés aux cancers via différentes voies de signalisation/acteurs (Figure 32) (Pietrobono and Stecca 2021).

III.2.2. ST3GAL2 et cancers

Le niveau d'expression de *ST3GAL2* a été étudié dans des cas de cancers oraux. Il s'avère que *ST3GAL2* est significativement moins exprimé dans les tissus cancéreux comparé

aux tissus sains. Cependant de plus hauts niveaux d'expression sont observés pour des stades avancés (Mehta et al. 2020). Le plus souvent ce n'est pas ST3GAL2 qui est étudié mais son produit SSEA-4. Dans le cancer du sein, il s'avère que certaines cellules tumorales sont plus sensibles que d'autres aux agents anti-tumoraux utilisés en chimiothérapie, notamment la doxorubicine associé au cyclophosphamide. La sensibilité des cellules tumorales corrèle avec l'expression de SSEA-4 à leur surface. Plus de 98% des cellules composant les tumeurs résistantes sont porteuses de SSEA-4 à leur surface (Aloia et al. 2015). L'étude des bases de données sur la survie des patientes atteintes de cancer du sein a également mis en évidence que de hauts niveaux d'expression de *ST3GAL2* étaient associés à une faible survie des patientes. L'expression de ST3GAL2, et donc de SSEA-4, participerait au phénomène de résistance à la chimiothérapie associée à une diminution de la survie. Un KD de *ST3GAL2* dans des cellules prostatiques DU145 aboutit à une inhibition de la synthèse de SSEA-4 et à une diminution des capacités d'adhésion des cellules à différents composants de la matrice extracellulaire tels que le collagène I, IV ou encore la laminine. Des cellules DU145 exprimant SSEA-4 à leur surface (SSEA-4 +) ont la capacité de former des tumeurs *in vivo*. En effet, toutes les souris xénogreffées avec des DU145 SSEA-4⁺ développent des tumeurs, alors des souris transplantées avec des cellules SSEA-4⁻ ou un mélange de cellules non triées ne développent des tumeurs que dans deux cas sur six (Sivasubramaniyan et al. 2015).

Ces études portent sur SSEA-4 et non sur ST3GAL2 directement. De plus, ST3GAL2 n'a pas encore été étudiée dans des cas de cancers colorectaux. Au vu de la complexité du fonctionnement de cette enzyme, des études fondamentales sur son fonctionnement sont nécessaires.

Tableau 8 : Liste des principales lignées cellulaires colorectales couramment utilisées, avec leur origine tissulaire et le stade du cancer correspondant (lorsque que celui-ci est connu).

D'après <https://www.atcc.org/en>.

Lignées cellulaires colorectales	Origine tissulaire	Type de cancer	Type cellulaire	Stade (Duke)
Caco-2	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	B
CCD-18Co	Colon	Normal	Fibroblastes	/
CCD-33Co	Colon	Normal	Fibroblastes	/
CCD-112CoN	Colon/Embryonnaire	Normal	Fibroblastes	/
CCD 841 CoN	Colon/Embryonnaire	Normal	Epithéliales	/
CCD 841 CoTr	Colon/Embryonnaire	Normal	Epithéliales	/
COLO 201	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Fibroblaste-like	D
COLO 205	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	D
COLO 320DM	Colon	Colorectal adenocarcinoma	/	C
DLD-1	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	C
FHC	Colon	Normal	Epithéliales	/
HCT-8	Colon	Ileocecal colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	/
HCT-15	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	C
HCT-116	Colon	Colorectal carcinoma	Epithéliales	A
Hs 255.T	Colon	Adenocarcinoma	Fibroblastes	/
Hs 257.T	Rate	Colorectal adenocarcinoma	/	/
Hs 675.T	Colon	Colorectal cancer	Fibroblastes	/
Hs 698.T	Colon	Adenocarcinoma	/	/
HT-29	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	B
LoVo	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	C, grade IV
LS123	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	B
LS 174T	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	B
LS 180	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	B
LS411N	Cecum	Colorectal carcinoma	Epithéliales	B
LS513	Cecum	Colorectal carcinoma	Epithéliales	C
LS1034	Cecum	Colorectal carcinoma	Epithéliales	C
NCI-H498	Cecum	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	/
NCI-H508	Cecum	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	/
NCI-H716	Cecum	Colorectal adenocarcinoma	Lymphoblaste-like	/
NCI-H747	Cecum	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	/
RKO-AS45-1	Colon	Carcinoma	Epithéliales	/
RKO-E6	Colon	Carcinoma, Papilloma	Epithéliales	/
SK-CO-1	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	/
SNU-C1	Colon	Adenocarcinoma	En suspension	/
SNU-C2A	/	Colorectal carcinoma	Epithéliales	/
SNU-C2B	Cecum	Colorectal carcinoma	Epithéliales	/
SW48	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	C, grade IV
SW403	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	C, grade III
SW480	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	B
SW620	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	C
SW837	Rectum	Adenocarcinoma	Epithéliales	grade IV
SW948	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	C, grade III
SW1116	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	A, grade III
SW1417	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	C, grade III
SW1463	Rectum	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	C
T84	Colon	Colorectal carcinoma	Epithéliales	/
WiDr	Colon	Colorectal adenocarcinoma	Epithéliales	/

III.3. Modèles cellulaires du cancer colorectal

L'étude des cancers nécessite des modèles cellulaires. En effet, tester la réponse à certaines drogues ou encore l'effet de dérégulations géniques/protéiques doit se faire sur des modèles *in vitro* afin de mieux appréhender le comportement de la tumeur du patient. A ce titre, il existe des modèles cellulaires pour tous les types de cancers. L'utilisation de telles lignées présente de nombreux avantages comme la facilité de culture, la croissance rapide et la possibilité de réaliser des xénogreffes afin d'étudier leur comportement *in vivo*.

Pour le cancer colorectal, de nombreux modèles cellulaires représentent chacun différents stades du cancer. Ces cellules sont issues de tumeurs primaires de patients de diverses origines (Mouradov et al. 2014). Chaque modèle cellulaire a ses propres caractéristiques et cette diversité offre une assez bonne représentation de l'hétérogénéité des tumeurs colorectales que l'on retrouve chez les patients (Tableau 8). Toutes ces lignées sont caractérisées par des événements de méthylation, des mutations touchant différents gènes/protéines, des instabilités chromosomiques, permettant de représenter quasiment tous les cas de figures que l'on peut trouver chez les patients (Linnekamp et al. 2018). Le profil de glycosylation de plusieurs lignées cancéreuses colorectales a été étudié (Holst et al. 2016) et a montré que ces lignées arboraient une grande hétérogénéité dans leur profil de glycosylation mais globalement on retrouve plus d'antigènes de la famille sialyl Lewis, typique des tumeurs (Holst et al. 2016)(Kannagi 2007). Il est également possible de cultiver directement les cellules tumorales d'un patient en particulier afin d'étudier leur réponse à un traitement (Hong et al. 2019). Ce type de thérapie personnalisée est prometteur mais ne concerne qu'un patient, l'utilisation de diverses lignées tumorales s'avère donc essentielle. La culture de ces cellules *in vitro* permet la réalisation de divers tests fonctionnels (tests de migration, de prolifération ou d'invasion cellulaire), on peut également tester la résistance à certains agents anti-tumoraux, la capacité à former des CSC ou étudier leur comportement *in vivo* en réalisant des xénogreffes. On peut également cultiver ces

cellules dans un environnement en 3 dimensions et observer ainsi leurs capacités à former des sphéroïdes ou à interagir avec certains composants de la matrice extracellulaire (Ravi et al. 2015).

Chapitre IV. Objectifs de thèse

Mes travaux de thèse se sont articulés autour de l'étude de ces deux glycosyltransférases, POFUT1 et ST3GAL2, dans un contexte pathologique : le cancer colorectal.

Une partie de mon projet de thèse portait sur l'étude de POFUT1 dans le contexte tumoral colorectal. En 2018, des travaux publiés par Du et al. (Du et al. 2018) montraient l'implication de POFUT1 dans la tumorigenèse colorectale. Ces auteurs ont démontré que POFUT1 était bel et bien surexprimé dans les tissus cancéreux colorectaux en se basant d'abord sur l'étude de bases de données regroupant des informations de RNA-Seq. Cette surexpression de POFUT1 a été confirmée sur des échantillons de patients. Leurs travaux ont consisté à réaliser un knock-down de *POFUT1* dans des lignées cancéreuses colorectales (HCT116 et SW620) et observer les conséquences sur les capacités de prolifération, de migration, d'invasion et d'apoptose. Il s'avère que le KD de *POFUT1* altère négativement les propriétés tumorales des lignées HCT116 et SW620. Le niveau protéique de NICD est également diminué lorsque *POFUT1* est sous-exprimé. Ces données démontrent l'implication de POFUT1 dans la tumorigenèse colorectale et l'implication de la voie NOTCH. La même année au sein de mon équipe d'accueil, Chabanaï et al. ont démontré que cette surexpression de *POFUT1* dans les tumeurs colorectales était due à une amplification de la région chromosomique portant *POFUT1* qui aboutissait à une augmentation du nombre de copies de *POFUT1*. Au cours des analyses bioinformatiques, Chabanaï et al, ont montré que 90,13% des patients avec une amplification de la région associée à *POFUT1*, présentaient une surexpression de *POFUT1*. Cependant, dans de rares cas où *POFUT1* n'est ni amplifié ni surexprimé sept mutations faux-sens dans la séquence codante de *POFUT1* ont été identifiées. Les conséquences fonctionnelles de ces mutations n'étaient pas connues, je me suis donc attachée à en étudier les conséquences sur l'activité enzymatique de POFUT1. Il fallait pour cela produire toutes les enzymes

recombinantes mutées et mettre en œuvre des tests *in vitro* permettant d'apprécier leur activité catalytique. Les résultats de ce travail ont été publiés en 2020 dans la revue *Cancers*.

L'autre partie de mon travail de thèse portait sur la sialylation exercée par ST3GAL2, toujours dans le contexte pathologique du cancer colorectal. Le glycosphingolipide SSEA-4, produit uniquement par ST3GAL2, a déjà été étudié dans plusieurs cancers, notamment le cancer du sein (Aloia et al. 2015), ou encore celui de la prostate (Sivasubramaniyan et al. 2015). Les cellules tumorales expriment fortement l'épitope SSEA-4 à leur surface, et la présence de SSEA-4 leur confère une résistance à certains agents chimiothérapeutiques. Cependant ST3GAL2 n'avait encore jamais été étudiée dans le cas du cancer colorectal. Après analyse des bases de données RNA-Seq, nous avons remarqué que *ST3GAL2* était le seul gène codant une sialyltransférase significativement surexprimée dans les tissus tumoraux colorectaux. Grâce à une collaboration avec le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges, nous avons pu confirmer ce résultat sur des échantillons de patients atteints de cancers colorectaux en comparaison avec des tissus sains issus de ces mêmes patients. Ces résultats nous ont conduit à réaliser un KD de *ST3GAL2* dans un modèle cellulaire représentant un stade 2 de CCR, la lignée HT29, et à caractériser ces cellules KD pour *ST3GAL2*, d'abord *in vitro* avec des tests fonctionnels puis *in vivo*, avec des xénogreffes chez des souris nude. Ce travail est accepté pour publication dans la revue *AJCR* (American Journal of Cancer Research).

Functional Characterization of POFUT1 variants Associated with Colorectal Cancer

Marlène Deschuyter, Florian Pennarubia, Emilie Pinault, Sébastien Legardinier, Abderrahman Maftah

Cancers **2020**, *12*, 1430; doi:10.3390/cancers12061430

Impact Factor 2020 : 6.162

De plus en plus d'études portent sur des changements spécifiques de glycosylation impliqués dans le processus tumoral. Les travaux sur la protéine *O*-fucosyltransférase de type 1 a permis de mettre en lumière la surexpression de cette enzyme dans les tumeurs colorectales. Des remaniements chromosomiques sont souvent impliqués dans les tumeurs colorectales, en particulier une duplication d'un fragment du bras long du chromosome 20. Parmi les gènes associés à ce fragment on retrouve *POFUT1* (Daojiang Li et al. 2017). La surexpression de *POFUT1* dans les tumeurs colorectales a été étudiée et a permis de démontrer son implication dans la tumorigenèse colorectale. En effet, un KD de *POFUT1* dans deux lignées cancéreuses colorectales représentant deux stades différents provoque une diminution significative de la prolifération, de la migration et de l'invasion *in vitro*, une augmentation de la proportion de cellules en apoptose tardive et une diminution de la proportion de cellules en phase S et G2/M du cycle cellulaire en faveur de la phase G1 (Du et al. 2018). *In vivo*, les tumeurs issues des cellules KD pour *POFUT1* ont une taille et un poids inférieurs comparé aux tumeurs issues des cellules contrôles (Du et al. 2018). Au sein de mon équipe, une étude réalisée dans le cadre de la thèse de M. Julien Chabanais a montré que l'amplification de la région chromosomique 20q11.21 est présente chez 76,02% des patients atteints de tumeurs colorectales, se traduisant ainsi par une surexpression de *POFUT1*. Cependant grâce à cette étude *in silico*, nous avons pu identifier chez des patients sept substitutions dans la séquence protéique de POFUT1 : R43H, Y73C, T115A, S300L, I343V, D348N et R364W. Ces substitutions n'ont été retrouvées que très rarement sans que les conséquences fonctionnelles sur l'activité de l'enzyme ne soient connues. Les résidus R43, Y73 et R364 sont très proches des sites de fixation du substrat accepteur (base données UniProtKB). Des mutations de ces résidus pourraient donc avoir des conséquences sur l'activité enzymatique (d'après la base de données BioMuta). D'autres variants de la protéine POFUT1 humaine ont été identifiés dans la maladie de Dowling-Degos (DDD) : R240A, M262T, S356F et R366W. Le variant M262T n'a pas d'effet sur l'activité de




NOTCH, alors que les trois autres en diminuent l'activité (McMillan et al. 2017).

Mon travail a donc porté sur la caractérisation de ces sept variants protéiques *in vitro*. Je me suis donc attachée à produire ces sept variants protéiques par mutagenèse dirigée à partir de la séquence sauvage de POFUT1 humain. J'ai produit ces protéines recombinantes sous forme sécrétée dans le milieu de culture de cellules CHO. En parallèle, j'ai également produit *in vitro* deux motifs EGF recombinants de NOTCH qui serviront de substrats accepteurs. Après production et purification de ces composés, l'activité de *O*-fucosylation de ces variants protéiques de POFUT1 a été testée *in vitro* sur les deux motifs EGF: le motif EGF 26 connu pour être facilement *O*-fucosylable, et le motif EGF 12 difficilement *O*-fucosylable (Zhijie Li et al. 2017)(Pennarubia et al. 2018). Par la méthode de chimie-click adaptée à cette activité enzymatique (Pennarubia et al. 2018), nous avons démontré que six des sept variants de POFUT1 ont une activité de *O*-fucosylation significativement supérieure à POFUT1 sauvage. Seul un variant, le variant S300L, ne montre pas de différence significative d'activité de *O*-fucosylation.

En conclusion, ce travail identifie pour la première fois des variants de la protéine POFUT1 qui possèdent une activité de *O*-fucosylation supérieure à celle de la protéine sauvage. Ceci laisse supposer que des patients avec une de ces mutations de POFUT1 ont une hyper *O*-fucosylation de NOTCH (entre autres) et donc une activité NOTCH augmentée qui participerait à la tumorigenèse colorectale. Ces travaux ouvrent également un champ de recherche sur les mécanismes moléculaires qui régulent l'activité de cette enzyme.

Article

Functional Characterization of POFUT1 Variants Associated with Colorectal Cancer

Marlène Deschuyter¹, Florian Pennarubia^{1,2}, Emilie Pinault^{1,3} , Sébastien Legardinier¹  and Abderrahman Maftah^{1,*} 

¹ PEIRENE, EA 7500, Glycosylation and Cell Differentiation, Faculty of Sciences and Technology, University of Limoges, F-87060 Limoges, France; marlene.deschuyter@unilim.fr (M.D.); florian.pennarubia@uga.edu (F.P.); emilie.pinault@unilim.fr (E.P.); sebastien.legardinier@unilim.fr (S.L.)

² Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

³ BISCEM US042 INSERM—UMS 2015 CNRS, Mass Spectrometry Platform, Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Limoges, F-87025 Limoges, France

* Correspondence: abderrahman.maftah@unilim.fr; Tel.: +33-5554-57684; Fax: +33-5554-57653

Received: 6 May 2020; Accepted: 28 May 2020; Published: 31 May 2020



Abstract: Background: Protein *O*-fucosyltransferase 1 (POFUT1) overexpression, which is observed in many cancers such as colorectal cancer (CRC), leads to a NOTCH signaling dysregulation associated with the tumoral process. In rare CRC cases, with no *POFUT1* overexpression, seven missense mutations were found in human POFUT1. Methods: Recombinant secreted forms of human WT POFUT1 and its seven mutated counterparts were produced and purified. Their *O*-fucosyltransferase activities were assayed in vitro using a chemo-enzymatic approach with azido-labeled GDP-fucose as a donor substrate and NOTCH1 EGF-LD26, produced in *E. coli* periplasm, as a relevant acceptor substrate. Targeted mass spectrometry (MS) was carried out to quantify the *O*-fucosyltransferase activity of all POFUT1 proteins. Findings: MS analyses showed a significantly higher *O*-fucosyltransferase activity of six POFUT1 variants (R43H, Y73C, T115A, I343V, D348N, and R364W) compared to WT POFUT1. Interpretation: This study provides insights on the possible involvement of these seven missense mutations in colorectal tumors. The hyperactive forms could lead to an increased *O*-fucosylation of POFUT1 protein targets such as NOTCH receptors in CRC patients, thereby leading to a NOTCH signaling dysregulation. It is the first demonstration of gain-of-function mutations for this crucial glycosyltransferase, modulating NOTCH activity, as well as that of other potential glycoproteins.

Keywords: colorectal cancer; EGF-like domain; mutations; POFUT1

1. Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most diagnosed cancer worldwide (second in females and third in males), with 1.8 million cases in 2018 and 880,792 deaths according to the World Health Organization. CRC is characterized by heterogeneous solid tumors, caused by the accumulation of numerous genetic alterations within cells, as well as epigenetic ones. Among the main causes identified in the progression of benign adenoma to malignant carcinoma, chromosomal instability was incriminated in more than 80% of sporadic cases of CRC [1]. The long arm of chromosome 20 was shown as a frequently dysregulated unstable region in several cancers such as CRC [2]. The region 20q11.21 was found to contain only four genes, including pleomorphic adenomagenic-like 2 (*PLAGL2*) and protein *O*-fucosyltransferase 1 (*POFUT1*) [3]. A recent study showed that these two genes (*POFUT1* and *PLAG2*) share a bidirectional promoter and, associated with a copy number amplification, promote colorectal cancer through dysregulation of both Notch and Wnt/ β -catenin

signaling pathways [4,5]. The increased proliferation in CRC was attributed to PLAGL2 overexpression impacting the Wnt/ β -catenin pathway [4], while the colorectal tumor progression was correlated to dysregulation of Notch signaling caused by *POFUT1* overexpression [6,7].

POFUT1 is an endoplasmic reticulum (ER)-resident glycosyltransferase allowing *O*-fucosylation of the membrane and secreted glycoproteins within their EGF-like domains (EGF-LDs). This 388 amino-acid-long enzyme (EC 2.4.1.221) in humans, which comprises four disulfide bridges and a terminal KDEL-like ER-retention sequence (RDEF), is an invertase with a GT-B 3D structure characterized by two Rossmann-fold domains [8]. The interface between these two conserved domains forms the catalytic center comprising conserved residues interacting with the GDP-fucose donor substrate [9], and also with acceptor substrates, namely h-type EGF-LDs (hEGF-LDs) [10]. Interestingly, to be soluble and fully functional, POFUT1 must be modified by *N*-glycosylation at its two conserved consensus sites, as was shown for bovine POFUT1 [11]. POFUT1-mediated *O*-fucosylation is a rare post-translational modification occurring in ER, which leads to fucose transfer to serine or threonine residues of hEGF-LDs within the consensus sequence C²-XXXX-(S/T)-C³, where C² and C³ are the second and third conserved cysteines. Among the potentially POFUT1-modified proteins, the most documented were Notch receptors which are extensively modified with *O*-fucoses in their extracellular domains [12–14]. Interestingly, Notch receptors *O*-fucosylation was widely reported to be involved in the modulation of their interaction with ligands, thereby controlling the activation of the Notch signaling pathway [15]. Consequently, *O*-fucosylation was shown to be required for regulation of Notch signaling in several physiologic processes, and its alteration can induce pathological situations [16]. Indeed, the knockout of *Pofut1* in mice is lethal at midgestation [17], with embryos displaying the same severe phenotype as that of KO mice for Notch1 or *Rbp-jk*, the main transcriptional repressor of Notch signaling [18,19]. POFUT1 overexpression was observed in many cancers affecting different organs such as the liver [20], stomach [21], oral cavity [22], or breast [23]. The increased quantity of POFUT1 in hepatocellular carcinomas was associated with a poor prognosis. This was due to an abnormal NOTCH activation that led to in vitro increase of both proliferation and migration [20]. More recently, *POFUT1* overexpression, mainly due to a 20q11.21 amplification and a subsequent increase of the *POFUT1* copy number, was also detected in CRC from the stage I leading to a dysregulation of Notch signaling [6]. Remarkably, the previous study showed that among tumors with amplification of the unstable 20q.11.21 region (76%), 90% of tumors from CRC patients exhibited *POFUT1* overexpression. However, in less frequent CRC cases (19%), with no chromosomal amplification and no change in POFUT1 quantity, seven missense mutations were found for POFUT1 with no consequences demonstrated on its enzymatic activity. These seven point-mutations (R43H, Y73C, T115A, S300L, I343V, D348N, and R364W), found in CRC using databases reporting single-nucleotide mutations in cancers, were predicted to be associated or not with a malignant prognosis.

Given the importance of the *O*-fucosylation in the regulation of Notch receptors-ligands interactions and its consequences on Notch signaling activation, we chose to investigate the functional significance of these seven POFUT1 variants found in CRC. For this purpose, we first produced and purified soluble forms of WT and mutated POFUT1 variants in stable CHO cell lines and a correctly folded and non-glycosylated EGF-LD, as a substrate, in the bacterial periplasm. More precisely, the ability of fucose transfer was determined in vitro for each POFUT1 variant using GDP-fucose (azido-labeled or not) and NOTCH1 EGF-LD 26, known to be modified on its highly conserved *O*-fucose site [24]. After in vitro *O*-fucosylation reactions, copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) referred to as click chemistry [25], and multiple reaction monitoring-mass spectrometry (MRM-MS), were performed, as previously described in Reference [25]. We did this provide evidence and quantify the *O*-fucose transfer activity of each POFUT1 variant compared to the WT one. The prediction of GDP-fucose binding to a mutated POFUT1 variant (R43H) by automatic molecular docking, as well as the current knowledge about interactions of POFUT1 with its donor and acceptor substrates, allowed us to discuss the impact of mutations on activities of POFUT1 variants, especially those with mutations close to the GDP-fucose binding cavity. In addition to investigations about the functional state of mutated

POFUT1 proteins carried by CRC patients, this study also provides additional information on the structure–function relationships of this glycosyltransferase.

2. Results

2.1. Frequency and Location of Missense Mutations Affecting POFUT1 in CRC

According to the BioMuta database [26–28], reporting non-synonymous single-nucleotide mutations associated with cancers, the mutations R43H, Y73C, and T115A were found twice in POFUT1 of CRC patients, while the others (S300L, I343V, D348N, R364W) were observed once. Interestingly, one CRC patient was found to carry both mutations R43H and Y73C (TCGA-D5-6540-01) using the Firebrowse database. Our study could be helpful to speculate about the potential cumulative or compensatory effect of these two mutations on POFUT1 activity in this patient.

We aligned peptide sequences encoding POFUT1 of several species (Figure 1). The human sequence, which is very similar to that of the mouse, exhibited many differences to nematode *C. elegans*. However, alignments showed several conserved regions, where some were known to be involved in binding to donor substrate, namely the regions R43-N46, H238-R240, and S357-F358 [29]. Interestingly, the residue R⁴³, mutated to histidine in CRC (R43H), and located in the first substrate-binding region, was known to directly interact with the fucose moiety of the donor substrate (GDP-fucose) [30]. This crucial region also contains three highly conserved residues, namely M⁴¹, G⁴², and N⁴⁶ in humans, known to establish important links through sulphur-hydrogen or hydrogen bonds with the C²-C³ subdomain of hEGF-LDs from mouse proteins [10]. The highly conserved Y⁷³, mutated to cysteine in CRC (Y73C), was also demonstrated to be involved in binding to hEGF-LD [10]. For the three other highly conserved residues mutated in CRC (I343V, D348N, and R364W) and located close to the third substrate-binding region S357-F358, their contribution to POFUT1 activity was unknown yet. On the contrary, the two last mutations found in CRC, namely S300L and T115A, were considered to be non-conserved residues among species. Overall, the high conservation of at least five residues, among the seven mutated ones in CRC patients, as well as the implication of three of them in other types of cancers suggested functional consequences on POFUT1 activity.

2.2. Production of Soluble Forms for Human WT and Mutated POFUT1 Variants

When structure-function studies should be performed on POFUT1, major drawbacks related to the isolation of this glycosyltransferase should be considered due to its status of ER-resident protein. To overcome this issue, we produced recombinant secreted proteins for human WT and mutated POFUT1 variants after establishing stable transfected CHO Flp-InTM cell lines. For this purpose, a modified expression vector named pSec-NtermHis6 [25] was used to allow secretion of recombinant POFUT1, with an N-terminal polyhistidine tag and devoided of its C-terminal ER-retention signal RDEF.

To verify secretion of all recombinant POFUT1 variants, we performed western blot analyses with equal volumes of supernatants from CHO conditioned culture media using a specific anti-POFUT1 antibody. As shown in Figure 2, recombinant proteins were secreted unequally. Using medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), only the secreted variants I343V and R364W were weakly detected in the supernatant. However, strong signals of equivalent intensity were seen for the other variants (Figure 2, upper panel). Similar results were obtained with 0% FBS medium (the condition used for protein production before purification), except for I343V, where its increased amount became comparable to that of other variants exhibiting strong signals (Figure 2, lower panel).

All the recombinant histidine-tagged proteins, produced in serum-free media, were then purified using nickel-affinity chromatography. Regarding R364W variant, its secretion was very low in the supernatant of stable CHO cells; thus, higher amounts of cells were required to obtain enough purified protein in sufficient amount to perform functional experiments.

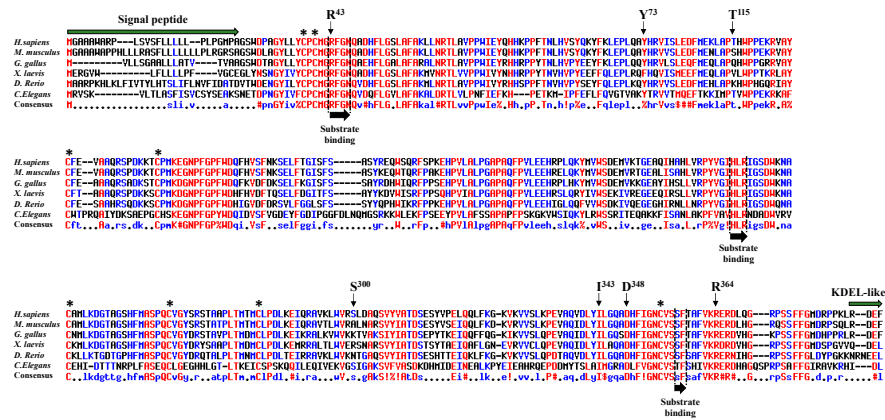


Figure 1. Alignment of POFUT1 protein sequences. Using the Multalin server, multiple sequence alignment for POFUT1 was done for different species such as *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, *Danio rerio*, and *Caenorhabditis elegans*. Among the seven missense mutations found in POFUT1 from CRC patients, five of them corresponded to mutations of highly conserved residues (R⁴³, Y⁷³, I³⁴³, D³⁴⁸, and R³⁶⁴), even located in a substrate-binding region for some residues such as R⁴³. However, POFUT1 T¹¹⁵ and S³⁰⁰, mutated in CRC patients, were not conserved among species. The three conserved regions known to be involved in binding to GDP-fucose are indicated with black arrows and specific sequences (signal peptide and KDEL-like ER-retention signal) with green arrows. Asterisks indicate the positions of conserved cysteines forming disulfide bridges.

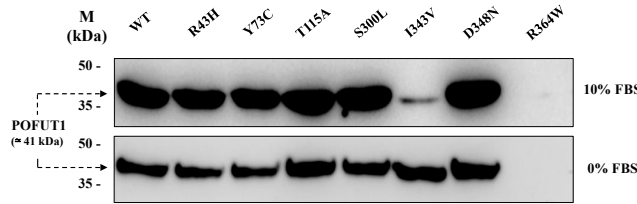


Figure 2. Western blot analysis, using anti-POFUT1 antibody, of recombinant POFUT1 variants secreted by stable CHO cell lines. Supernatants from each stable cell line were recovered by centrifugation from culture media after three days of protein production in F12 media with 10% (upper panel) or 0% (lower panel) fetal bovine serum (FBS). Same volumes of crude supernatants were loaded for WT and mutated POFUT1 proteins. Uncropped blots are shown in Figure S1.

2.3. Evidencing of the O-Fucosyltransferase Activity for POFUT1 Variants

The O-fucosyltransferase activity of WT protein and each POFUT1 variant was assessed in vitro, following incubation with an acceptor substrate (EGF-LD) and a chemically modified donor substrate (GDP-azido-fucose). As previously described [25], click chemistry reaction (CuAAC) coupling alkynyl-biotin to the azido-modified O-fucose, followed by blotting techniques using labeled peroxidase-streptavidin, were then performed to reveal fucose transfer to EGF-LDs (Figure 3).

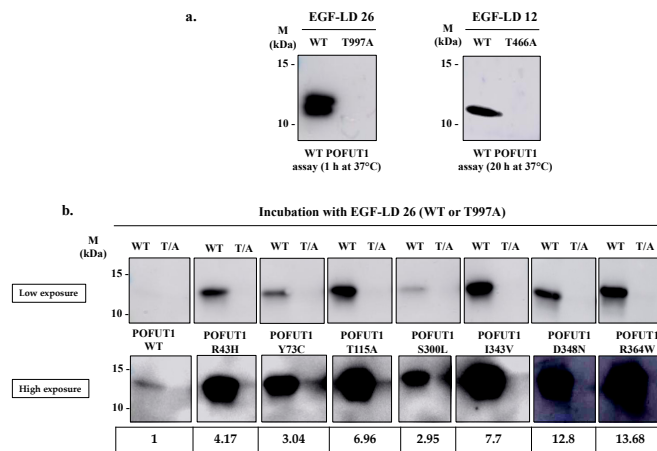


Figure 3. In vitro *O*-fucosyltransferase assay for activity of WT and mutated POFUT1 using click chemistry. (a) After 1 h or 20 h incubation at 37 °C of recombinant WT human POFUT1 with NOTCH1 EGF-LD 26 (WT and T997A) or EGF-LD 12 (WT and T466A) and GDP-azido-fucose, click chemistry (CuAAC) with alkynyl biotin was performed to link biotin to transferred *O*-linked fucose covalently. After SDS-PAGE and blotting techniques, EGF-LDs modified with *O*-fucose were revealed using HRP-streptavidin. (b) After 1 h independent incubations of WT POFUT1 and each mutated POFUT1 variant with WT or T997A EGF-LD 26 at 37 °C, the same procedure as described in (a) was carried out. A low exposure did not allow us to visualize WT POFUT1 labelling. After high exposure, the signal for WT POFUT1 was detected, and quantifications were performed for each POFUT1 variant compared to WT. Uncropped blots are shown in Figures S2 and S3.

We first tested WT POFUT1 activity with the two NOTCH1 EGF-LDs, namely EGF-LD 12 and EGF-LD 26, known to be modified with *O*-fucose by POFUT1 [10]. Using the same procedure as previously reported, they were produced as isolated proteins in *E. coli* BL21 strain and purified. As expected, they were recognized previously as correctly folded and able to receive *O*-fucose by POFUT1 [25]. As negative controls, we used T466A EGF-LD 12 and T997A EGF-LD 26, having their *O*-fucosylation sites mutated.

As expected, specific intense bands were observed at the proper size for both NOTCH1 WT EGF-LDs 12 and 26 incubated in vitro with human WT POFUT1 while no signal was obtained with their T/A mutated counterparts (Figure 3a). This result confirmed the successful transfer of azido-fucose to threonine residues of both *O*-fucosylation consensus sites of each EGF-LD. Similarly to mouse POFUT1 [25], the human counterpart was able to transfer fucose more efficiently to EGF-LD 26 than to EGF-LD 12 in vitro, since signals were obtained after 1 h and 20 h incubation with POFUT1 respectively. This led us to only perform in vitro *O*-fucosylation assays with EGF-LD 26. All recombinant POFUT1 variants were assessed in the same way with WT EGF-LD 26 and its negative control T997A (Figure 3b). Surprisingly, specific and strong signals were obtained in all cases, meaning that no mutation prevented WT EGF-LD 26 from being specifically modified by *O*-fucose at T⁹⁹⁷. However, signals with variable intensities were clearly observed, strongly suggesting that mutations affected POFUT1 *O*-fucosyltransferase activity. Indeed, all in vitro *O*-fucosylation assays were carried out with equal quantities of EGF-LD and POFUT1 variants, determined following protein quantification using the BCA method.

2.4. Quantitative MRM-MS Analysis of the O-Fucosyltransferase Activity for Each POFUT1 Variant

MRM-MS is a highly sensitive method of targeted mass spectrometry (MS) which is used to selectively detect and quantify peptides, obtained after protein reduction, alkylation, and digestion [31]. MRM-MS was performed to quantify the ability of each POFUT1 variant to transfer fucose compared to WT POFUT1 as a reference, in the same way as previously described in Reference [25].

For the *in vitro* O-fucosylation assays, the same amount of each POFUT1 variant was mixed with the same quantities of WT EGF-LD 26 (as a relevant acceptor substrate) and unlabeled GDP-fucose (as the donor substrate). After 20 h of incubation at 37 °C followed by trypsin digestion, the MRM-MS method was performed to confirm our previous results using click chemistry and to quantify the O-fucosyltransferase capacity of POFUT1 variants. Spectra obtained showed that human WT POFUT1 was indeed able to transfer specifically O-fucose to WT EGF-LD 26 (Figure 4) but with less efficiency ($25.00 \pm 20.68\%$) (Figure 5) than mouse recombinant POFUT1 (about 50%) [25]. All POFUT1 variants can partially modify at different degrees EGF-LD 26 with O-fucose since both non-modified and O-fucosylated peptides were detected. Regarding the mutants R364W, I343V, and D348N, peaks with more intensity were clearly obtained for the O-fucosylated forms than for the non-modified ones. This was consistent with an increased ability of these POFUT1 variants to transfer O-fucose on this EGF-LD (Figure 4). The variant I343V exhibited the best rate of O-fucosylation ($86.45 \pm 9.59\%$) (Figure 5), close to the rates obtained for the POFUT1 variants D348N, R364W, and surprisingly T115A. To a lesser extent, the R43H and Y73C mutations also led to a significantly increased O-fucosyltransferase activity (Figure 5). Finally, POFUT1 activity was not significantly affected when the non-conserved S³⁰⁰ residue was mutated to leucine.

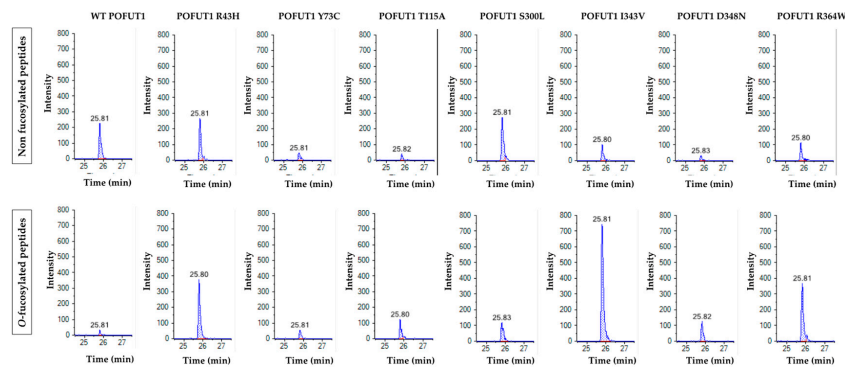


Figure 4. Multiple reaction monitoring mass spectrometry (MRM-MS) analyses of tryptic-digested WT EGF-LD26, after incubations with GDP-fucose and either WT POFUT1 or mutated POFUT1 variants independently. Peaks corresponding to non-modified peptides (upper panels) and peptides modified with O-fucose (lower panels) were shown for WT POFUT1 and all POFUT1 variants. Peaks correspond to the most intense MS2 fragment signal, obtained during the run time.

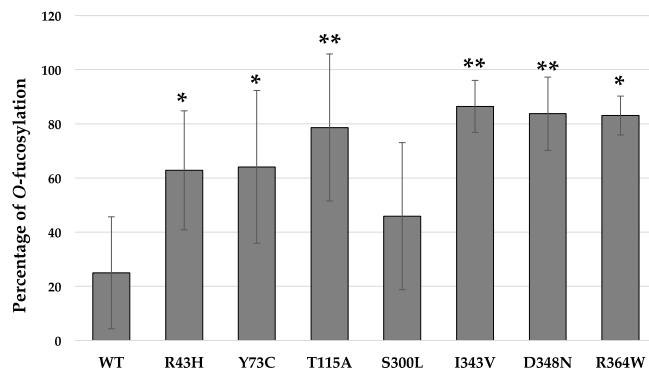


Figure 5. Quantification of the *O*-fucosyltransferase activity of WT POFUT1 and its seven mutated counterparts found in CRC patients. The percentage of *O*-fucosylation was determined from previous MRM-MS analyses based on ratios of peak areas of *O*-fucosylated peptides reported to those of total peptides. Bar graph represented mean of percentage \pm SD. Each experiment was performed three times independently. Statistical significance was assessed using a two-tailed Student test; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. WT.

3. Discussion

POFUT1 was recently shown to exert an essential role in the colorectal progression from precancerous lesions (adenomas) to carcinoma [32]. The overexpression of this *O*-fucosyltransferase, which is an enzyme involved in the modulation of NOTCH signaling activation, was found in CRC from stage I and was associated with tumor progression and metastasis [6]. On the contrary, its silencing in CRC cells led to inhibition of cell proliferation and diminished cell invasion and migration in vitro and in vivo [7]. Besides, *POFUT1* overexpression was found in many other cancers and notably in hepatocellular carcinomas, where it was associated with a poor prognosis [20]. Overall, these results highlighted an undeniable oncogenic activity of POFUT1 in cancer such as CRC.

POFUT1 overexpression was mainly associated with chromosomal amplification, leading to an increased amount of POFUT1 [3,6]. However, little is known about the modulation of POFUT1 activity, potentially caused by missense mutations related to human diseases, including CRC. A recent approach was conducted to determine how POFUT1 missense mutations could impact NOTCH1 signaling (R240A, M262T, S356F and R366W) found in Dowling-Degos disease (DDD), an autosomal dominant genodermatosis [30]. Three of these mutations located at highly conserved positions within or close to the substrate-binding regions (R240A, S356F, and R366W) were deleterious for Notch activity. However, the mutation of the residue M²⁶² (M262T), which is not conserved in all species had no effect. To date, no other such point mutations were reported for POFUT1 in human diseases.

In this study, structure-function studies were carried out for seven POFUT1 mutated variants (R43H, Y73C, T115A, S300L, I343V, D348N, R364W), resulting from point mutations and found in CRC patients according to BioMuta database. According to information found in this database regarding POFUT1, some of these seven residues (R⁴³, T¹¹⁵, D³⁴⁸) were also mutated in other cancers such as uterine cancer (R43C), melanoma (T115A, D348N), and lung cancer (D348Y). These data could emphasize that these residues, including the less conserved residue (T¹¹⁵) among species, are critical for POFUT1 activity and that their mutation could impair its *O*-fucosyltransferase activity.

Using the chemo-enzymatic approach to reveal the *O*-fucosyltransferase activity, we first showed that no mutation found in POFUT1 from CRC patients leads to a loss of enzymatic activity. On the contrary, all POFUT1 variants allowed an efficient azido-fucose transfer to NOTCH1 EGF-LD26. Indeed, the quantification of EGF-LD26 *O*-fucosylation using MRM-MS even highlighted a significant gain-of-function for the mutated POFUT1 variants, except for S300L. This mutation S300L is located in

a region with low levels of conservation among species, namely the 299-304 region corresponding to the end of an α -helix of the Rossmann domain followed by a turn, far away from the catalytic center, as shown in Figure 6a.

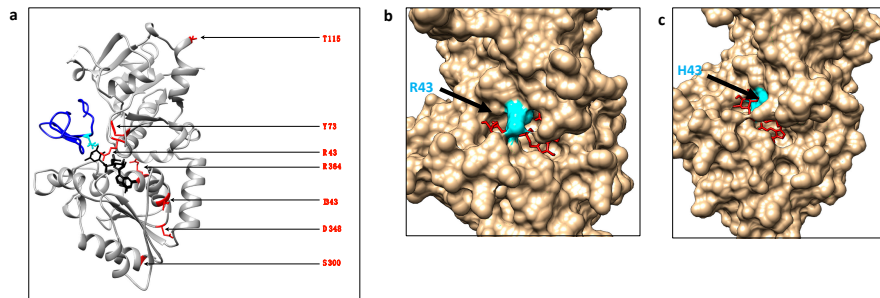


Figure 6. Location of POFUT1 residues mutated in CRC and automatic docking models for WT POFUT1 and R43H variant with GDP-fucose as a ligand. (a) Using Matchmaker of CHIMERA, X-ray structure of human POFUT1 (grey) co-crystallized with GDP-fucose (black) (PDB 5UXH) was superimposed with mouse POFUT1 co-crystallized with EGF-LD 26 (blue) (PDB 5KY4). After removal of mouse POFUT1, residues implicated in CRC mutations were shown with their sidechains (red). (b) Using the COACH-D docking server, we performed automatic molecular docking using the FASTA sequence of WT human POFUT1 as a template and GDP-fucose (in red) as a ligand (donor substrate). The residue R⁴³, located in front of the binding pocket to GDP-fucose, was colored in cyan. (c) In the same way, a structural model was generated for mutated POFUT1 in which the H⁴³ moved to a more deeply buried position in the binding pocket of GDP-fucose, compared to R⁴³ in WT POFUT1. This could lead to a more exposed fucose moiety of the donor substrate to improve fucose transfer to an EGF-LD.

This study describes, for the first time, some mutated human POFUT1 variants as more active than WT POFUT1. To progress in understanding the effects of mutations on POFUT1 activity, especially those close to the GDP-fucose binding cavity (R43H, Y73C), automatic modelling by docking was performed using the COACH-D Server [33,34]. Possible explanations were proposed based on knowledge of interactions between the complex POFUT1/GDP-fucose with EGF-LD [10]. Since POFUT1 R⁴³ residue was known to interact with the fucose moiety of GDP-fucose directly, the meta-server COACH-D was used to predict using molecular docking how the rearrangement of the catalytic cavity of mutated R43H POFUT1 could still allow binding to GDP-fucose without generating steric clashes. Interestingly, the proposed rearrangement (with a confident score of prediction (C-Score) of 0.79) of the binding cavity with a much more deeply buried H⁴³ than R⁴³ in the WT counterpart might result in a more exposed fucose moiety (Figure 6b,c). This led us to think that this new position of the donor substrate could facilitate fucose transfer to EGF-LD. However, a more complex docking would be required if considering the interaction of three molecules, namely POFUT1, GDP-fucose, and EGF-LD. In addition to a potential effect on GDP-fucose binding, the Y73C mutation is likely to affect EGF-LD binding since the equivalent residue in mice (Y⁷⁸) was known to be involved in the interaction with EGF-LD [10,30]. Indeed, a stacking interaction was highlighted between Y⁷⁸ of POFUT1 and the Gly residue of EGF-LD. This effect was observed frequently at the position C²+3 of O-fucosylable hEGFs [10]. While Asp or Glu at this position was shown in the latter study to induce a steric clash and to lead to a weakened interaction, a cysteine at this position (as for the mutation Y73C found in CRC) could establish a hydrogen bond with a EGF-LD reinforcing interaction, thereby leading to increased POFUT1 activity.

We noticed that three mutations (I343V, D348N, R364W) leading to the most increased in vitro POFUT1 activity, with similar O-fucosylation rates ranging from $83.08 \pm 7.17\%$ to $86.45 \pm 9.59\%$ (compared to that of WT POFUT1 of $25.00 \pm 20.68\%$), were all located in the highly-conserved region L341-D367 comprising the substrate-binding region S357-F358. Indeed, these three mutations are in

the same Rossmann domain, relatively close to the binding pocket of GDP-fucose compared to the mutation T115A. Surprisingly, T115A mutation also gave rise to a significant increase of POFUT1 activity towards NOTCH1 EGF-LD26 while S300L did not have any effect. Indeed, T115 appeared to be less conserved among species than S300. We can hypothesize that mutations leading to a gain-of-function for POFUT1 induced a global conformation change favoring the accessibility of binding pocket to GDP-fucose, thereby leading to a more efficient transfer to EGF-LD 26. Additional experiments should be carried out to understand better the molecular interactions between mutated POFUT1 proteins and different EGF-LDs, whose interaction with WT POFUT1 is known. This could shed light on the gain-of-function induced by missense mutations found in POFUT1 from CRC patients. Recently, an increased amount of WT POFUT1, resulting from a chromosomal amplification of the region 20q11.21, was shown in CRC and correlated to tumor progression through NOTCH signaling activation [6]. A gain-of-function for POFUT1 could have similar effects in CRC patients carrying the missense mutations described in this study. In both cases, protein targets of POFUT1 such as NOTCH receptors and their ligands might be affected by POFUT1 overexpression or hyperactivity. This could have led to more *O*-fucose transferred to these protein partners, influencing receptor-ligand interactions, and subsequently, NOTCH signaling activation. However, Notch receptors and ligands are not the only targets of POFUT1. Indeed, they belong to the 87 human proteins identified to have at least one EGF-LD with a potential *O*-fucosylation consensus sequence [35]. Thus, it is likely that other membrane or secreted EGF-LD-containing proteins, predicted to be modified with *O*-fucose, are affected by overexpressed or hyperactive POFUT1 in CRC. It could be interesting to identify specifically, in CRC samples, the proteins affected by increased expression or activity of this ER-resident *O*-fucosyltransferase 1. The identification of these proteins would be helpful to provide more insights into the contribution of POFUT1 to the tumor process.

In view of this study, the presence of these mutations in new CRC patients could be associated with colorectal tumor aggressiveness. Therefore, these mutations support previous studies [6,22] considering POFUT1 as a potential biomarker for CRC and other cancers.

4. Materials and Methods

4.1. Plasmid Constructs to Produce Recombinant EGF-LDs and POFUT1 Variants

Plasmid constructs using pET-25b(+) vector (Novagen, Millipore, MA, USA) for bacterial production of WT NOTCH1 EGF-LDs 12 and 26, as well as their counterparts T/A mutated at their *O*-fucosylation site (T466A and T997A, respectively), were previously described in the Supplementary Materials and Methods [25]. The modified vector named pSec-NtermHis6, used in the latter study and derived from the commercial pSecTag/FRT/V5-His-TOPO vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to express a secreted form of recombinant human POFUT1 with an N-terminal polyhistidine tag. Indeed, human POFUT1 (NP_056167.1) (residues 27-384) cDNA without its signal peptide sequence and its C-terminal KDEL-like motif replaced by a stop codon, was cloned after PCR amplification between *Kpn*I and *Bam*HI sites in the modified vector named pSec-NtermHis6. The resulting plasmid construct referred to as pSec-NtermHis6Pofut1 was used as a template to generate the seven mutated plasmid constructs each carrying a missense mutation found in CRC, using the GENEART® Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's protocol. After nucleotide sequence verification, each plasmid construct was subjected to a cotransfection with pOG44 vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) expressing the Flp recombinase to produce stably transfected Flp-In™ CHO cells (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.2. Cell Culture and Transfection

CHO Flp-In™ cells were cultured in an F12 medium (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% FBS (Biowest, EuroBio, Courtaboeuf, France) and 0.5% penicillin/streptomycin

(Gibco, Carlsbad, CA, USA) and $100 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ of ZeocinTM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), in a humidified atmosphere with 5% CO₂. CHO Flp-InTM cells were cotransfected with 1 μg of plasmid DNA and 10 μg of pOG44 vector by lipofection with X-tremeGENETM DNA Transfection Reagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) according to the manufacturer's protocol. After transfection, the selection was initiated by changing medium with complete F12 medium containing $500 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ of Hygromycin B (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Hygromycin B-resistant cells were then amplified and controlled for production of recombinant POFUT1 variants in culture medium by Western blot.

4.3. Cell Lines

In this study, we used the *E. coli* BL21 strain to produce recombinant peptides EGF-LDs as described in Reference [25]. We also used Flp-InTM CHO cells (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and eight established cell lines corresponding to Flp-InTM CHO cells, stably expressing WT POFUT1 or one of the seven recombinant mutated (R43H, Y73C, T115A, S300L, I343V, D348N, and R364W) POFUT1 variants.

4.4. Protein Production and Purification

Recombinant human WT and mutated POFUT1 variants with an N-terminal polyhistidine tag were produced as secreted proteins by stable Flp-InTM CHO cells. After production during 72 h in serum-free F12 medium, proteins were recovered by centrifugation from cell culture supernatants, concentrated in binding buffer (25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 20 mM imidazole, pH 7.5) and purified on a Ni-NTA column by imidazole gradient using AKTA prime system (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Recombinant WT and T/A mutated EGF-LDs of mouse NOTCH1 were produced in BL21 and purified as previously described in Reference [25]. All purified recombinant proteins used in this study were concentrated through Amicon ultra centrifugal filters 3K or 10K in Tris-CaCl₂ (25 mM Tris, 5 mM CaCl₂, pH 7.5) and quantified using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) with bovine serum albumin as a standard.

4.5. SDS-PAGE and Blotting Techniques

For POFUT1 variants, purified proteins were resolved by SDS-PAGE using 12% polyacrylamide gels and transferred to 0.45 μm nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), for 90 min at 0.8 mA per cm². Membranes were blocked with TBS-T (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6 (TBS), supplemented with 0.1% Tween-20 (*v/v*) and 5% (*w/v*) fat-free milk, for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated with anti-POFUT1 antibody [36], diluted at 1:2000 in TBS with 0.5% Tween-20 (TBS-T_{0.5}) containing 5% (*w/v*) of fat free milk overnight at 4 °C. After three washes with TBS-T_{0.5}, the membranes were incubated with anti-rabbit HRP-conjugated IgG (Dako, Glostrup, Denmark), diluted at 1:3000 in TBS-T_{0.5} containing 2% (*w/v*) non-fat dry milk for 1 h at room temperature. After three washes in TBS-T_{0.5}, proteins were revealed after addition of ECLTM Prime Western blotting detection reagent (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and visualized using an Amersham Imager 600 device (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

After reactions by click chemistry, EGF-LDs were separated on 15% polyacrylamide gel and transferred to 0.2 μm nitrocellulose (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), for 30 min at 0.8 mA per cm². Membranes were blocked with 10% fat-free milk-TBST for 10 min, before being incubated with streptavidin-HRP in TBS-T_{0.5} at 25 ng.mL⁻¹ for 30 min. The membranes were washed three-times before and after streptavidin-HRP incubation with TBST, for 15 min per wash. The membranes were revealed as described above.

4.6. Glycosyltransferase Reaction

Before the CuAAC experiments, glycosyltransferase reactions were carried out with 1 μg of WT POFUT1 or one mutated POFUT1 variant, mixed with 2 nmoles of GDP-azido-fucose (R&D Systems

Inc., Minneapolis, MN, USA) as recommended by the manufacturer (R&D Systems) and 2 µg of purified EGF-LD in 25 µL of reaction buffer (25 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 10 mM MnCl₂, pH 7.5), and then incubated for 1 h or 20 h at 37 °C.

For mass spectrometry analysis, 1 µg of WT or mutated POFUT1 was incubated with 2 µg of purified EGF-LD and 2 nmoles of GDP-fucose in 20 µL of reaction buffer and incubated for 20 h at 37 °C.

4.7. Click Chemistry Reactions

CuAAC was performed using 1.25 mM CuCl₂, 2.5 mM ascorbic acid, and 0.125 mM alkynyl biotin (R&D Systems Inc., MN, USA), directly added to the glycosyltransferase reactions. The mixture was incubated in the dark for 1 h at room temperature.

4.8. Targeted Mass Spectrometry

Proteins were reduced, alkylated, and digested by Glu-C. Resulting peptides were analyzed with a nanoLC 425 in micro-flow mode (Eksigent, Dublin, CA, USA) coupled to a TTOF5600+ mass spectrometer (SCIEX, Framingham, USA) in Information-Dependent Acquisition mode. ProteinPilot 5.0 (SCIEX) was applied to search against the recombinant protein sequence database, and the MRM transition list was established using Skyline 3.5.0 (MacCoss Lab, University of Washington, Seattle, WA, USA). The *O*-fucose was added in silico at the expected position with PeakView software (SCIEX, Framingham, MA, USA), and *m/z* of precursor and fragments were calculated. The data were acquired in high-Resolution MRM mode and processed with MultiQuant Software 3.0.1 (SCIEX, Framingham, MA, USA). Areas were collected for the same most intense fragment of *O*-fucosylated and non-modified peptides, and a ratio of *O*-fucosylation was calculated.

4.9. Alignments and Automatic Molecular Modelling

Alignments of POFUT1 protein sequences were performed with FASTA sequences of POFUT1 from different species, using the Multalin server (<http://multalin.toulouse.inra.fr>) [37]. Using MatchMaker of UCSF CHIMERA (<http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera>) (Resource or Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco, CA, USA, with support from NIH P41-GM103311) [38], mouse NOTCH1 EGF-LD 26, co-crystallized with mouse POFUT1 (PDB 5KY4) [10], was superimposed with co-crystallized human POFUT1 with GDP-fucose (PDB 5UXH) [30]. Docking experiments were made using the COACH-D server (<https://yanglab.nankai.edu.cn/COACH-D/>), FASTA sequences of WT or R43H POFUT1 variant, and GDP-fucose (in sdf format file) as a donor substrate. The proposed model for R43H POFUT1 interacting with GDP-Fucose as a substrate was selected according the best C-score, in Pose^U, and visualized using UCSF CHIMERA.

4.10. Statistical Analyses

All the experiments were performed at least three times independently. Statistical comparisons were achieved using the t-Student test implemented in GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Results were considered statistically significant if the *p*-value was less than 0.05.

5. Conclusions

In conclusion, our findings indicate that among the rare missense mutations affecting POFUT1 and found in patients with colorectal cancer, six of them induced an increase of *O*-fucosyltransferase activity compared to WT POFUT1. These mutated variants could modify the *O*-fucosylation status of POFUT1 protein targets such as NOTCH1 receptor and its ligands, and subsequently promote colorectal cancer.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1430/s1>, Figure S1: Uncropped blots of Figure 2, Figure S2: Uncropped blots of Figure 3a, Figure S3: Uncropped blots of Figure 3b.

Author Contributions: Conceptualization, M.D. and A.M.; Funding acquisition, A.M.; Investigation, M.D., F.P., and S.L.; Methodology, E.P.; Supervision, A.M.; Writing original draft, M.D.; Writing review & editing, F.P., S.L., and A.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by a French Ministry of Higher Education and Research doctoral fellowship to MD. The “Ligue contre le cancer” partly funded the work.

Acknowledgments: We gratefully acknowledge Julien Chabanais for his help with the Firebrowse database. We are grateful to Layla Haymour for her help in English editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Nguyen, H.T.; Duong, H.-Q. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy. *Oncol Lett* **2018**, *16*, 9–18. [\[CrossRef\]](#)
2. Carvalho, B.; Postma, C.; Mongera, S.; Hopmans, E.; Diskin, S.; van de Wiel, M.A.; van Criekinge, W.; Thas, O.; Matthai, A.; Cuesta, M.A.; et al. Multiple putative oncogenes at the chromosome 20q amplicon contribute to colorectal adenoma to carcinoma progression. *Gut* **2009**, *58*, 79–89. [\[CrossRef\]](#)
3. Mackinnon, R.N.; Selan, C.; Wall, M.; Baker, E.; Nandurkar, H.; Campbell, L.J. The paradox of 20q11.21 amplification in a subset of cases of myeloid malignancy with chromosome 20 deletion. *Genes Chromosomes Cancer* **2010**, *49*, 998–1013. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Li, D.; Lin, C.; Li, N.; Du, Y.; Yang, C.; Bai, Y.; Feng, Z.; Su, C.; Wu, R.; Song, S.; et al. PLAGL2 and POFUT1 are regulated by an evolutionarily conserved bidirectional promoter and are collaboratively involved in colorectal cancer by maintaining stemness. *EBioMedicine* **2019**, *45*, 124–138. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Germot, A.; Maftah, A. POFUT1 and PLAGL2 gene pair linked by a bidirectional promoter: The two in one of tumour progression in colorectal cancer? *EBioMedicine* **2019**, *46*, 25–26. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Chabanais, J.; Labrousse, F.; Chaunavel, A.; Germot, A.; Maftah, A. POFUT1 as a Promising Novel Biomarker of Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* **2018**, *10*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Du, Y.; Li, D.; Li, N.; Su, C.; Yang, C.; Lin, C.; Chen, M.; Wu, R.; Li, X.; Hu, G. POFUT1 promotes colorectal cancer development through the activation of Notch1 signaling. *Cell Death & Disease* **2018**, *9*. [\[CrossRef\]](#)
8. Albesa-Jové, D.; Guerin, M.E. The conformational plasticity of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2016**, *40*, 23–32. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Lira-Navarrete, E.; Valero-González, J.; Martínez-Júlvez, M.; Tejero, T.; Merino, P.; Panjikar, S.; Hurtado-Guerrero, R. Structural Insights into the Mechanism of Protein O-Fucosylation. *PLoS One* **2011**, *6*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Li, Z.; Han, K.; Pak, J.E.; Satkunarajah, M.; Zhou, D.; Rini, J.M. Recognition of EGF-like domains by the Notch-modifying O-fucosyltransferase POFUT1. *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 757–763. [\[CrossRef\]](#)
11. Lorient, C.; Audfray, A.; Dupuy, F.; Germot, A.; Maftah, A. The two N-glycans present on bovine Pofut1 are differently involved in its solubility and activity. *FEBS J.* **2007**, *274*, 1202–1211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Moloney, D.J.; Panin, V.M.; Johnston, S.H.; Chen, J.; Shao, L.; Wilson, R.; Wang, Y.; Stanley, P.; Irvine, K.D.; Haltiwanger, R.S.; et al. Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch. *Nature* **2000**, *406*, 369–375. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Panin, V.M.; Shao, L.; Lei, L.; Moloney, D.J.; Irvine, K.D.; Haltiwanger, R.S. Notch ligands are substrates for protein O-fucosyltransferase-1 and Fringe. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 29945–29952. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Arboleda-Velasquez, J.F.; Rampal, R.; Fung, E.; Darland, D.C.; Liu, M.; Martinez, M.C.; Donahue, C.P.; Navarro-Gonzalez, M.F.; Libby, P.; D’Amore, P.A.; et al. CADASIL mutations impair Notch3 glycosylation by Fringe. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 1631–1639. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Kakuda, S.; Haltiwanger, R.S. Deciphering the Fringe-Mediated Notch Code: Identification of Activating and Inhibiting Sites Allowing Discrimination between Ligands. *Dev. Cell* **2017**, *40*, 193–201. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Siebel, C.; Lendahl, U. Notch Signaling in Development, Tissue Homeostasis, and Disease. *Physiol. Rev.* **2017**, *97*, 1235–1294. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Okamura, Y.; Saga, Y. Pofut1 is required for the proper localization of the Notch receptor during mouse development. *Mechanisms of Development* **2008**, *125*, 663–673. [\[CrossRef\]](#)
18. Shi, S.; Stahl, M.; Lu, L.; Stanley, P. Canonical Notch Signaling Is Dispensable for Early Cell Fate Specifications in Mammals. *Mol. Cell Biol.* **2005**, *25*, 9503–9508. [\[CrossRef\]](#)

19. Oka, C.; Nakano, T.; Wakeham, A.; Okazaki, S.; de la Pompa, J.L.; Mori, C.; Sakai, T.; Kawaichi, M.; Shiota, K.; Mak, T.W.; et al. Disruption of the mouse RBP-J kappa gene results in early embryonic death. *Development* **1995**, *121*, 3291–3301.
20. Ma, L.; Dong, P.; Liu, L.; Gao, Q.; Duan, M.; Zhang, S.; Chen, S.; Xue, R.; Wang, X. Overexpression of protein O-fucosyltransferase 1 accelerates hepatocellular carcinoma progression via the Notch signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *473*, 503–510. [[CrossRef](#)]
21. Dong, S.; Wang, Z.; Huang, B.; Zhang, J.; Ge, Y.; Fan, Q.; Wang, Z. Bioinformatics insight into glycosyltransferase gene expression in gastric cancer: POFUT1 is a potential biomarker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *483*, 171–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yokota, S.; Ogawara, K.; Kimura, R.; Shimizu, F.; Baba, T.; Minakawa, Y.; Higo, M.; Kasamatsu, A.; Endo-Sakamoto, Y.; Shiiba, M.; et al. Protein O-fucosyltransferase 1: A potential diagnostic marker and therapeutic target for human oral cancer. *Int. J. Oncol.* **2013**, *43*, 1864–1870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wan, G.; Tian, L.; Yu, Y.; Li, F.; Wang, X.; Li, C.; Deng, S.; Yu, X.; Cai, X.; Zuo, Z.; et al. Overexpression of Pofut1 and activated Notch1 may be associated with poor prognosis in breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *491*, 104–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Rampal, R.; Arboleda-Velasquez, J.F.; Nita-Lazar, A.; Kosik, K.S.; Haltiwanger, R.S. Highly conserved O-fucose sites have distinct effects on Notch1 function. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 32133–32140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Pennarubia, F.; Pinault, E.; Maftah, A.; Legardinier, S. In vitro acellular method to reveal O-fucosylation on EGF-like domains. *Glycobiology* **2019**, *29*, 192–198. [[CrossRef](#)]
26. Dingerdissen, H.M.; Torcivia-Rodriguez, J.; Hu, Y.; Chang, T.-C.; Mazumder, R.; Kahsay, R. BioMuta and BioXpress: Mutation and expression knowledgebases for cancer biomarker discovery. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46*, D1128–D1136. [[CrossRef](#)]
27. Wu, T.-J.; Shamsaddini, A.; Pan, Y.; Smith, K.; Crichton, D.J.; Simonyan, V.; Mazumder, R. A framework for organizing cancer-related variations from existing databases, publications and NGS data using a High-performance Integrated Virtual Environment (HIVE). *Database (Oxford)* **2014**, *2014*, bau022. [[CrossRef](#)]
28. Pan, Y.; Karagiannis, K.; Zhang, H.; Dingerdissen, H.; Shamsaddini, A.; Wan, Q.; Simonyan, V.; Mazumder, R. Human germline and pan-cancer variomes and their distinct functional profiles. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 11570–11588. [[CrossRef](#)]
29. Lira-Navarrete, E.; Hurtado-Guerrero, R. A perspective on structural and mechanistic aspects of protein O-fucosylation. *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* **2018**, *74*, 443–450. [[CrossRef](#)]
30. McMillan, B.J.; Zimmerman, B.; Egan, E.D.; Lofgren, M.; Xu, X.; Hesser, A.; Blacklow, S.C. Structure of human POFUT1, its requirement in ligand-independent oncogenic Notch signaling, and functional effects of Dowling-Degos mutations. *Glycobiology* **2017**, *27*, 777–786. [[CrossRef](#)]
31. Sherwood, C.A.; Eastham, A.; Lee, L.W.; Risler, J.; Mirzaei, H.; Falkner, J.A.; Martin, D.B. Rapid optimization of MRM-MS instrument parameters by subtle alteration of precursor and product m/z targets. *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 3746–3751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Komor, M.A.; de Wit, M.; van den Berg, J.; Martens de Kemp, S.R.; Delis-van Diemen, P.M.; Bolijn, A.S.; Tijssen, M.; Schelfhorst, T.; Piersma, S.R.; Chiasserini, D.; et al. Molecular characterization of colorectal adenomas reveals POFUT1 as a candidate driver of tumor progression. *Int. J. Cancer* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wu, Q.; Peng, Z.; Zhang, Y.; Yang, J. COACH-D: Improved protein-ligand binding sites prediction with refined ligand-binding poses through molecular docking. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W438–W442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Yang, J.; Roy, A.; Zhang, Y. Protein-ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 2588–2595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Schneider, M.; Kumar, V.; Nordstrøm, L.U.; Feng, L.; Takeuchi, H.; Hao, H.; Luca, V.C.; Garcia, K.C.; Stanley, P.; Wu, P.; et al. Inhibition of Delta-induced Notch signaling using fucose analogs. *Nat Chem Biol* **2018**, *14*, 65–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Der Vartanian, A.; Audfray, A.; Al Jaam, B.; Janot, M.; Legardinier, S.; Maftah, A.; Germot, A. Protein O-Fucosyltransferase 1 Expression Impacts Myogenic C2C12 Cell Commitment via the Notch Signaling Pathway. *Mol Cell Biol* **2015**, *35*, 391–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Corpet, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **1988**, *16*, 10881–10890. [[CrossRef](#)]
38. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **2004**, *25*, 1605–1612. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ST3GAL2 Knock-Down Decreases Tumoral Character of Colorectal Cancer Cells *in vitro* and *in vivo*

Marlène Deschuyter, David Yannick Leger, Anne Verboom, Alain Chaunavel, Abderrahman Maftah, Jean-Michel Petit

American Journal of Cancer Research (AJCR), **2021**

Impact Factor 2020 : 6.166

La sialylation, assurée par des sialyltransférases, est une modification post-traductionnelle essentielle dans la vie d'une cellule. De nombreuses sialyltransférases sont impliquées dans la tumorigenèse et même dans les phénomènes de résistance aux agents anti-tumoraux. Une analyse fine des bases de données RNA-Seq (Firebrowse) nous a permis d'évaluer l'expression de chacun des 20 gènes codant une sialyltransférase chez 623 patients atteints de cancers colorectaux et dans 51 tissus sains. Il s'avère que *ST3GAL2* est la seule sialyltransférase significativement surexprimée dans les tissus tumoraux colorectaux. Capable de sialyler en α 2-3 à la fois des glycoprotéines et des glycolipides, cette enzyme est principalement étudiée ces dernières années par le suivi de son principal produit : le globoside SSEA-4 (Saito et al. 2003). Aucune cible protéique de *ST3GAL2* n'est connue actuellement. SSEA-4 a été étudié dans plusieurs cancers : le cancer du sein où des cellules exprimant cet épitope à leur surface seraient plus résistantes à des agents anti-tumoraux comme la cisplatine ou le 5-fluorouracile (Aloia et al. 2015) ; le cancer de la prostate où un KD de *ST3GAL2* dans un modèle cellulaire provoque une diminution significative de l'adhésion des cellules à différents composants de la matrice extracellulaire comme les collagènes I, IV et la laminine (Sivasubramanian et al. 2015). SSEA-4 et de ce fait *ST3GAL2* sont impliqués dans la tumorigenèse, cependant on ignore encore par quels mécanismes. De plus, *ST3GAL2* n'a pas encore été étudiée dans le contexte du cancer colorectal.

En collaboration avec le Centre de Ressources Biologiques du CHU de Limoges, nous avons pu confirmer la surexpression de *ST3GAL2* dans les tissus cancéreux colorectaux et la comparer à celle des tissus sains issus des mêmes patients.

Mon travail a également consisté à déréguler l'expression de *ST3GAL2* dans une lignée colorectale représentant un stade 2 du CCR : la lignée HT29. Après avoir obtenu une population cellulaire sous-exprimant significativement *ST3GAL2*, ces cellules ont été caractérisées *in vitro* dans un premier temps avec d'abord l'évaluation de l'expression de SSEA-4 puis des tests de

prolifération, migration et d'invasion cellulaires, ainsi que des analyses du cycle cellulaire et de l'apoptose. Il s'avère que le KD de *ST3GAL2* dans la lignée HT29, diminue l'expression de son produit SSEA-4, altère significativement les capacités tumorales des cellules et favorise significativement l'apoptose *in vitro*. Puis ces cellules ont fait l'objet de xéno greffes chez des souris nude afin d'étudier leur comportement *in vivo*. Les cellules KD pour *ST3GAL2* forment des tumeurs de taille et de poids inférieurs aux tumeurs issues des cellules contrôles.

En conclusion, ce travail montre pour la première fois l'implication de *ST3GAL2* dans la tumorigenèse colorectale. Nous supposons que des patients possédant une plus forte expression de *ST3GAL2* seraient plus aptes à développer une tumeur colorectale via une hypersialylation par *ST3GAL2*, favorisant la prolifération et la migration des cellules et leur résistance à la mort cellulaire.

Original Article

ST3GAL2 knock-down decreases tumoral character of colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo*

Marlène Deschuyter¹, David Yannick Leger², Anne Verboom¹, Alain Chaunavel³, Abderrahman Maftah¹, Jean-Michel Petit¹

¹PEIRENE Laboratory, EA 7500, Glycosylation and Cell Differentiation, Faculty of Sciences and Technology, University of Limoges, Limoges F-87060, France; ²PEIRENE Laboratory, EA 7500, Faculty of Pharmacy, University of Limoges, Limoges 87025, France; ³Department of Pathology, Limoges University Hospital, Limoges 87042, France

Received June 23, 2021; Accepted July 23, 2021; Epub September 15, 2021; Published September 30, 2021

Abstract: Tumor cells have a modified glycosylation profile that promotes their evolution and/or their maintenance in the tumor. Sialylation is a type of glycosylation that is often altered in cancers. RNA-Seq database analysis revealed that the sialyltransferase gene *ST3GAL2* is significantly overexpressed at all stages of colorectal cancer (CRC). *ST3GAL2* sialylates both glycoproteins and glycolipids. The aim of this work was to investigate the involvement of *ST3GAL2* in CRC. Using the HT29 tumor cell line derived from a stage II of CRC, we decreased the expression of *ST3GAL2* by specific shRNA, and then characterized these cells by performing functional tests. We found that *ST3GAL2* knock down (KD) significantly decreases tumor cell proliferation, cell migration and invasiveness properties *in vitro*. The cell cycle of these cells is affected with a change in cell cycle distribution and an increase of cell apoptosis. The effect of *ST3GAL2* KD was then studied *in vivo*, following xenografts into nude mice, in which the tumor progression was significantly reduced. This work demonstrates that *ST3GAL2* is a major player in the behavior of colorectal tumor cells, by modifying the sialylation state of glycoproteins and glycolipids which remain to be specifically identified.

Keywords: *ST3GAL2*, colorectal cancer, HT29, xenografts, biopsies

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most diagnosed cancer worldwide all sex confounded (second in females and third in males), with 1.9 million new cases in 2020 (representing 10% of new cancer cases) and 935,173 deaths (World Health Organization). CRC develops in 5 main stages (0 to IV). A tumor is a heterogeneous mass of cells which are characterized by numerous changes like "Warburg Phenomenon" [1], a constitutive activation of different growth factors [2], a lower apoptosis through resistance to mitochondrial membrane permeabilization, or a deregulated replicative potential [3]. In addition to these metabolic disorders, it should be noted that cancer cells present important glycosylation changes. Glycosylation is the most important post-translational modification (PTM). The carbohydrate

formation results from coordinated actions of glycosyltransferases and glycosidases occurring mainly in endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus [4-6]. The majority of mammal proteins are glycosylated and these glycoproteins play important roles in many cell functions like pluripotency, cell-cell communication and interaction, protein folding, embryogenesis or cell death [7-10]. PTM are also known to participate to tumor process [11-13]. Abnormal glycosylation of proteins and/or lipids may increase tumorigenesis. This is the case, for example, for Notch receptor whose abnormal glycosylation by protein O-fucosyltransferase 1 (POFUT1) promotes CRC process by an enhanced Notch signaling [14]. In gastric and colorectal cancers, overexpression of POFUT1 could be a potential biomarker [15, 16]. Some glycosylation alterations are known in CRC [17], particularly fucosylation and sialylation which increase in colorec-

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

tal tumors, and in other cancers such as lung and oral cancers [18]. Indeed, a global sialylation modification occurs in CRC [19] and some abnormal sialylations contribute to apoptosis dysregulation. For example, abnormal α -2,6 sialylation of Fas receptor by ST6GAL1 prevents apoptosis through inhibition of the association of Fas tails with FADD (Fas-associated protein with Death Domain) and a decrease of caspase 8 activation in colon carcinoma [20]. In ovarian cancer cell lines, a decrease in α -2,3 sialylation by a knock-down of ST3GAL3 promotes apoptosis and increases sensitivity to cisplatin, an apoptosis inducer [21]. Sialyltransferase superfamily includes 20 members classified in four families: the members of the ST3GAL family transfer a sialic acid to a galactose residue through an α 2,3-linkage [22]; sialic acid is transferred to galactose through an α 2,6-linkage by ST6GAL family members [23]; the members of ST6GALNAC family transfer a sialic acid to a *N*-acetyl-galactosamine through an α 2,6-linkage [24]; and sialic acid is transferred to another sialic acid through an α 2,8-linkage by ST8Sia family members [25].

It appears that some sialyltransferases, such as ST6GAL1 or ST6GALNAC1 as well as members of ST3GAL family, are overexpressed in CRC and lead to aberrant *N*-glycans and to the emergence of sTn, sLe^a and sLe^x antigens. sLe^a is thus recognized as a CRC biomarker but with low sensitivity [26, 27].

ST6GAL1 gene is known to be overexpressed in early stage of CRC. This abnormal sialylation promotes tumorigenesis by adding sialic acid on several membrane glycoproteins, mostly responsible of cell movement, cell death/survival and cell growth [28]. Recently ST6GALNAC1 was shown to be overexpressed in colorectal cancer stem cells (CSC) and to promote chemotherapy resistance of these cells by Akt pathway activation [29].

ST3GAL2 is an enzyme (EC 2.4.99.2) found in Golgi apparatus and known to add sialic acid on both *O*-glycoproteins and gangliosides, with a preference for the latter [30-32] and more particularly GD1a and GT1b [33]. The main interest in ST3GAL2 arose from one of its product, the Stage Specific Embryonic Antigen-4 (SSEA-4), a glycosphingolipid (GSL) only synthesized by ST3GAL2 [34, 35]. This globo-serie ganglioside

was originally studied in embryonic tissues and turns out to be a biomarker for several cancers, such as hepatocellular carcinoma where ST3GAL2 is overexpressed [36]. In prostate tumor, it appears that cells that express SSEA-4 have a fibroblastic rather than epithelial profile [37]. In breast cancer, ST3GAL2 overexpression lead to an increase of SSEA-4 antigen and to a chemotherapy resistance of tumor cells [38]. This GSL has been studied in glioblastoma too, where it could be a biomarker of a high grade glioblastoma [39]. All these studies targeted SSEA-4, i.e. the product of ST3GAL2, but none focused on the enzyme ST3GAL2 itself.

In this study, we used RNA-seq informations present in databases to detect an overexpression of ST3GAL2 in colorectal tumors. After knock-down (KD) by shRNA of ST3GAL2 in HT29 cell line, we performed *in vitro* functional tests with shST3GAL2 cells. We observed a decrease in proliferation, migration and invasion abilities of shST3GAL2 cells compared to parental cells. We also observed an increase of apoptosis and a dysregulation of cell distribution in phases of cell cycle. *In vivo*, these cells led to a dramatic reduction of tumor size when xenografted into nude mice. This study demonstrated for the first time the ST3GAL2 implication in colorectal tumor progression *in vitro* and *in vivo*.

Materials and methods

The cancer genome atlas data analysis

Data of colorectal cancer were extracted from FireBrowse database (<http://www.firebrowse.org>). A total of 626 tumor samples and 51 normal samples were studied. Gene expression levels were merged from COADREAD.uncv2.mRNAseq_RSEM_normalized_log2.txt found in COADREAD.mRNAseq_Preprocess.Level file. Clinical features for each patient were determined from "CLI_years_to_birth", "CLI_tumor_tissue_site", "CLI_pathologic_stage", and "CLI_gender" extracted from COADREAD-TP.samplefeatures.txt available in COADREAD-TP; Aggregate_AnalysisFeatures.Level metadata.

Cell culture and transfection

Human CRC HT29 cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (Biowest, Eurobio, Courtaboeuf, France) and 0.5% (v/v) penicillin/streptomycin (Gibco, Carlsbad, CA, USA). Cell line was cultivated at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂. A first group of cells was transfected with 1.6 µg of a pool of 3 target-specific lentiviral vector plasmids each encoding 19-25 nucleotides shRNA designed to knock-down ST3GAL2 gene (sc-93118-SH, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). A second group of cells was transfected with 1.6 µg of a negative control shRNA Plasmid-A, encoding a scrambled shRNA sequence that will not lead to the specific degradation of any cellular mRNA (sc-108060, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA). The transfections were carried out according to manufacturer's protocol using X-TremGENE™ DNA Transfection Reagent (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Each used plasmid contains a puromycin resistance gene for the selection of cells stably expressing shRNAs. Selection was initiated by changing medium with complete DMEM containing 2 µg.ml⁻¹ of puromycin (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), and then we obtained HT29-shST3GAL2 pool population. A clonal selection was performed with limited dilution method. Cells selected with puromycin were seeded in 96-well plate until get one cell per well. Each unique cell was grown separately in presence of puromycin until obtention of a clonal population.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using RNeasy® Mini Kit (QIAGEN®, Hilden, Germany) and 2 µg RNA were retro-transcribed using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems™, California, USA) according to manufacturers's instructions. Quantitative PCR was performed in 96-well plates (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), using 20 ng cDNA, 10 µl Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 1 µl Taqman™ probe against ST3GAL2 (HS0019-9480-m1) or 18S (HS99999901-s1) and H₂O up to a final volume of 20 µL. Then, the following program was applied: 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, then 40 cycles (15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C, fol-

lowed by a fluorescence measurement). Fluorescence was quantified using QuantStudio™ Design and Analysis Software v1.3 (AB ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Relative quantity was calculated using the ΔΔCt method.

SSEA-4 detection by immunofluorescence

HT29-shST3GAL2 and HT29-shctrl cells were fixed with 4% paraformaldehyde (16% Formaldehyde Solution (w/v) methanol-free, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) in PBS for 15 minutes at room temperature and permeabilized with HEPES Triton buffer (20 mM HEPES, 300 mM sucrose, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100 (v/v), pH 7.4) for 30 minutes at 4°C. After 3 washes with PBS, non-specific binding sites were saturated for 1 h at room temperature with a blocking solution (PBS complemented with 10% (v/v) goat serum, 1% BSA (w/v), 0.1% Triton X-100 (v/v)). After one wash with PBS buffer containing 0.2% BSA (w/v), immunolabelling was performed with anti SSEA-4 antibody (MC813 ab16287, Abcam, Cambridge, UK) diluted at 1:400 and PNA lectin (Peanut Agglutinin; DIG Glycan Differentiation Kit, Roche, Mannheim, Germany), which recognizes the disaccharide Galβ(1-3)-GalNAc diluted at 1:200 in PBS buffer containing 1% BSA (w/v) overnight at 4°C. After two washes with PBS buffer containing 0.2% BSA (w/v) and 0.1% Tween-20 (v/v), cells were incubated with the secondary antibody Alexa fluo® 546 conjugated (F(ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L), Molecular probes by Life Technologies, Eugene, Oregon, USA), and with the anti-digoxygenin Dylight 288 (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) used at 1:1000 in PBS-BSA for 15 minutes in dark at 37°C. After washes, nuclei were stained with DAPI (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 1 µg.ml⁻¹ in PBS, 5 minutes at room temperature in the dark. After three washes in PBS, cells were mounted on glass slides with Mowiol and sealed with glass coverslips. We used MetaMorph software (Molecular Devices, California, USA) to acquire images with a LEICA microsystem DMI6000B inverted epifluorescence microscope.

ST3GAL2 detection by immunohistochemistry

Paraffin-embedded blocks of four colorectal adenocarcinomas corresponding to four CRC

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

clinical stages were obtained from the Tumor Bank (CRBiolim) of Limoges University Hospital. All samples were used in accordance with French bioethics laws regarding patient information and consent. Ethics approval (CRB-CESSION-2019-003) was obtained from the bioethics committee of the University Hospital Center of Limoges ("Comité médico-scientifique de la tumorothèque de l'Hôpital Dupuytren"). Immunohistochemical analysis was performed on five- μm -thick paraffin sections with anti-ST3GAL2 antibody (1/25, ab254726, Abcam, Cambridge, UK). Slides were automatically processed (Ventana Benchmark ULTRA, Roche, Meylan, France) according to the protocol supplied by the manufacturer. Hematoxylin/Eosin/Saffron (HES) staining was used for histological analyses, while Ki67 staining was used to assess cell proliferation. HES staining was performed with Tissue Tek (Sakura, Alphen aan den Rijn, Netherlands), Ki67 staining with BenchMark Ultra Ventana (Roche Diagnostics, Meylan, France). Images were acquired with NanoZoomer RS 2.0 Hamamatsu (Hamamatsu Photonics, Massy, France).

Cell migration assay

Cell migration assay was performed in a two wells silicone insert to generate a defined cell-free gap (Culture, Insert 2 well, Ibidi, Germany). Cells in suspension after trypsinization (70 μl) were put in each well. When cells reached confluence, the insert was removed, and cells were cultivated in a 1% FBS (v/v) DMEM. Measurements of the gap size were performed every day using ImageJ software [40].

Cell invasion transwell assay

Cell invasion assay was performed in a transwell chamber system as described before [41]. Briefly, the membrane (upper side) of transwell chamber (Transwell® Permeable Supports 6.5 mm Insert, 24 Well Plate, 8.0 μm polycarbonate Membrane, Costar®, Corning Incorporated, USA) was precoated with 0.5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ matrigel (Corning® Matrigel® Basement Membrane Matrix, 354234, Discovery Labware, Inc., Two Oak Park, Bedford, USA), and cells (1×10^5) were placed in the top chamber. A serum-free medium solution (100 μl) was added in the top chamber, and the lower chamber was loaded with 750 μl of DMEM with 10% FBS (v/v). Cells were incubated during 24 h,

48 h, 72 h and 96 h at 37°C with 5% CO_2 . Transwell chambers were washed twice with PBS, and cells were fixed with 4% (w/v) paraformaldehyde in PBS during 15 minutes at room temperature. After two washes with PBS, cells were stained with crystal violet 0.2% (w/v) during 15 minutes at room temperature, then cells which remained on the membrane (top chamber side) were wiped out with a cotton swab before observation with binocular magnifying glass Nikon SNZ-745, membranes were illuminated with SCHOTT KL 1600 LED.

In vitro apoptosis detection

A first analysis of apoptosis was made using the Cell Death Detection ELISA^{PLUS} kit (Roche Diagnostics, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO 63103 USA) as previously described [42]. Chromatin fragments released from the nucleus during apoptosis were quantified from cytosol extracts, which were obtained according to the manufacturer's protocol.

Apoptosis was also evaluated by flow cytometry using double staining with Annexin V and propidium iodide. Cells (250,000) were centrifuged 10 min at 140 g then washed with 1 ml of PBS/ Ca^{2+} . After a second centrifugation, cells were resuspended into 100 μl of PBS/ Ca^{2+} and 5 μl of Annexin V (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) were added. After 15 min incubation in dark, 200 μl of PBS/ Ca^{2+} were added. Cells were then labelled with propidium iodide (0.5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) and 10,000 cells were immediately analyzed with a FACSCalibur (Becton Dickinson) cytometer.

In vitro spheroid formation

Spheroid formation was assessed using Nunclon Sphera 96U Bottom Plate (ThermoScientific™, Rockford, IL, USA). Five hundred cells, into free FBS DMEM medium were seeded per well. The plate was centrifuged 5 min at 1200 g at room temperature, then incubated at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO_2 for 5 days. Pictures were taken every 24 hours, and perimeters were calculated using ImageJ software.

Protein extraction and western blots

Colorectal tumor and normal tissue samples were first ground in presence of liquid nitrogen.

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

Then total proteins were extracted by solubilizing shredded tissues in a RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 (v/v), 0.5% sodium deoxycholate (w/v), 0.1% sodium dodecylsulfate (v/v), pH 8) containing a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) for 2 h at 4°C. Total proteins from cell cultures were prepared by solubilizing cell pellets in the same RIPA lysis buffer for 2 h at 4°C. All lysates were centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C, and the protein concentration in supernatant was determined using Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo-Scientific™, Rockford, IL, USA) with bovine serum albumin as a standard. Equal amounts of proteins (50 µg) were resolved by SDS-PAGE using 12% (v/v) polyacrylamide gels for 1 h at 24 mA. Proteins were transferred onto Amersham™ Protra® premium 0.45 µm nitrocellulose membrane (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) for 1 h 30 min at 0.8 mA/cm². Membranes were blocked with TBST (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6, 0.1% Tween-20 (v/v)) supplemented with 5% (w/v) non-fat dry milk during 1 h at room temperature, then incubated with mouse anti-ST3GAL2 antibody (ST3Gal II (34-K) sc-100856, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA) diluted at 1:1000 in TBST, 2% (w/v) non-fat dry milk or goat anti-GAPDH antibody (AF5718, R&D Systems Minneapolis, USA) diluted at 1:2000 in TBST, 2% (w/v) non-fat dry milk, overnight at 4°C. After three washes with TBST, membranes were incubated with secondary antibodies (anti-goat or anti-mouse HRP-conjugated IgG, Dako, Santa Clara, USA) diluted at 1:2000 in TBST, 2% (w/v) non-fat dry milk for 1 h at room temperature. After three washes in TBST, reactive proteins were visualized with ECL™ Prime Western blotting system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). For detection and relative quantification of band intensities, we used Amersham Imager 600 device (GE Healthcare, Uppsala, Sweden).

Cell cycle analysis by flow cytometry

Cells (2×10^6) were collected and centrifuged twice at 140 g for 10 minutes and pellet was resuspended with 2 ml of cold PBS. After a third centrifugation at 140 g for 10 minutes, cells were resuspended in 300 µl of cold PBS and rapidly fixed with 700 µl of cold ethanol (96%). Fixed cells were preserved at -20°C

overnight. After three washes by centrifugation with 2 ml of cold PBS, cells were resuspended in 1 ml of PBS and treated with RNase A (Roche Diagnostics, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO 63103 USA) at 20 units/ml (w/v) for 20 minutes at room temperature. Cells were then labelled with propidium iodide (0.5 mg·ml⁻¹) and 20,000 cells were immediately analyzed by a FACSCalibur (Becton Dickinson) flow cytometer. To determine the percentage of cells analyzed in each phase of the cell cycle, we used the Modfit software.

Tumor xenograft in mice

To establish a subcutaneous xenograft model of human CRC, two groups of mice, each composed of 5 four-week-old female Balb/c nude mice, were used. Mice of the first group were xenografted with 5×10^5 HT29-shctrl cells in 100 µL of 50/50 PBS-matrigel, injected subcutaneously in each side of the dorsal region. Mice of the second group, were xenografted with 5×10^5 HT29-shST3GAL2 cells in 100 µL of 50/50 PBS-matrigel, injected in the same way. We measured tumor dimensions every three days by a caliper and calculated the volume with the formula ($V = 4\pi/3 \times LW^2/8$, where L is tumor length and W is tumor width) [43]. All mice were sacrificed on day 41 and tumors were harvested and weighted. Six tumors from HT29-shctrl cells and 7 tumors from HT29-shST3GAL2 cells were fixed in 4% paraformaldehyde to prepare paraffin sections. HES and Ki67 stainings were used as described in the previous section.

Ethical statement

Institutional review board approval was obtained from the Regional Animal Experimentation Ethics Committee (approval number: APAFIS 23 8 13). All animal experiments and experimental protocols were in accordance with the recommendations of the European Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) on the protection of animals used for scientific purposes. All efforts were made to reduce the number of animals used and to ensure their optimal conditions of well-being before and during each experiment.

Statistical analyses

Difference in sialyltransferase expression between normal and tumoral tissues were com-

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

pared using Kruskal-Wallis test, performed with Past4 software and expressed as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Results were expressed as the mean of log₂ RSEM (RNA-Seq by Expectation-Maximization) extracted from Firebrowse database (see section 4.1) \pm standard error of the mean (SEM). The same statistical tests were used to compare ST3GAL2 gene expression levels according to gender, age and tumor location. (25 patients were not assigned for any CRC stage, so they were not included in this comparison).

For experiments performed in triplicate, statistical significance was evaluated by the two-tailed unpaired Student's t-test and expressed as: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. All quantitative results were expressed as the mean \pm standard deviation (SD) of separate experiments. These statistical analyses were performed using GraphPad Prism 7.

Results

ST3GAL2 is overexpressed in colorectal tumors

We used the FireBrowse database to investigate the role of ST3GAL2 overexpression during colorectal cancer progression. This database contains RNAseq data from 626 patients with colorectal tumors and 51 colorectal normal tissues. The average age of patients is 66.3 years, with a repartition of 53% men and 47% women. We first investigated all sialyltransferase gene expression in colorectal tumor tissues. When we analyze the transcript amounts for each sialyltransferase gene, it appears that fifteen sialyltransferases are down-expressed in tumoral tissues compared to normal tissues (black stars). For four sialyltransferases, no difference has been found, and only ST3GAL2 gene is significantly overexpressed (red stars) in colorectal tumors compared to normal tissues (**Figure 1A**). ST3GAL2 is poorly documented in cancers. Among the 626 patients, there is no correlation between ST3GAL2 expression and tumor location (colon vs rectum), gender or age of the patients (**Table 1**). ST3GAL2 is overexpressed from stage I ($P < 0.001$; **Figure 1B**), and its overexpression slightly increased at stages III and IV.

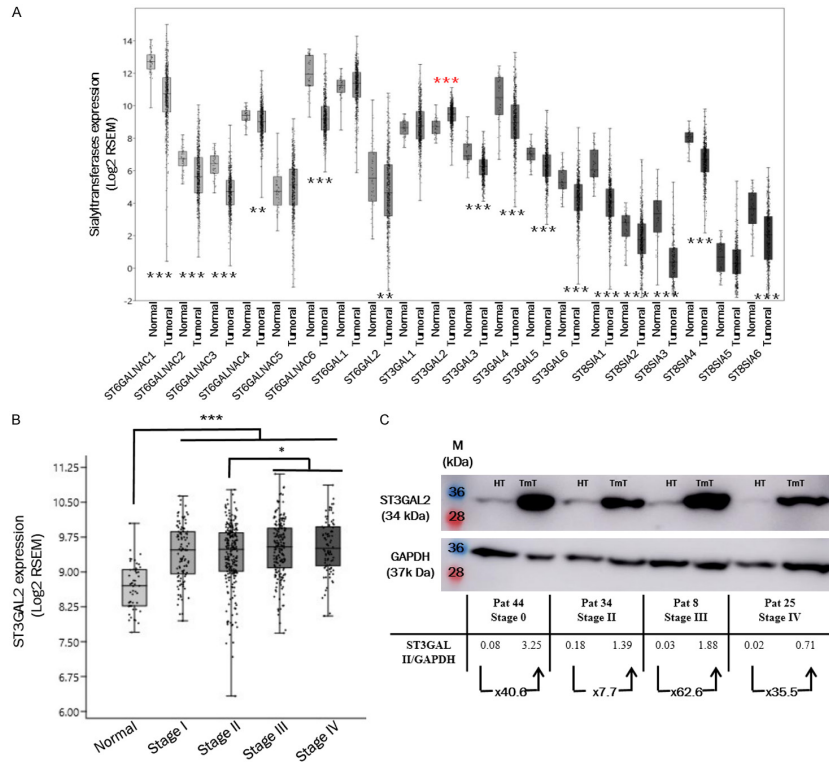
To confirm the overexpression of ST3GAL2 at the protein level, we performed western blots

on colorectal tumor frozen samples corresponding to different clinical stages and on healthy frozen samples from the same patients using anti-ST3GAL2 antibody. Unfortunately, no biopsies from stage I were available, and the data concerning this stage are missing. ST3GAL2 appeared clearly overexpressed in tumor compared to normal tissues (at least 7.7-fold) whatever the stage analyzed (**Figure 1C**). The anti-ST3GAL2 antibody was also used for immunohistochemistry on FFPE (formalin-fixed, paraffin-embedded) paired samples. Regardless of the stage studied, there is a more intense ST3GAL2 labelling (brown staining in the Luberkuhnen glands) into tumor section compared to healthy section where there is no ST3GAL2 labelling except in the lymphocytes surrounding the Luberkuhnen glands (**Figure 2**). In normal tissue, Ki67 (a proliferation marker) staining was consistent with the proliferative nature of colonic epithelium (**Figure 3**). Cell proliferation was observed, via Ki67 staining, in the bottom of intestinal crypts as already described [44]. However, in tumor tissues this polarity was abolished and Ki67 staining was more pronounced compared to healthy section (**Figure 3**), which is in line with the proliferative nature of tumoral tissue. Histological analyses with HES (Hematoxylin Eosin Saffron) staining revealed a loss of glandular architecture and a loss of goblet cell differentiation in tumor section compared to normal section (**Figure 3**). ST3GAL2 is overexpressed regardless the stage, and this overexpression is associated to a tissue destructuring. These results suggest that ST3GAL2 may be implicated in colorectal tumor progression.

ST3GAL2 KD decreased tumoral capacities in vitro

To assess the contribution of ST3GAL2 in tumor evolution, we chose to use HT29, a CRC stage II-derived cell line which represents an intermediary stage, between initiation and metastatic stages of tumor. HT29 cell line knock-down (KD) for ST3GAL2 was established using a mix of 3 shRNA. We obtained a polyclonal population of KD cells (pool) with an approximately 60% decrease of ST3GAL2 expression. After clonal selection, we more precisely analyzed two clones, clone 1 which lost about 33% of ST3GAL2 mRNA expression, and the clone 2 which lost about 69% as shown by qRT-PCR in

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis



7

Am J Cancer Res 2021;11(9):XXX-XXX

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

Figure 1. ST3GAL2 overexpression in colorectal tumors. (A) COADREAD RNAseq data extracted from Firebrowse database, containing 626 tumor tissues and 51 normal tissues, show that among 20 sialyltransferases, ST3GAL2 is significantly overexpressed in colorectal tumors (red stars). (B) ST3GAL2 is overexpressed at all stages, and it seems slightly more expressed in the two last stages. Average age: 66.3 years; distribution is: 53% men, 47% women. For (A) and (B), bar graph represent mean of log₂ RSEM ± SEM, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. (C) Expression level of ST3GAL2 was assessed by western blotting assays in colorectal tumor tissues compared to healthy sections of the same patients. (HT: Healthy Tissue; TmT: Tumoral Tissue).

Table 1. Correlation between ST3GAL2 expression and clinical parameters in patients with CRC

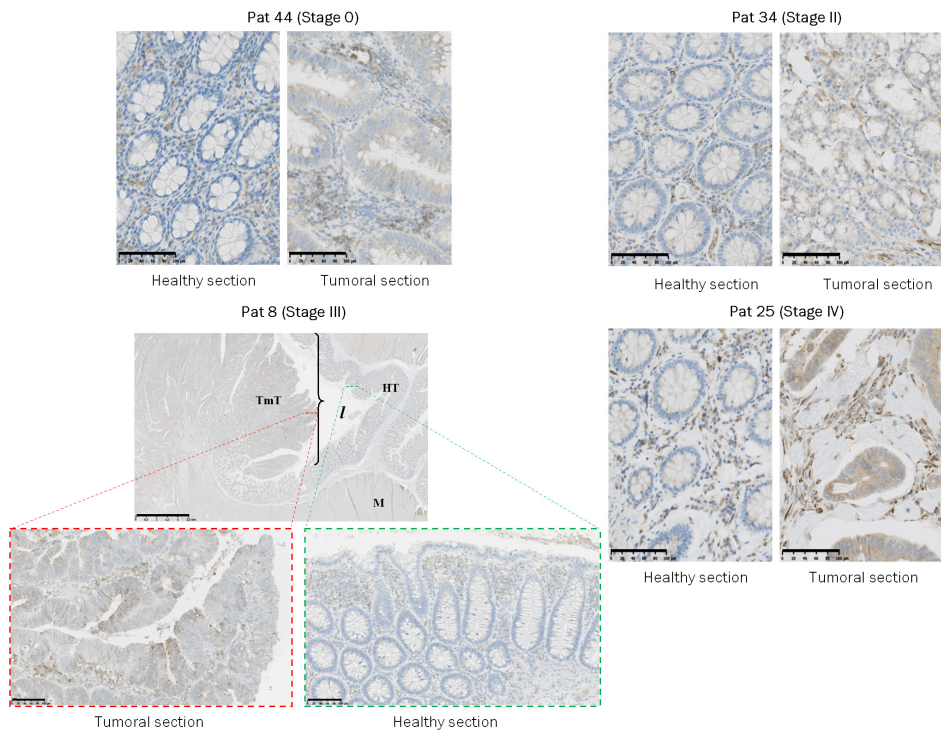
			N	ST3GAL2 expression (Log ₂ RSEM)	P value
Stage I (105)	Gender	Men	59	9.38	0.8921
		Women	46	9.43	
	Age	>60	76	9.46	0.08285
		35-60	29	9.24	
	Tumor location	Colon	74	9.37	0.5181
Rectum		31	9.48		
Stage II (229)	Gender	Men	121	9.37	0.8982
		Women	108	9.34	
	Age	>60	179	9.36	0.6172
		31-60	50	9.37	
	Tumor location	Colon	178	9.31	0.1938
Rectum		51	9.51		
Stage III (179)	Gender	Men	88	9.47	0.8287
		Women	91	9.52	
	Age	>60	120	9.48	0.4596
		31-60	59	9.54	
	Tumor location	Colon	128	9.49	0.7614
Rectum		51	9.51		
Stage IV (88)	Gender	Men	51	9.49	0.3863
		Women	37	9.61	
	Age	>60	55	9.53	0.5961
		35-60	33	9.56	
	Tumor location	Colon	64	9.52	0.743
Rectum		24	9.59		

ST3GAL2 expression was extracted from FireBrowse database which contains informations on 626 CRC patients and 51 healthy people. We classified these patients by CRC stages. For each group (stage) we considered ST3GAL2 expression according to gender, age and tumor location. We performed Kruskal-Wallis test to evaluate P value.

Figure 4A. We confirmed the decrease of ST3GAL2 expression at the protein level by western blotting using an anti-ST3GAL2 antibody (**Figure 4B**). In HT29-shST3GAL2 pool, clone 1 and clone 2 populations, the expected bands were significantly 3-fold less intense compared to control cells. We completed the characterization of HT29-shST3GAL2 cells by measuring the loss of epitope SSEA-4, the GSL exclusively synthesized by ST3GAL2. There is a lack of SSEA-4 labelling in the HT29-shST3GAL2 cells compared to HT29-shctrl cells, while we still detect SSEA-3, the acceptor substrate of ST3GAL2 (**Figure 4C**).

To assess the impact of ST3GAL2 KD on HT29 behavior, we performed functional tests. Preliminary tests were taken on the three HT29 populations (pool, clone 1 and clone 2 cells) to ensure that the effects of KD are not clone-dependent, due to a position effect of shRNA insertion (**Figure 5**). Proliferation capacities of HT29 cells were determined by counting cells every 24 h for 96 hours using two different methods (**Figure 5**). The KD of ST3GAL2 induced a cell proliferation decrease which began at 48 h and became significantly more pronounced at 72 h and 96 h (**Figure 5A**). At 72 h, the number of HT29-shST3GAL2 cl2 cells

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

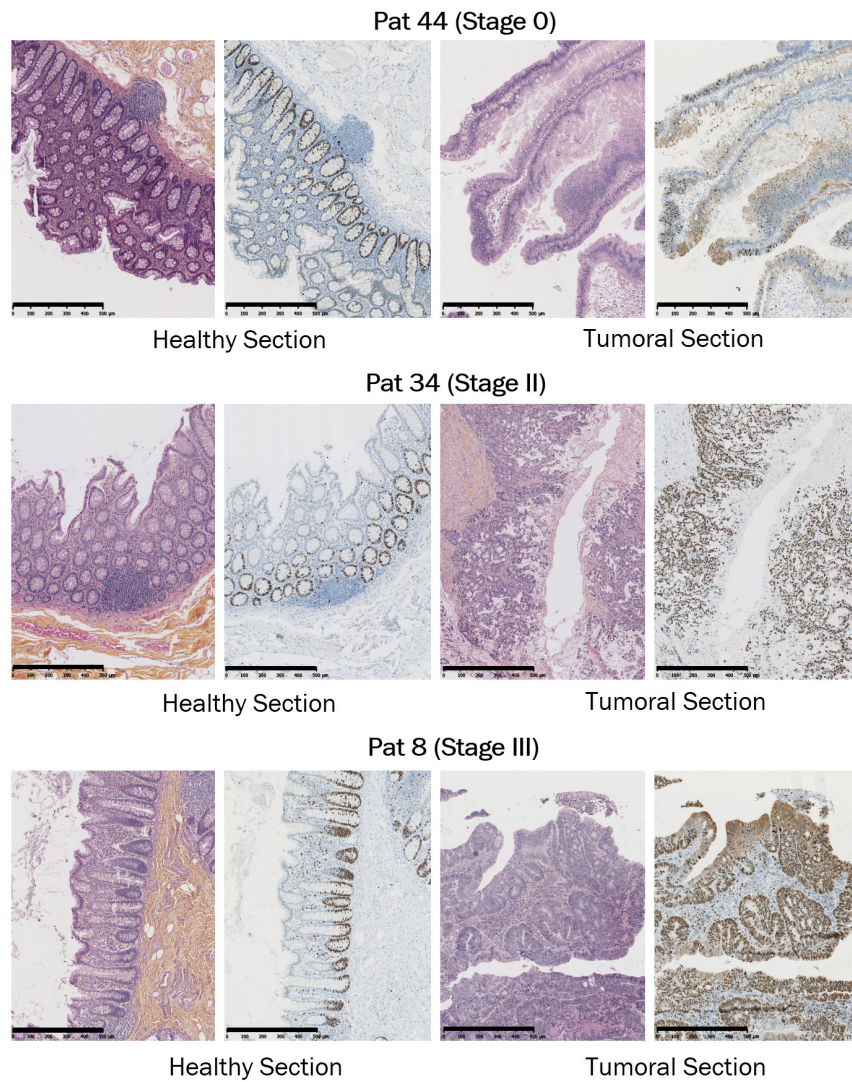


9

Am J Cancer Res 2021;11(9):XXX-XXX

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

Figure 2. Immunohistochemistry performed on biopsies from CRC patients. Immunohistochemistry analyses performed with anti-ST3GAL2 antibody on healthy section and tumoral section from biopsies from patients with colorectal tumors at different stages. Patient Pat 44 represents a stage 0 from a woman CRC. Patient Pat 34 represents a stage II from a man and patient Pat 25 represents a stage IV from man. For Pat 8 which represents stage III, healthy and tumoral tissues are present on the same biopsy. ST3GAL2 immunolabelling was more intense in tumoral section (brown staining) compared to healthy section where immunolabelling was only observed in lymphocytes surrounding the Luberkhunien glands. Scale bar: 100 µm. (TmT: Tumor Tissue, HT: Healthy Tissue, M: Muscle, L: intestinal lumina).



ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

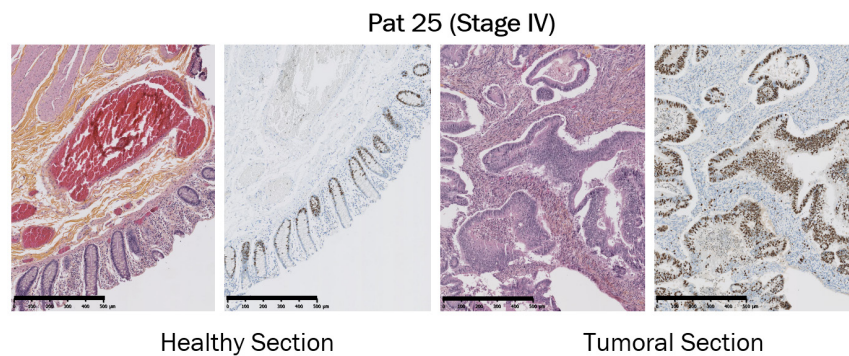


Figure 3. HES and Ki67 stainings performed on biopsies from CRC patients. HES (left panels) and Ki67 (right panels) stainings on healthy and tumoral sections from different stage biopsies. HES staining revealed a classical architecture of healthy tissue with polarized epithelium invaginating in Lieberkühn crypts, while this structured architecture was totally abolished into tumoral section. Ki67 stainings, for their part, were more pronounced in tumoral section which is consistent with the proliferative nature of tumoral tissue. In healthy section, Ki67 staining was only observed in bottom pole of intestinal glands, consistent with the literature. Scale bar: 500 μ m.

was $53.3 \times 10^3 \pm 5.6 \times 10^3$ compared to $80.4 \times 10^3 \pm 6.8 \times 10^3$ for control cells ($P=0.037$), and this difference increased at 96 h ($72.2 \times 10^3 \pm 11.8 \times 10^3$ vs $133.4 \times 10^3 \pm 9.3 \times 10^3$, $P=0.026$). We hypothesized that this cell proliferation defect could be due to a disturbance of the cell cycle and/or of the cell death. Since the results obtained with the three populations were similar, we used the clone 2 population, which presented the most important decrease of ST3GAL2 expression, for further investigations.

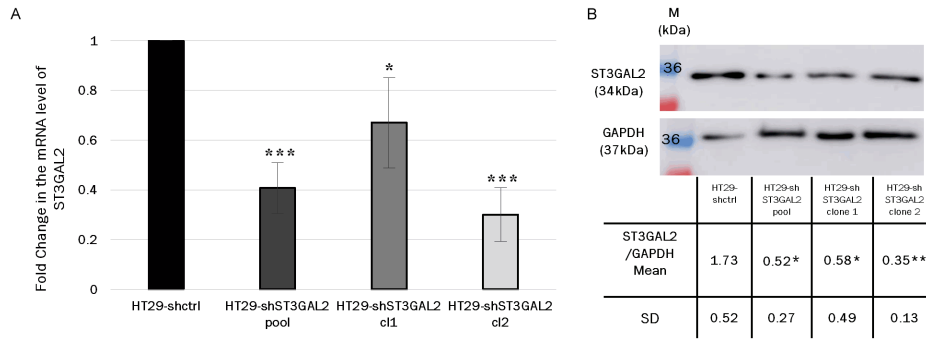
Cell cycle analysis by flow cytometry revealed that the distribution of cells in the different phases of the cell cycle was modified by ST3GAL2 KD (**Figure 6A**). Almost twice as many cells were in S phase for ST3GAL2 KD cells ($49.4\% \pm 1.2\%$) compared to control cells ($25.8\% \pm 0.2\%$, $P < 0.0001$) at the expense of the G1 phase (only $39.6\% \pm 0.8\%$ of cells for KD cells compared to $64.7\% \pm 1.3\%$ ($P < 0.0001$) for control cells).

Apoptosis rate of HT29-shST3GAL2 was first determined by ELISA cell death based on cytoplasmic histone associated DNA fragments detection. Cells treated with diosgenin, a potent apoptosis inducer, were used as a control [45]. Apoptosis of HT29-shST3GAL2 cells was six-fold higher than for HT29-shctrl cells (**Figure 6B**). This result was confirmed by double stain-

ing Annexin-V/PI (**Figure 6C**). HT29-shctrl cells displayed a significantly lower proportion of cells in early apoptosis compared to HT29-shST3GAL2 ($2.98\% \pm 0.41\%$ vs $15.58\% \pm 4.16\%$; $P=0.0065$), and in late apoptosis ($3.44\% \pm 0.96\%$ vs $11.95\% \pm 1.35\%$; $P=0.0009$). Out of 10,000 cells analyzed, living cells represented $86.14\% \pm 5.40\%$ of the cell population for HT29-shctrl cells, and only $59.36\% \pm 4.90\%$ for HT29-shST3GAL2 cells ($P=0.003$). Therefore, the decrease in proliferation of HT29-shST3GAL2 cells could be attributed to either an accumulation of cells in S phase and to an increase of apoptosis.

Furthermore, cell migration, assessed with a four days healing test, was significantly reduced in HT29-shST3GAL2 cells compared to HT29-shctrl cells (24 h: $10.0\% \pm 0.3\%$ vs $81.4\% \pm 18.6\%$, $P=0.0185$; 48 h: $23.2\% \pm 6.1\%$ vs 100.0% , $P=0.0002$; 72 h: $70.0\% \pm 6.1\%$ vs 100.0% , $P=0.0211$). Within 48 h, HT29-shctrl cells have completely filled the gap generated by the insert (**Figure 6D**), while only 23% of the gap was filled by HT29-shST3GAL2 cells after 48 h of culture. (Migration capacities for HT29-shST3GAL2 pool and cl1 were performed and are available on request from the corresponding author.) Invasion capacity was assessed using transwell assay with matrigel. ST3GAL2 silencing induced the loss of invasion ability compared to control cells for which a

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis



ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

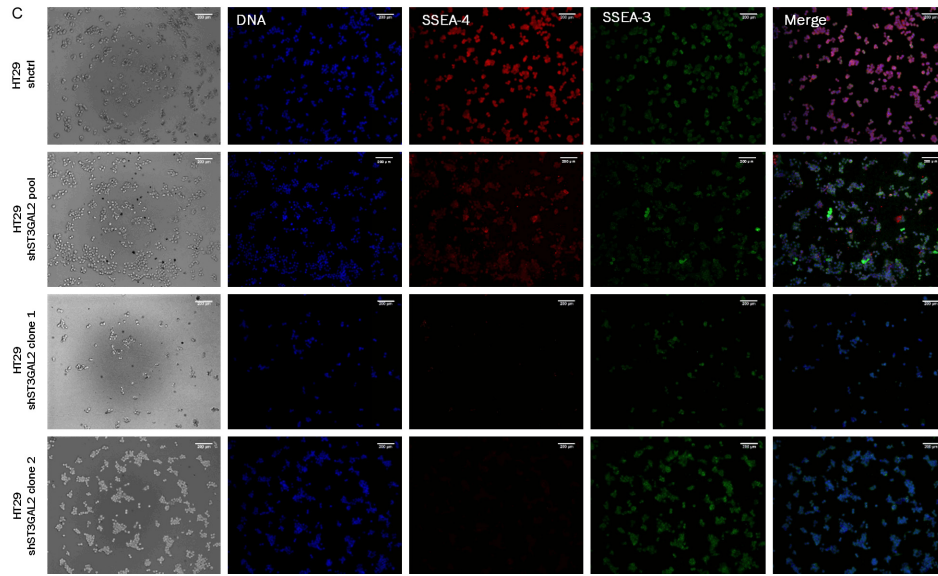


Figure 4. ST3GAL2 KD validation. A. Relative mRNA levels of ST3GAL2 were measured by real time qPCR assays after transfection of shRNA control or shRNA against ST3GAL2 in the colorectal cell line HT29. Bar graph represents mean of ST3GAL2 mRNA relative quantity \pm SD, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. B. Protein levels of ST3GAL2 were analyzed by western blotting assays in HT29 transfected with shRNA against ST3GAL2 compared to HT29 transfected with shRNA control. Western blots were performed in triplicate, the table shows the ST3GAL2/GAPDH ratio mean \pm SD. p values are calculated for each KD cell populations vs HT29-shctrl. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. C. Immunofluorescence labelling of Stage Specific Embryonic Antigen 4 (SSEA-4) (red), SSEA-3 (green) and DNA with DAPI (blue), performed on the different HT29 cells knockdown for ST3GAL2 (HT29-shST3GAL2) and HT29 control cells (HT29-shctrl). Scale bar: 100 μ m.

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

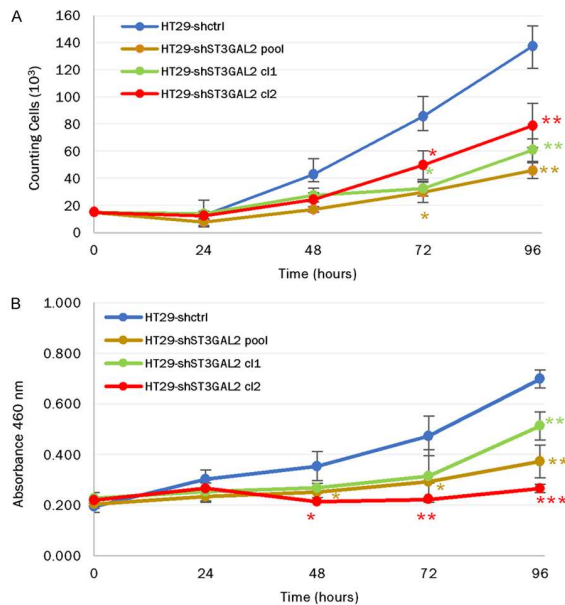


Figure 5. Proliferation assays on the different HT29 population cells: Proliferation capacities of HT29-shctrl, HT29-shST3GAL2 pool, HT29-shST3GAL2 cl1 and HT29-shST3GAL2 cl2 cells were assessed using two different methods, cell counting (A) and CCK8 kit assay (B). Proliferation test with CCK8 kit and counting method gave similar results. Data are represented as mean of counting cells per day \pm SD (A) or mean of absorbance at 460 nm per day \pm SD (B) from three independent experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

large number of cells crossed the membrane. **Figure 6E** shows that from 72 h, control cells crossed the membrane coated by matrigel, whereas only a few KD cells crossed this membrane as shown by the absence of stained cells. Consistently, these results showed that knockdown of *ST3GAL2* expression reduced HT29 properties associated to tumor progress.

Knockdown of *ST3GAL2* decreased tumor formation in vivo

ST3GAL2 KD highly changed the behavior of xenografted HT29 cells into nude mice. HT29-shctrl or HT29-shST3GAL2 cells (5×10^5) were injected subcutaneously into both flanks of nude mice to assess tumor formation and growth. After 41 days, when the maximum size of 1 cm³ was reached, all mice were sacrificed,

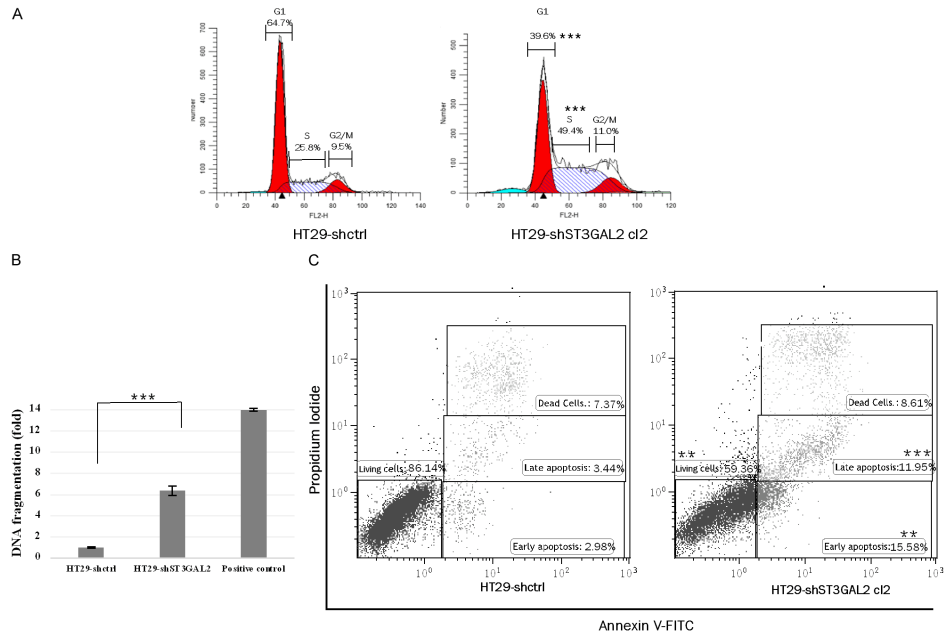
and tumors were harvested. HT29-shST3GAL2 cells formed significantly smaller (4.0-fold) and lighter (5.4-fold) tumors compared to HT29-shctrl cells (mean volume at 41 days: $224.0 \text{ mm}^3 \pm 20.7$ vs $896.9 \text{ mm}^3 \pm 128.2$, $P < 0.0001$; mean weight at 41 days: $137.7 \text{ mg} \pm 18.6$ vs $749.8 \text{ mg} \pm 164.3$, $P = 0.0007$) (**Figure 7**).

ST3GAL2 detection by immunohistochemistry (**Figure 8A, 8B**) revealed a less intense labelling of *ST3GAL2* (brown staining) within tumors from HT29-shST3GAL2 compared to tumors from HT29-shctrl cells (**Figure 8A**), which is consistent with the initial expression of *ST3GAL2* in HT29 control and KD cells. We noticed that tumors from HT29-shctrl cells presented more necrotic zones (dark brown staining) than tumors from HT29-shST3GAL2 cells, probably due to a faster growth. In these same tumors, Ki67 staining (**Figure 8C, 8D**) showed that, a lower proportion of HT29-shST3GAL2 cells was under proliferation, which may explain the difference in tumor growth rate.

Knock-down of *ST3GAL2* impacts spheroid evolution in vitro

Additional experiments were performed to test spheroid formation capacities of HT29-shST3GAL2 cells compared to HT29-shctrl cells. We used specific 96-wells plates where only one spheroid can form into each well. Knock-down of *ST3GAL2* did not affect spheroid formation but seems to alter its evolution. At 24 h of culture, spheroids formed from HT29-shctrl cells were more circular compared to HT29-shST3GAL2 spheroids for which we observed loose spheroids. After 120 h of culture, spheroids from HT29-shST3GAL2 cells were more widespread (**Figure 9A**). Perimeters of these spheroids showed that size of spher-

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis



ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

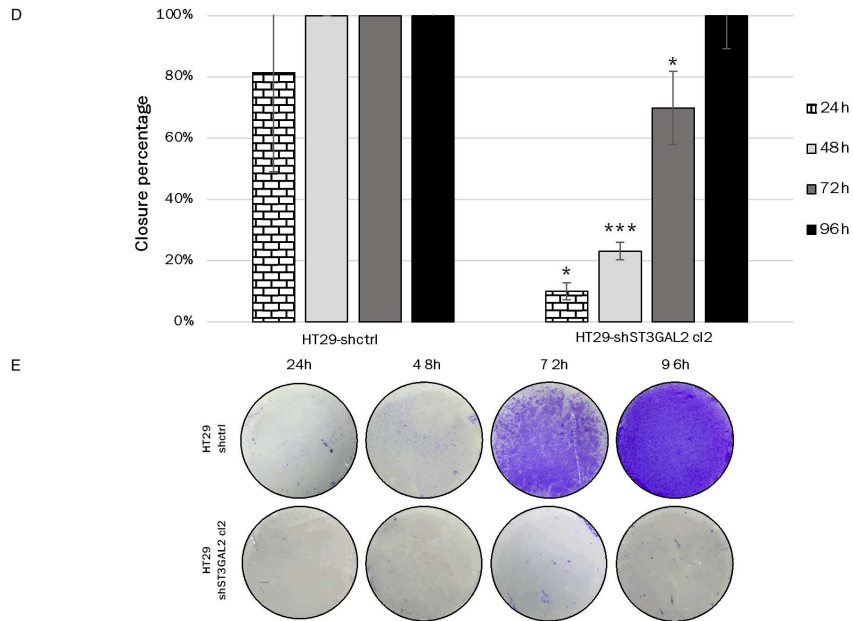
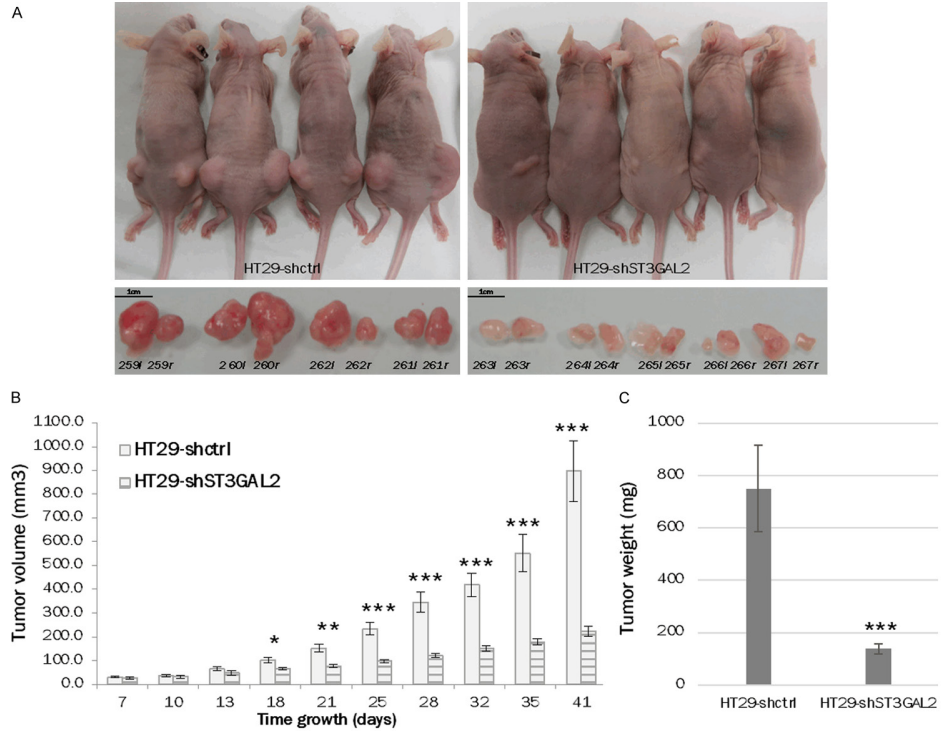


Figure 6. Functional tests on HT29 cells. A. Cell cycle analysis by flow cytometry of ST3GAL2 KD and control cells. The percentages correspond to cells in G1 phase, S phase and G2/M phases. B. DNA fragmentation in HT29-shctrl and HT29-shST3GAL2 cells was quantified by ELISA. DNA degradation is expressed relative to control cells. Graph bars represent mean \pm SD. C. HT29 cells were stained with Annexin V-FITC and PI, and analyzed by flow cytometry. Percentages represent living cells in lower left panel, cells in apoptosis in lower right panel, and dead cells in upper right panel. D. Migration assays were performed in free FBS medium to detect the cell migration ability of HT29 cells. The gap closure was measured every day and converted in closure percentage. Graph bars represent means of percentage closure \pm SD, from three independent experiments. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. E. Invasion tests: cells were placed in the upper chamber of a transwell insert, and matrigel-transwell assays were performed to detect every 24 h the cell invasion ability of HT29 cells by crystal violet staining of cells on the underside of the membrane. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis



17

Am J Cancer Res 2021;11(9):XXX-XXX

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

Figure 7. Tumor growth into mice. *In vivo* tumor formation into nude mice xenografted with HT29-shctrl cells or HT29-shST3GAL2 cells was observed. Knock-down of ST3GAL2 reduced tumor growth *in vivo* (A). The tumor volume (B) and weight (C) were significantly lower with HT29-shST3GAL2 xenografts. Tumors were named with mice identification number and with letter r (right flank) or l (left flank). Graph bars represent means of volumes and weights \pm SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

oids from HT29-shST3GAL2 cells did not increase compared to spheroids from HT29-shctrl cells (**Figure 9B**). Perimeters of HT29-shctrl spheroids decreased between 24 h and 48 h because of cell compaction, then spheroid size began to increase at 96 h. HT29-shST3GAL2 spheroids did not have size evolution during 120 h. This result suggests ST3GAL2 is implicated in spheroid evolution.

Discussion

Cancer process is an addition of many cellular changes, like the regulation of cell proliferation/death, associated to variation of protein expression (increase of oncogenes and/or decrease of tumor suppressors) and post-translational modifications. All these changes lead to favor cancer cell proliferation, survival and invasion. Among these modifications, the alteration of glycosylation pattern plays a crucial role. Cancer cells are characterized by many changes in glycosylation which lead to heterogeneity in tumoral cell population [11]. Glycans carried by tumoral cells are implicated in several mechanisms of cancer progress such as cell adhesion, migration and invasion [46]. Among all glycosylations, sialylation mediated by ST6GAL1 was largely studied in cancers. ST6GAL1 was shown to be overexpressed in early stages of CRC and implicated in tumorigenesis by adding sialic acid on some membrane glycoproteins, mostly responsible of cell movement, cell death and survival [28]. α 2-6 sialylation of β 1 integrin by ST6GAL1 prevents cell adhesion to galectin-3 and hence protects cells against apoptosis promoted by galectin-3 [47]. Another α 2,6-sialyltransferase, ST6GALNAC5, is responsible of biosynthesis of α -series gangliosides and is overexpressed in breast-metastasis found in brain [48]. Another ganglioside, SSEA-4, the product of ST3GAL2, is implicated in breast and ovarian cancers [38], and in prostate cancer [49]. The presence of this ganglioside favors chemotherapy resistance and the epithelio-mesenchymal transition of cancer cells [38].

In CRC, we observed variations in gene expression relating to sialyltransferases from RNA-

Seq databases. One sialyltransferase gene stand out, ST3GAL2, which is overexpressed in CRC compared to normal tissue. ST3GAL2 is overexpressed in all CRC stages (**Figure 1**). When we look at ST3GAL2 expression in HT29 cell line by western blot, we can observe comparable levels of ST3GAL2 expression between human CRC samples and HT29 cells. Thus, we chose to use this cell line, which represents an intermediary stage of CRC, as an *in vitro* model. To study the role of ST3GAL2, we created HT29 cells knock-down for ST3GAL2. We obtained a HT29 clone with a significant decrease of ST3GAL2 expression compared to HT29 control cells (70% decrease of mRNA and near 80% decrease of protein). These cells were used to make xenografts into nude mice. Our *in vivo* study showed that, when xenografted into nude mice, human CRC HT29-shctrl cells formed 4-fold bigger and 5.4-fold heavier tumors compared to HT29-shST3GAL2 cells. Ki67 staining of these tumors showed a decrease of proliferating cells compared to control cells. These results correlated well with the *in vitro* studies showing a decrease in proliferation capacities of HT29-shST3GAL2 cells, a higher cell proportion in the S phase of cell cycle, and a 4-fold increase in apoptosis (**Figures 5 and 6**). The knock-down of ST6GAL1 gave similar results on cell migration capacities and apoptosis rate in ovarian cancer [50]. In a different cellular model, SW948 colorectal cell line, ST6GAL1 overexpression induces an increase of migration capacities [51] but surprisingly abolishes tumorigenicity *in vivo* [51]. In fact, ST6GAL1 overexpression in SW948 cells increased migration capacities [51, 52], while in SW480 cells, ST6GAL1 overexpression decreased migration capacities [52], but protect cells against apoptosis [47]. The effects of ST6GAL1 overexpression seem to be dependent on the cell line used and its origin (cancer stage) [53].

HT29 cells are known to form spheroids under appropriate conditions [54]. First investigations with spheroid experiments showed that ST3GAL2 knock-down altered spheroid evolution. We can suppose that ST3GAL2 overexpression is implicated in spheroid maintenance

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

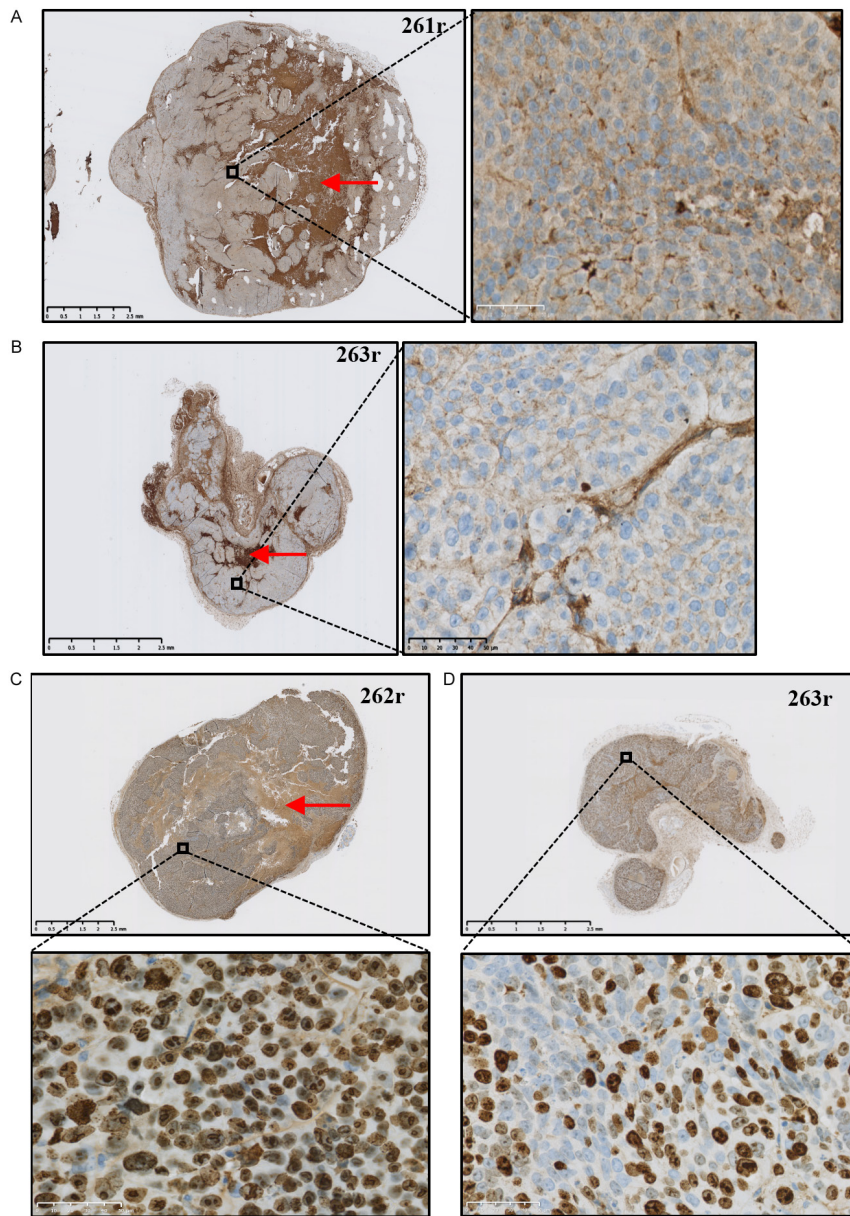


Figure 8. Immunohistological analyses of mouse tumors. ST3GAL2 immunohistochemistry was performed on tumors derived from mice xenografted with HT29-shctrl (A) or HT29-shST3GAL2 (B). Ki67 staining of tumors from mice xenografted with HT29-shctrl (C) or HT29-shST3GAL2 (D) cells was also performed. Necrosis zones are indicated with red arrows. Scale bar: 50 μm.

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

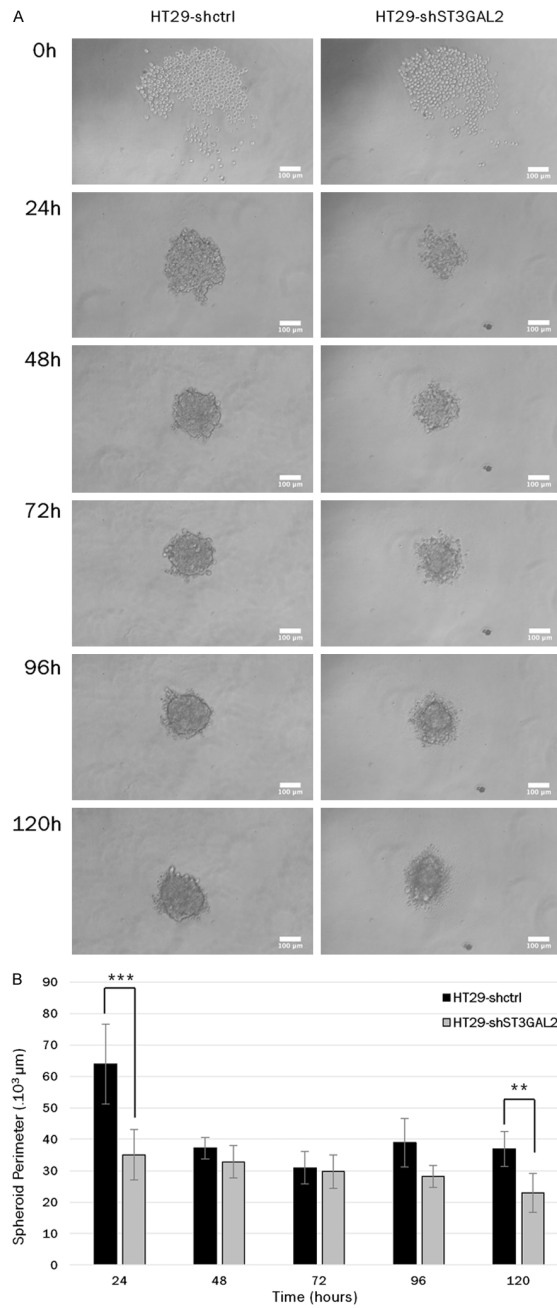


Figure 9. Spheroid formation capacities. A. Capacities of spheroid formation of HT29-shctrl cells and HT29-shST3GAL2 cl2 cells were tested during 120 h using specific 96 well plates. Only one spheroid can form per well, pictures were taken every 24 hours to compare spheroid evolution. Scale bar: 100 μm. B. Spheroid perimeters of HT29-shST3GAL2 were significantly smaller at 24 h and 120 h. **P<0.01, ***P<0.001.

in vitro and so in tumor evolution. Similar results were observed with ST6GAL1 knock-down in pancreatic cells [55], where this KD altered spheroids growth.

α2-3 sialylation has already been studied in many cancers, like in ovarian cancer [56] where higher expression of ST3GAL1 enhanced migration and invasion capacity of ovarian cancerous cells. It was also studied in pancreatic cancer [57] where the KD of ST3GAL3 and ST3GAL4 in cancerous pancreatic cells led to a decrease of cell migration. We observed similar results with HT29-shST3GAL2 in our study, even if ST3GAL2 acts preferentially on gangliosides while the three other sialyltransferases act preferentially on glycoproteins. Furthermore, α2-3 sialylation catalyzed by ST3GAL2 has not been studied in colorectal cancer context. ST3GAL2 contributes to the synthesis of two gangliosides, GD1a and GT1b, which can, by additional sialylation, lead to three last forms of polysialylated gangliosides, GT1aα, GQ1aβ and GD1α [33, 58]. Gangliosides overexpression were frequently observed in tumors, but the underlying mechanism is not fully understood [58]. GSL regulates many cell processes,

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

like apoptosis, cell cycle or cell signaling. A previous study reported that the levels of GM3 ganglioside increased during apoptosis into cutaneous T lymphocyte model, and that a decrease of GM3 synthase (ST3GAL5) reduced apoptosis [59]. GM3 synthase allows (indirectly) synthesis of ganglioside GD2, this one is considered by authors as a receptor of cell death signal but how GD2 acts to transduce this signal is still unexplained [60]. As mentioned before, SSEA-4 is synthesized only by ST3GAL2 as GD1a and GT1b. However, the relative amounts of all of these products remain unknown. We can reasonably assume that colorectal tumor cells display more GD1a ganglioside compared to normal cells in view of ST3GAL2 overexpression. Interestingly, GD1a favors EGFR dimerization, and so activation of the signal transduction when EGF is added, leading to activation of different protein kinases which contribute to cell growth, proliferation and survival [61]. Gangliosides are also involved in cell cycle regulation. Exogenous treatment of mesangial cells with gangliosides GM1 and GM2 lead to a cell cycle arrest via an increase of cyclin dependent kinase inhibitor (CDKI) p21^{Waf1/Cip1} expression [62]. Thus, it may be assumed that GM1 and GM2 act as cell cycle inhibitors. However, GM1 and GM2 are precursors of GD1a produced by ST3GAL2. Due to the ST3GAL2 overexpression within tumor, we hypothesize that the amounts of GM1 and GM2 are reduced and so their inhibitory effects on cell cycle. Moreover, GD1a, which results from GM1 and GM2, is known to activate EGFR and thus to promote tumorigenesis. A high amount of SSEA-4, another ganglioside, is associated to poor prognosis in several cancers such as breast cancer [38], liver cancer [36] or lung cancer [63]. Therefore, we can reasonably suppose that ST3GAL2 overexpression could contribute to tumorigenesis by generating more GD1a and SSEA-4.

Recently, Zhang et al. [64] demonstrated the implication of O-glycosylation and GSL-glycosylation in metastatic process of pancreatic cancer. Using a pancreatic metastatic cell line and a non-metastatic cell line as models, they demonstrated a change in expression of genes related to O-glycosylation and GSL-glycosylation, while no significant change was observed for N-glycosylation genes between the two cell lines [64]. For O-glycosylation and

GSL-glycosylation, an abundance of α 2-3 sialylation on galactose was observed in metastatic cell line compared to non-metastatic cell line [57]. The two sialyltransferases ST3GAL3 and ST3GAL4 are implicated in sLe^x and sLe^a synthesis carried by O-glycoproteins. A KD of the corresponding genes decreased invasion capacities and E-selectin binding of pancreatic tumor cells *in vitro* [57], but the underlying mechanism is not fully understood.

HT29 cells showed a high level of SSEA-4 (Figure 4), while in KD ST3GAL2 cells, SSEA-4 rate significantly decreases. The phenotypes of these modified cells are close to those observed with α 2-6 sialylation inhibition due to KD of ST6GAL1. Consequently, the progression of CRC would depend on these two sialylations, α 2-6 sialylation by ST6GAL1 and α 2-3 sialylation by ST3GAL2.

In addition to GSL, O-glycoproteins can also be sialylated by ST3GAL2 [32]. Consequently, the results we observed are likely combined effects of α 2-3 sialylation of GSL and O-glycoproteins. So far, no study has focused on O-glycoproteins sialylated by ST3GAL2 in CRC context. We hypothesize that identification of such O-glycoproteins in HT29 cells may help understanding of the observed changes in proliferation, invasion and migration. Moreover, these glycoproteins could constitute new biomarkers for early stages of CRC, since HT29 represents a stage 2 of this cancer.

Acknowledgements

We are grateful to Bertrand Liagre for his help with ELISA cell death. We are grateful to Alexis Parenté for his help in RNA extraction from tissues, and to Daniel Petit for his help with statistical analyses. This work was supported by a French Ministry of Higher Education and Research doctoral fellowship to MD. The "Ligue contre le cancer Haute-Vienne" partly funded the work.

Disclosure of conflict of interest

None.

Address correspondence to: Abderrahman Maftah, PEIRENE Laboratory, EA 7500, Glycosylation and Cell Differentiation, Faculty of Sciences and Technology, University of Limoges, Limoges F-

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

87060, France. Tel: +33-5554-57684; Fax: +33-5554-57653; E-mail: abderahman.maftah@unilim.fr

References

- [1] Warburg O, Wind F and Negelein E. Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper. *Klin Wochenschr* 1926; 5: 829-832.
- [2] Shaw RJ and Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; 441: 424-430.
- [3] Kroemer G and Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 2008; 13: 472-482.
- [4] Essentials of glycobiology. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW and Etzler ME. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.
- [5] Varki A, Kannagi R, Toole B and Stanley P. Glycosylation Changes in Cancer. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, Darvill AG, Kinoshita T, Packer NH, Prestegard JH, Schnaar RL and Seeberger PH. Essentials of Glycobiology. 3rd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015.
- [6] Kornfeld R and Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 1985; 54: 631-664.
- [7] Jang H, Kim Tae W, Yoon S, Choi SY, Kang TW, Kim SY, Kwon YW, Cho EJ and Youn HD. O-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell* 2012; 11: 62-74.
- [8] Shental-Bechor D and Levy Y. Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. *Curr Opin Struct Biol* 2009; 19: 524-533.
- [9] Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology* 2017; 27: 3-49.
- [10] Iwahana H, Yakymovych I, Dubrovskaya A, Hellman U and Souchelnytskyi S. Glycoproteome profiling of transforming growth factor-beta (TGFbeta) signaling: nonglycosylated cell death-inducing DFF-like effector A inhibits TGFbeta1-dependent apoptosis. *Proteomics* 2006; 6: 6168-6180.
- [11] Pinho SS and Reis CA. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 2015; 15: 540-555.
- [12] Costa AF, Campos D, Reis CA and Gomes C. Targeting glycosylation: a new road for cancer drug discovery. *Trends Cancer* 2020; 6: 757-766.
- [13] Rodrigues JG, Balmaña M, Macedo JA, Poças J, Fernandes Â, de-Freitas-Junior JCM, Pinho SS, Gomes J, Magalhães A, Gomes C, Mereiter S and Reis CA. Glycosylation in cancer: selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis. *Cell Immunol* 2018; 333: 46-57.
- [14] Du Y, Li D, Li N, Su C, Yang C, Lin C, Chen M, Wu R, Li X and Hu G. POFUT1 promotes colorectal cancer development through the activation of notch1 signaling. *Cell Death Dis* 2018; 9: 995.
- [15] Dong S, Wang Z, Huang B, Zhang J, Ge Y, Fan Q and Wang Z. Bioinformatics insight into glycosyltransferase gene expression in gastric cancer: POFUT1 is a potential biomarker. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 483: 171-177.
- [16] Chabanais J, Labrousse F, Chaunavel A, Gernot A and Maftah A. POFUT1 as a promising novel biomarker of colorectal cancer. *Cancers (Basel)* 2018; 10: 411.
- [17] Holst S, Wührer M and Rombouts Y. Glycosylation characteristics of colorectal cancer. *Adv Cancer Res* 2015; 126: 203-256.
- [18] Vajaria BN and Patel PS. Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj J* 2017; 34: 147-156.
- [19] Very N, Lefebvre T and El Yazidi-Belkoura I. Drug resistance related to aberrant glycosylation in colorectal cancer. *Oncotarget* 2017; 9: 1380-1402.
- [20] Swindall AF and Bellis SL. Sialylation of the fas death receptor by ST6Gal-I provides protection against fas-mediated apoptosis in colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 2011; 286: 22982-22990.
- [21] Wang X, Zhang Y, Lin H, Liu Y, Tan Y, Lin J, Gao F and Lin S. Alpha2,3-sialyltransferase III knockdown sensitized ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 482: 758-763.
- [22] Gillespie W, Kelm S and Paulson JC. Cloning and expression of the gal beta 1, 3GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase. *J Biol Chem* 1992; 267: 21004-21010.
- [23] Paulson JC and Colley KJ. Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation. *J Biol Chem* 1989; 264: 17615-17618.
- [24] Kurosawa N, Kojima N, Inoue M, Hamamoto T and Tsuji S. Cloning and expression of gal beta 1,3GalNAc-specific GalNAc alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem* 1994; 269: 19048-19053.
- [25] Kojima N, Yoshida Y, Kurosawa N, Lee YC and Tsuji S. Enzymatic activity of a developmentally regulated member of the sialyltransferase family (STX): evidence for alpha 2,8-sialyltransferase activity toward N-linked oligosaccharides. *FEBS Lett* 1995; 360: 1-4.
- [26] Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* 2001; 47: 624-630.

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

- [27] Park IJ, Choi GS and Jun SH. Prognostic value of serum tumor antigen CA19-9 after curative resection of colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 4303-4308.
- [28] Zhang S, Lu J, Xu Z, Zou X, Sun X, Xu Y, Shan A, Lu J, Yan X, Cui Y, Yan W, Du Y, Gu J, Zheng M, Feng B and Zhang Y. Differential expression of ST6GAL1 in the tumor progression of colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 486: 1090-1096.
- [29] Ogawa T, Hirohashi Y, Murai A, Nishidate T, Okita K, Wang L, Ikehara Y, Satoyoshi T, Usui A, Kubo T, Nakastugawa M, Kanaseki T, Tsukahara T, Kutomi G, Furuhashi T, Hirata K, Sato N, Mizuguchi T, Takemasa I and Torigoe T. ST6GALNAC1 plays important roles in enhancing cancer stem phenotypes of colorectal cancer via the Akt pathway. *Oncotarget* 2017; 8: 112550-112564.
- [30] Tsuji S and Takashima S. ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 2 (ST3GAL2). In: Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata T, editors. *Handbook of glycosyltransferases and related genes*. Tokyo: Springer Japan; 2014. pp. 645-656.
- [31] Giordanengo V, Bannwarth S, Laffont C, Miecem V, Harduin-Lepers A, Delannoy P and Lefebvre JC. Cloning and expression of cDNA for a human Gal(beta1-3)GalNAc alpha2,3-sialyltransferase from the CEM T-cell line. *Eur J Biochem* 1997; 247: 558-566.
- [32] Kim YJ, Kim KS, Kim SH, Kim CH, Ko JH, Choe IS, Tsuji S and Lee YC. Molecular cloning and expression of human Galb1,3GalNAc a2,3-sialyltransferase (hST3Gal II). *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228: 324-7.
- [33] Sturgill ER, Aoki K, Lopez PHH, Colacurcio D, Vajn K, Lorenzini I, Majić S, Yang WH, Heffer M, Tiemeyer M, Marth JD and Schnaar RL. Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. *Glycobiology* 2012; 22: 1289-1301.
- [34] Saito S, Aoki H, Ito A, Ueno S, Wada T, Mitsuoka K, Satoh M, Arai Y and Miyagi T. Human alpha2,3-sialyltransferase (ST3Gal II) is a stage-specific embryonic antigen-4 synthase. *J Biol Chem* 2003; 278: 26474-26479.
- [35] Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F, Hakomori S, Andrews PW, Knowles BB and Solter D. Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J* 1983; 2: 2355-2361.
- [36] Kuo HH, Lin RJ, Hung JT, Hsieh CB, Hung TH, Lo FY, Ho MY, Yeh CT, Huang YL, Yu J and Yu AL. High expression FUT1 and B3GALT5 is an independent predictor of postoperative recurrence and survival in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 2017; 7: 10750.
- [37] Sivasubramaniyan K, Harichandan A, Schilbach K, Mack AF, Bedke J, Stenzl A, Kanz L, Niederfellner G and Bühring HJ. Expression of stage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) defines spontaneous loss of epithelial phenotype in human solid tumor cells. *Glycobiology* 2015; 25: 902-917.
- [38] Aloia A, Petrova E, Tomiuk S, Bissels U, Déas O, Saini M, Zickgraf FM, Wagner S, Spaich S, Sütterlin M, Schneeweiss A, Reitberger M, Rübberg S, Gerstmayer B, Agorku D, Knöbel S, Teranegra A, Falleni M, Soldati L, Sprick MR, Trumpp A, Judde JG, Bosio A, Cairo S and Hardt O. The sialyl-glycolipid stage-specific embryonic antigen 4 marks a subpopulation of chemotherapy-resistant breast cancer cells with mesenchymal features. *Breast Cancer Res* 2015; 17: 146.
- [39] Lou YW, Wang PY, Yeh SC, Chuang PK, Li ST, Wu CY, Khoo KH, Hsiao M, Hsu TL and Wong CH. Stage-specific embryonic antigen-4 as a potential therapeutic target in glioblastoma multiforme and other cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: 2482-2487.
- [40] Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW. NIH image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012; 9: 671-675.
- [41] Zhao S, Sun H, Jiang W, Mi Y, Zhang D, Wen Y, Cheng D, Tang H, Wu S, Yu Y, Liu X, Cui W, Zhang M, Sun X, Zhou Z, Peng Z and Yan D. miR-4775 promotes colorectal cancer invasion and metastasis via the Smad7/TGFβ-mediated epithelial to mesenchymal transition. *Mol Cancer* 2017; 16: 12.
- [42] Lepage C, Léger DY, Bertrand J, Martin F, Beneytout JL and Liagre B. Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Lett* 2011; 301: 193-202.
- [43] Lu J, Liong M, Li Z, Zink JI and Tamanoi F. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals. *Small* 2010; 6: 1794-1805.
- [44] Potten CS and Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990; 110: 1001-1020.
- [45] Sethi G, Shanmugam MK, Warriar S, Merarchi M, Arfuso F, Kumar AP and Bishayee A. Proapoptotic and anti-cancer properties of diosgenin: a comprehensive and critical review. *Nutrients* 2018; 10: 645.
- [46] Pinho SS, Reis CA, Paredes J, Magalhães AM, Ferreira AC, Figueiredo J, Xiaogang W, Carneiro F, Gärtner F and Seruca R. The role of N-acetylglucosaminyltransferase III and V in the post-

ST3GAL2 overexpression is implicated in colorectal tumorigenesis

- transcriptional modifications of E-cadherin. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 2599-2608.
- [47] Zhuo Y, Chammas R and Bellis SL. Sialylation of beta1 integrins blocks cell adhesion to galectin-3 and protects cells against galectin-3-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2008; 283: 22177-22185.
- [48] Drolez A, Vandenhaute E, Delannoy CP, Dewald JH, Gosselet F, Cecchelli R, Julien S, Dehouck MP, Delannoy P and Mysiorek C. ST6GALNAC5 expression decreases the interactions between breast cancer cells and the human blood-brain barrier. *Int J Mol Sci* 2016; 17: 1309.
- [49] Nakamura Y, Miyata Y, Matsuo T, Shida Y, Hakariya T, Ohba K, Taima T, Ito A, Suda T, Hakomori SI, Saito S and Sakai H. Stage-specific embryonic antigen-4 is a histological marker reflecting the malignant behavior of prostate cancer. *Glycoconj J* 2019; 36: 409-418.
- [50] Ou L, He X, Liu N, Song Y, Li J, Gao L, Huang X, Deng Z, Wang X and Lin S. Sialylation of FGFR1 by ST6Gal-I overexpression contributes to ovarian cancer cell migration and chemoresistance. *Mol Med Rep* 2020; 21: 1449-1460.
- [51] Chiricolo M, Malagolini N, Bonfiglioli S and Dall'Olio F. Phenotypic changes induced by expression of beta-galactoside alpha2,6 sialyltransferase I in the human colon cancer cell line SW948. *Glycobiology* 2006; 16: 146-154.
- [52] Venturi G, Ferreira IG, Pucci M, Ferracin M, Malagolini N, Chiricolo M and Dall'Olio F. Impact of sialyltransferase ST6GAL1 overexpression on different colon cancer cell types. *Glycobiology* 2019; 29: 684-695.
- [53] Jung YR, Park JJ, Jin YB, Cao YJ, Park MJ, Kim EJ and Lee M. Silencing of ST6Gal I enhances colorectal cancer metastasis by down-regulating KAI1 via exosome-mediated exportation and thereby rescues integrin signaling. *Carcinogenesis* 2016; 37: 1089-1097.
- [54] Chung YC, Chiang HC, Chang H, Lin CC, Lo LT, Wang AY, Chou KF and Hsu CP. Longan flower proanthocyanidins induce apoptosis in HT-29 colorectal carcinoma spheroids. *J Cancer Res Ther* 2018; 14: S388-S393.
- [55] Schultz MJ, Holdbrooks AT, Chakraborty A, Grizzle WE, Landen CN, Buchsbaum DJ, Conner MG, Arend RC, Yoon KJ, Klug CA, Bullard DC, Kesterson RA, Oliver PG, O'Connor AK, Yoder BK and Bellis SL. The tumor-associated glycosyltransferase ST6Gal-I regulates stem cell transcription factors and confers a cancer stem cell phenotype. *Cancer Res* 2016; 76: 3978-3988.
- [56] Wen KC, Sung PL, Hsieh SL, Chou YT, Lee OK, Wu CW and Wang PH. α 2,3-sialyltransferase type I regulates migration and peritoneal dissemination of ovarian cancer cells. *Oncotarget* 2017; 8: 29013-29027.
- [57] Guerrero PE, Miró L, Wong BS, Massaguer A, Martínez-Bosch N, de Llorens R, Navarro P, Konstantopoulos K, Llop E and Peracaula R. Knockdown of α 2,3-sialyltransferases impairs pancreatic cancer cell migration, invasion and e-selectin-dependent adhesion. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 6239.
- [58] Groux-Degroote S, Guérardel Y and Delannoy P. Gangliosides: structures, biosynthesis, analysis, and roles in cancer. *ChemBiochem* 2017; 18: 1146-1154.
- [59] De Maria R, Lenti L, Malisan F, d'Agostino F, Tomassini B, Zeuner A, Rippon MR and Testi R. Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis. *Science* 1997; 277: 1652-1655.
- [60] Doronin II, Vishnyakova PA, Kholodenko IV, Ponomarev ED, Ryazantsev DY, Molotkovskaya IM and Kholodenko RV. Ganglioside GD2 in reception and transduction of cell death signal in tumor cells. *BMC Cancer* 2014; 14: 295.
- [61] Liu Y, Li R and Ladisch S. Exogenous ganglioside GD1a enhances epidermal growth factor receptor binding and dimerization. *J Biol Chem* 2004; 279: 36481-36489.
- [62] Masson E, Wiernsperger N, Lagarde M and Bawab-Samer E. Glucosamine induces cell-cycle arrest and hypertrophy of mesangial cells: implication of gangliosides. *Biochem J* 2005; 388: 537-544.
- [63] Gottschling S, Jensen K, Warth A, Herth FJF, Thomas M, Schnabel PA and Herpel E. Stage-specific embryonic antigen-4 is expressed in basaloid lung cancer and associated with poor prognosis. *Eur Respir J* 2013; 41: 656-663.
- [64] Zhang T, van Die I, Tefsen B, van Vliet SJ, Laan LC, Zhang J, Ten Dijke P, Wuhrer M and Belo AI. Differential O- and glycosphingolipid glycosylation in human pancreatic adenocarcinoma cells with opposite morphology and metastatic behavior. *Front Oncol* 2020; 10: 732.

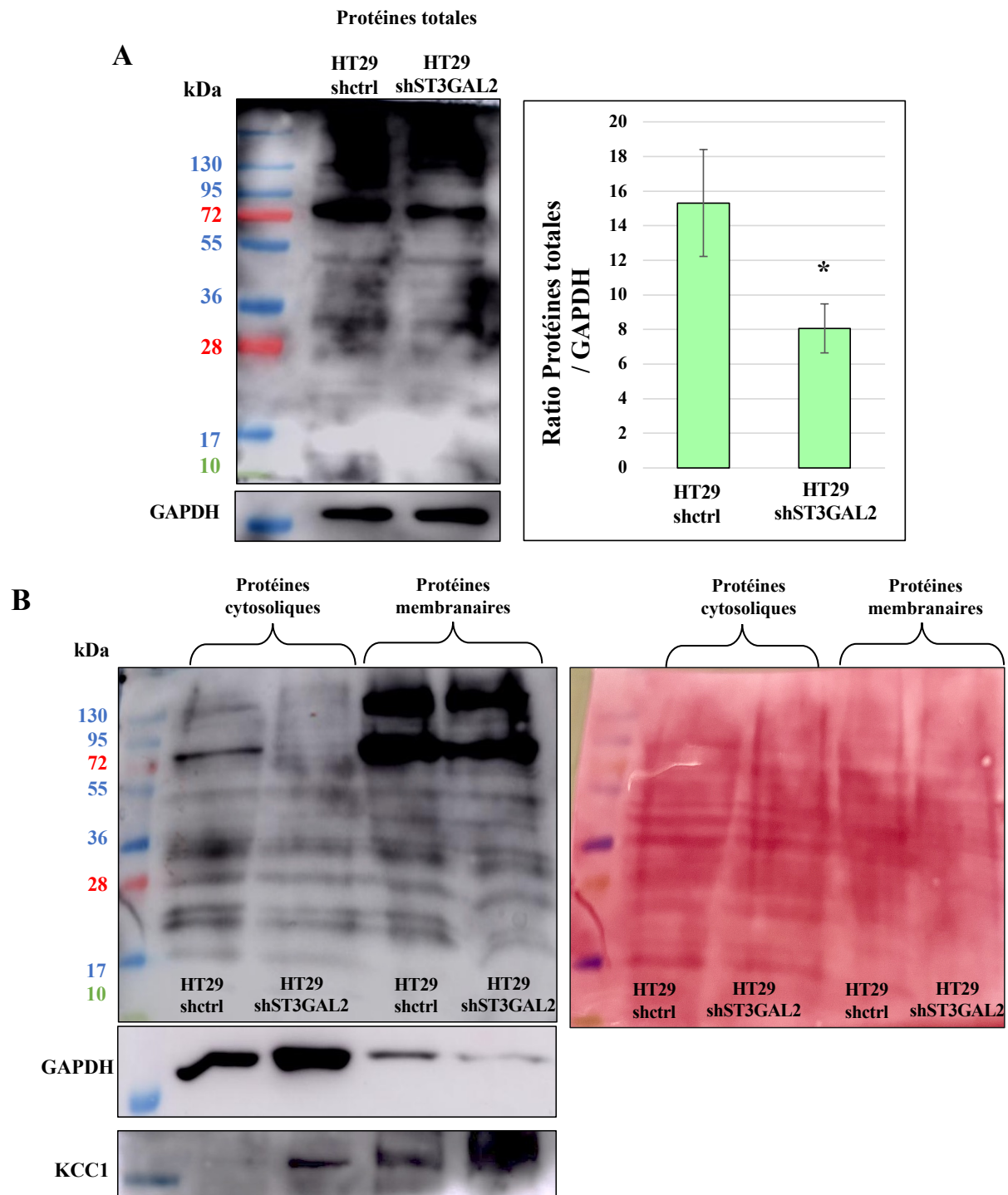


Figure 33 : Lectine-blots sur des protéines issues des cellules HT29-shctrl et HT29-shST3GAL2

(A) Lectine-blot sur des protéines totales issues des différentes lignées cellulaires HT29 révélant avec la MAA II (qui reconnaît le trisaccharide Sia α 2-3Gal β 1-3GalNAc) un marquage significativement moins important pour les protéines issues des cellules HT29-shST3GAL2. Les données sont représentées comme la moyenne d'intensité de marquage MAA II \pm SD, * $p < 0,05$; $n = 3$. (B) Marquage MAA II des protéines cytosoliques et membranaires. Une coloration de la membrane au rouge ponceau permet de visualiser les protéines présentes. La GAPDH est utilisée comme protéine de ménage cytosolique et KCC1 comme protéine de ménage membranaire (Garneau et al. 2019).

Chapitre VI. Résultats complémentaires

VI.1. Le KD de *ST3GAL2* affecte la sialylation des glycoprotéines membranaires dans la lignée colorectale HT29

Les différences de comportement observées entre les cellules HT29-shctrl et les cellules HT29 KD pour *ST3GAL2* peuvent être dues à des changements de sialylation de lipides et/ou de protéines. Nos expériences d'immunofluorescences présentées dans l'article « *ST3GAL2* knockdown decreases Tumoral Character of Colorectal Cancer Cells *in vitro* and *in vivo* » montrent que le KD de *ST3GAL2* révèle un marquage SSEA-4 plus faible dû à une forte diminution du taux de ce glycosphingolipide synthétisé par *ST3GAL2*. Mais qu'en est-il pour les protéines ? Afin de montrer d'éventuelles différences de sialylation de protéines entre les cellules HT29 contrôles et KD pour *ST3GAL2*, nous avons réalisé des lectine-blots utilisant la lectine MAA II (*Maackia Amurensis*) capable de reconnaître le trisaccharide Sia α 2-3Gal β 1-3GalNAc. La baisse d'expression de *ST3GAL2* devrait induire une diminution du marquage MAA II due à la plus faible présence du trisaccharide Sia α 2-3Gal β 1-3GalNAc.

Un lectine-blot effectué sur des protéines totales issues des cellules HT29-shST3GAL2 révèle un marquage à la MAA II significativement moins important (environ 2 fois moins) comparé aux protéines des cellules HT29-shctrl (Figure 33A). Il serait dû à une plus faible sialylation en α 2-3 assurée par *ST3GAL2* qui est moins présente dans les cellules HT29-shST3GAL2 (Deschuyter et al. 2021). Afin de savoir plus précisément quel type de protéines est sialylé par *ST3GAL2*, nous avons réalisé des fractionnements cellulaires afin de séparer les protéines cytosoliques et membranaires puis effectué des lectine-blots avec la MAA II (Figure 33B).

Le marquage MAA II observé pour les protéines membranaires semble plus important pour les protéines issues des cellules HT29-shctrl, c'est également le cas pour les protéines cytosoliques. Ces marquages à la MAA II montrent que le KD de *ST3GAL2* dans les lignées HT29 conduit à

une diminution de l' α 2-3 sialylation de glycoprotéines, et donc que ST3GAL2 sialylerait des protéines membranaires, en plus des glycolipides.

Cependant, la séparation des deux lots de protéines ne s'est pas avérée optimale. En effet, on retrouve une bande correspondant à la GAPDH, dans la fraction des protéines membranaires, et l'on retrouve une bande correspondant à KCC1 (Potassium Chloride Cotransporteur 1), une protéine de ménage membranaire (Garneau et al. 2019), dans la fraction des protéines cytosoliques. Les fractions n'étant pas pures, on peut considérer que le marquage MAA II que l'on observe dans les fractions des protéines cytosoliques est principalement dû aux protéines membranaires contaminant cette fraction.

Une des perspectives à court terme est d'identifier plus précisément les protéines présentant des défauts de sialylation dus au KD de *ST3GAL2*, en utilisant la méthode de chimie-click et la protéine ST3GAL2 recombinante humaine. Cette partie sera développée plus en détails dans le chapitre suivant.

VI.2. La surexpression de *POFUT1* et *ST3GAL2* dans 3 cancers digestifs serait liée à des mécanismes différents

Les causes de la surexpression de *POFUT1* dans les tumeurs colorectales sont connues (Chabanais et al. 2018), cependant on ignore encore celles de *ST3GAL2*. Nous avons recherché dans un premier temps si, comme pour *POFUT1*, la surexpression de *ST3GAL2* dépendait d'une augmentation du nombre de copies du gène ou s'il s'agissait d'un autre mécanisme.

Chabanais et al. avaient déjà montré que *POFUT1* était surexprimé dans les tumeurs colorectales (Chabanais et al. 2018). A partir de la même base de données RNA-Seq (Firebrowse), nous avons remarqué que *POFUT1* était également surexprimé dans 2 autres types de cancers digestifs, les cancers de l'œsophage (ESCA) et gastrique (STAD).

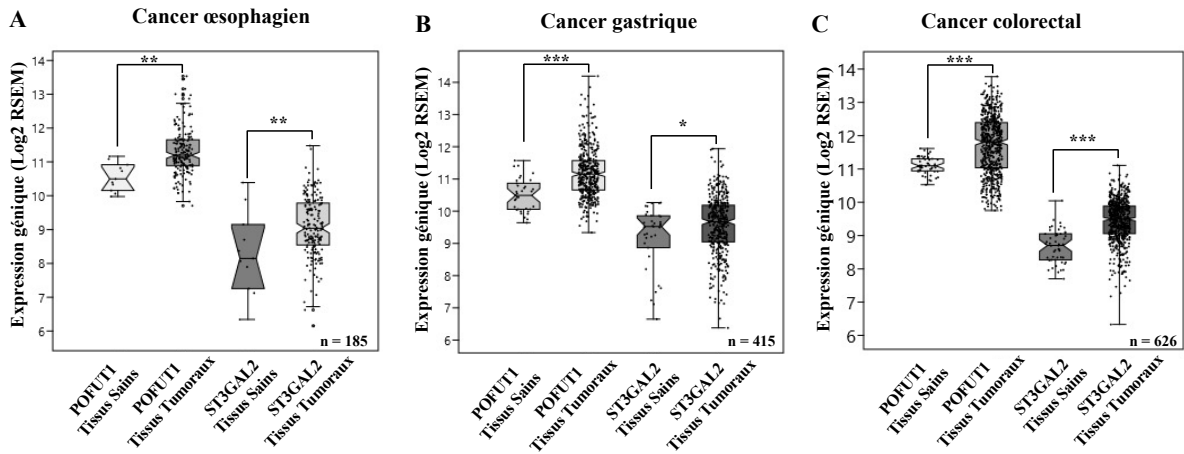


Figure 34 : Expressions de *POFUT1* et *ST3GAL2* dans 3 cancers digestifs

Données RNA-Seq extraites de la base de données Firebrowse représentant l'expression de *POFUT1* et *ST3GAL2* dans 3 cancers digestifs : cancer de l'œsophage (A), cancer gastrique (B) et cancer colorectal (C). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

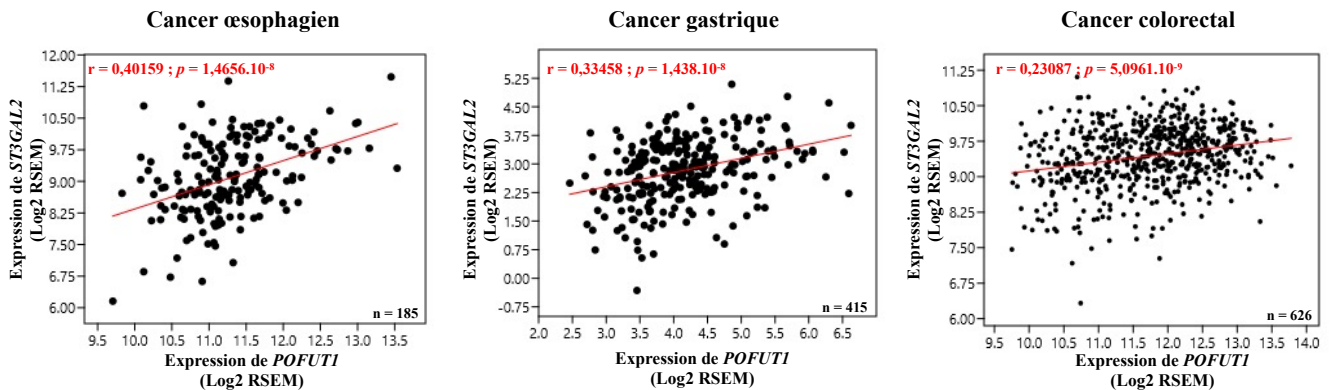


Figure 35 : Analyses de corrélation entre les expressions de *POFUT1* et *ST3GAL2*

Analyses de corrélations de Spearman entre les expressions de *POFUT1* et *ST3GAL2* dans ces 3 types de cancers. (n est le nombre d'échantillons disponibles dans chaque cas, r est le coefficient de corrélation, et p est la p value).

Nous avons constaté que *ST3GAL2*, surexprimé dans le CCR, est également surexprimé dans les cancers œsophagien et gastrique (Figure 34). Une étude de corrélation nous a révélé que les expressions de *POFUT1* et *ST3GAL2* dans ces 3 cancers digestifs étaient corrélées positivement (Figure 35). Ce résultat nous a amené à chercher un éventuel mécanisme de régulation commun à ces 2 gènes.

Les analyses du nombre de copies de *ST3GAL2* et de *POFUT1* dans ces 3 cancers révèlent que la surexpression de *ST3GAL2* n'est pas due à une augmentation du nombre de copies du gène comme observé pour *POFUT1* dans les tumeurs colorectales (Chabanais et al. 2018). *ST3GAL2* est présent en moins de 2 copies (allant de 1,287 à 1,999 copies) dans plus de la moitié des cancers de l'œsophage et gastrique, et dans plus de 40% des CCR (Figure 36). Certains patients ne présenteraient que 1,287 copies du gène, de tels résultats (surprenants) peuvent être dus à la technique utilisée (RNA-Seq). Le nombre de copies de *ST3GAL2* n'excède que très rarement 3, et aucune corrélation n'a été trouvée entre le nombre de copies de *ST3GAL2* et son expression dans ces 3 cancers. La surexpression de *POFUT1* est due à une augmentation du nombre copies (pouvant aller jusqu'à 6 copies dans le CCR (Chabanais et al. 2018)) pour les 3 cancers digestifs. En effet, pour ces 3 cancers dans plus de 75% des cas on constate plus de 2 copies du gène. Comme pour le CCR, une corrélation positive a été trouvée entre le nombre de copies de *POFUT1* et sa surexpression dans les cancers œsophagien et gastrique (Figure 37). La surexpression de *POFUT1* serait donc en grande partie due à une augmentation du nombre de copies. Cependant, un autre mécanisme est probablement impliqué puisque le nombre de copies n'excède que rarement 3 dans les cancers œsophagien et gastrique. Il est donc possible que ces 2 gènes partagent un mécanisme de régulation commun dans les cancers gastrique et œsophagien.

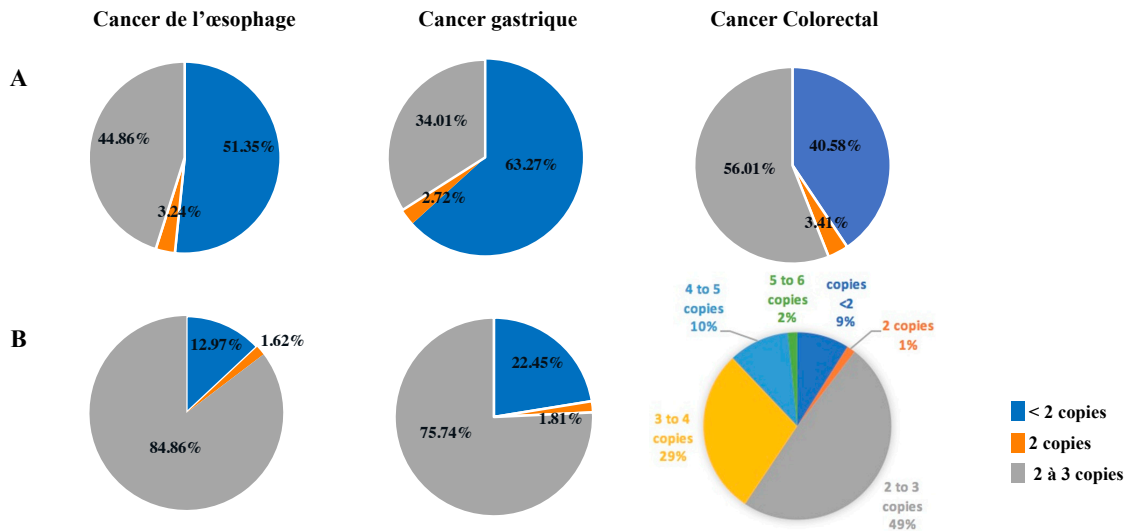


Figure 36 : Estimation du nombre de copies de *POFUT1* et *ST3GAL2* dans les 3 types de cancers (A) Nombre de copies de *ST3GAL2* dans les cancers œsophagien, gastrique et colorectal. Plus de la moitié des cas de patients atteints de cancers œsophagien ou gastrique ont moins de 2 copies de *ST3GAL2*. (B) Nombre de copies de *POFUT1* dans ces 3 cancers. Les données concernant le nombre de copies de *POFUT1* dans le CCR sont issues de Chabanaïs et al. (2018)

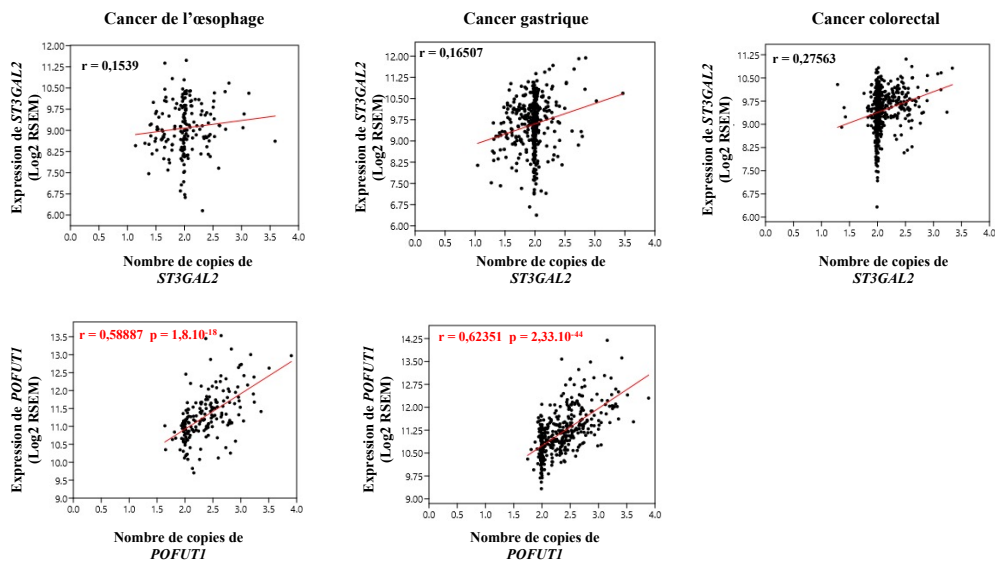


Figure 37 : Analyses de corrélation entre les expressions de *POFUT1/ST3GAL2* et le nombre de copies

Analyses de corrélations de Spearman entre les expressions de *ST3GAL2* et de *POFUT1* et leur nombre de copies dans les 3 types de cancers. (r est le coefficient de corrélation, et p est la p value).

VI.3. Acteur commun dans la régulation des expressions de *POFUT1* et *ST3GAL2*

Les expressions de *POFUT1* et *ST3GAL2* semblent régulées par des mécanismes différents, nous avons cependant recherché s'il existait d'éventuels acteurs communs, capables de réguler ces 2 gènes. Nous avons en premier lieu pensé à une régulation post-transcriptionnelle par les miRNA. La recherche de miRNA pouvant cibler ces 2 gènes, via la base de données miRDB (MicroRNA Target Prediction Database) (Wang 2008)(Liu and Wang 2019), a permis d'identifier un seul miRNA capable de se fixer à la région 3'-UTR de ces 2 gènes : Hsa-mir-589-3p. Cependant, les scores de prédiction ne sont pas les mêmes. Pour *ST3GAL2*, ce miRNA a un score de prédiction de 93, ce qui est plutôt un bon indicateur ; alors que pour *POFUT1* le score de prédiction est de 55, laissant un doute sur la régulation de *POFUT1* par ce miRNA. L'absence de régulation par un miRNA commun n'exclut cependant pas une régulation par des miRNA différents.

Nous nous sommes intéressés à une potentielle régulation transcriptionnelle. La recherche de protéines pouvant interagir avec les séquences de *POFUT1* et de *ST3GAL2* via la base de données hTFtargets, qui regroupe des informations ChiP-Seq sur les cibles de différents facteurs de transcription (Database of Human Transcription Factors Target (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/hTFtarget#!/>))(Zhang et al. 2020) a permis d'identifier les protéines reconnaissant à la fois les séquences nucléotidiques de *POFUT1* et de *ST3GAL2* dans différents tissus. Si l'on regarde les protéines communes à ces 2 gènes et exprimées dans le colon, on en dénombre 9 : CDK9, CEBPB, CTCF, EGR1, POLR2A, SMC1A, SMC3, SP1 et TAF3 (Tableau 9). (Les informations issues des tissus gastriques et œsophagiens étant inexistantes dans la base de données hTFtargets). L'expression des 9 gènes correspondants a été évaluée dans le cancer colorectal, mais également dans les cancers œsophagien et gastrique, grâce à la base de données Firebrowse (Figure 38). Il s'avère que seul *SMC1A* est significativement surexprimé dans les 3 types de tumeurs comparées aux tissus sains.

Tableau 9 : Rôles des 9 protéines pouvant se lier à *ST3GAL2* et *POFUT1* :

Gène	Protéine	Fonction
<i>CDK9</i>	Cyclin-Dependant Kinase 9	Protéine Kinase impliquée dans la régulation de la transcription, fait partie du complexe CDK9/cyclin-T.
<i>CEBPB</i>	CCAAT/enhancer-bondong protein beta	Facteur de transcription important, régulant l'expression des gènes dans la réponse immunitaire et inflammatoire.
<i>CTCF</i>	Transcriptional Repressor CTCF	Protéine pouvant se lier à la chromatine et impliquée dans la régulation de la transcription.
<i>EGR1</i>	Early Growth Response protein 1	Régulateur transcriptionnel se liant à des séquence d'ADN spécifiques situées dans les régions promotrices des gènes cibles.
<i>POLR2A</i>	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB 1	Sous-unité de l'ARN polymérase II.
<i>SMC1A</i>	Structural Maintenance of Chromosomes protein 1A	Sous-unité du complexe de la cohésine.
<i>SMC3</i>	Structural Maintenance of Chromosome protein 3	Sous-unité du complexe de la cohésine, forme un dimère avec SMC1A.
<i>SP1</i>	Transcription factor Sp1	Facteur de transcription avec une forte affinité pour les régions riches en GC.
<i>TAF3</i>	Transcription initiation factor TFIID subunit 3	TFIID fait parti d'un complexe protéique essentiel au recrutement de l'ARN polymérase II.

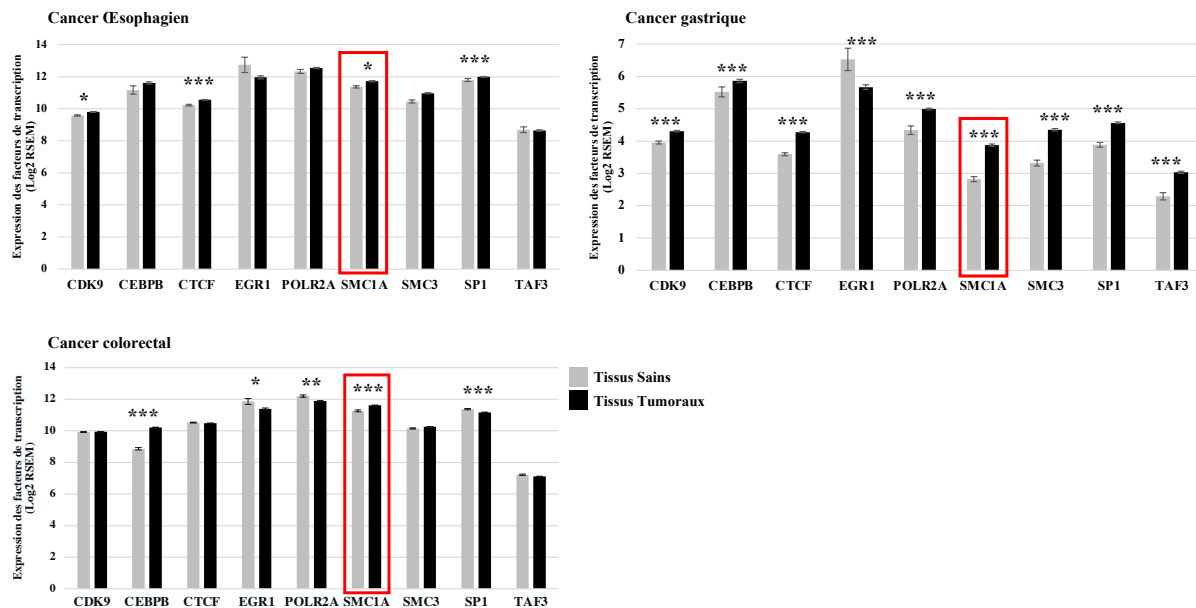


Figure 38 : Expressions géniques des 9 acteurs pouvant favoriser les expressions de *POFUT1* et *ST3GAL2*

D'après la base de données Firebrowse, l'expression des 9 gènes codant des protéines capables d'interagir avec *POFUT1* et *ST3GAL2* dans les cancers œsophagiens (A), gastriques (B) et colorectaux (C) diffère. *SMC1A* (encadré en rouge) est le seul gène significativement surexprimé dans les trois tissus tumoraux (en noir) comparés aux tissus sains (en gris). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

SMC1A fait partie du complexe de la cohésine composé de 4 protéines : SMC1A, SMC3, RAD21/Scc1 et STAG/Scc/Sa. Ce complexe s'associe à la chromatine et joue un rôle important dans le maintien des chromatides sœurs après la réplication de l'ADN (Losada and Hirano 2005), mais également dans la réponse liée aux dommages de l'ADN (Musio 2020). Le complexe de la cohésine permet la formation de TADs (Topologically Associating Domains), ces structures permettent le rapprochement d'éléments distants et la régulation de la transcription (Musio 2020). L'implication de SMC1A a déjà été montrée dans différents cancers et notamment le cancer colorectal (Sarogni et al. 2019)(Zhou et al. 2017). Cette protéine pouvant potentiellement se lier à la séquence nucléotidique de *POFUT1* et *ST3GAL2*, sa surexpression dans ces 3 tumeurs digestives pourrait expliquer la surexpression de ces 2 glycosyltransférases dans ces mêmes tumeurs.

SMC3 est significativement surexprimé dans le cancer gastrique, et est proche de la significativité dans les deux autres types de cancers. SMC3 fait également partie du complexe de la cohésine, elle forme un dimère avec SMC1A et se lie avec la sous-unité RAD21 (Hill, Kim, and Waldman 2016). *CTCF* est également significativement surexprimé dans les cancers œsophagien et gastrique. Il ne fait pas partie du complexe de la cohésine mais est impliqué dans son recrutement à la chromatine (Phillips and Corces 2009) et est capable d'interagir avec le complexe et ensemble contribuent à l'organisation du génome via la formation de TADs (Braccioli and de Wit 2019).

VI.4. Matériels et Méthodes

VI.4.1. Extraction protéique

Les protéines totales ont été obtenues par lyse des cellules dans un tampon de lyse RIPA (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% Triton X-100 (v/v), 0.5% sodium deoxycholate (w/v), 0,1% sodium dodecylsulfate (v/v), pH 8) pendant 2h à 4°C. Après une centrifugation pendant 15 minutes à 12 000g à 4°C, les surnageants ont été récupérés et les protéines dosées grâce au kit Pierce™BCA protein assay (ThermoScientific™, Rockford, IL, USA) avec la BSA comme référence.

Les protéines cytosoliques et membranaires ont été extraites grâce au kit QProteome Cell Compartment (QIAGEN®, Hilden, Allemagne) suivant les recommandations du fournisseur. À la suite de l'extraction, les différentes protéines ont été précipitées en ajoutant 4 volumes d'acétone froide, suivi d'une incubation de 15 minutes dans la glace. Après une centrifugation de 10 minutes à 12 000 g, le surnageant est retiré et le culot repris dans un volume approprié de PBS (Gibco, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, US). Les concentrations protéiques ont été déterminées grâce au kit Pierce™BCA protein assay (ThermoScientific™, Rockford, IL, USA) avec la BSA comme référence. Les protéines cytosoliques et membranaires (20µg) ont été déposées sur un gel SDS-PAGE 12% de polyacrylamide. Après une migration d'1h à 24mA, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose Amersham™ Protra® premium de 0.45µm (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) pendant 1h50 à 0,8mA/cm².

VI.4.2. Lectine-Blot

Pour le marquage à la MAA II, la membrane a été saturée 45 minutes à température ambiante dans une solution de TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,6) enrichie avec 1/10 de blocking reagent 10X (Roche Diagnostics, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO 63103 USA).

La membrane a été incubée avec la lectine MAA II biotinylée (GlycoMatrix, Dublin, Ohio, USA) concentrée à 2,5µg/ml dans du PBS pendant 1h à température ambiante. Après 2 lavages de 10 minutes dans du TBS-T (TBS 0,5% Tween-20), la membrane a été incubée 1h à température ambiante et à l'obscurité avec une solution de streptavidine-HRP à 1,25µg/ml (Invitrogen, Carlsbad, USA). Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBS, le marquage est révélé après ajout du réactif ECLTM Prime Western blotting detection (GE Healthcare, Uppsala, Suède) et visualisé avec le système Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Uppsala, Suède).

VI.4.3. Western Blot

À la suite d'une extraction protéique comme décrit précédemment, 20µg de protéines cytosoliques ou membranaires ont été déposés sur un gel SDS-PAGE 12% de polyacrylamide. Après migration 1h à 24mA, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose AmershamTM Protra[®] premium de 0,45µm (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) pendant 45 minutes à 0,8mA/cm². La membrane est ensuite saturée pendant 1h à température ambiante dans une solution de TBS-T supplémenté avec 5% de lait avant incubation toute la nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire anti-GAPDH (Goat IgG, AF5718, R&D Systems Minneapolis, USA) dilué au 1/2000 dans du TBS-T supplémenté avec 2% de lait, ou bien avec l'anticorps primaire anti-KCC1 (Goat pAb to KCC1, ab115607, Abcam, Cambridge, UK) dilué au 1/1000 dans du TBS-T supplémenté avec 2% de lait. Après 3 lavages de 10 minutes dans du TBS-T, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire (anti-goat couplé à la HRP IgG, Dako, Santa Clara, USA) dilué au 1/2000 dans du TBS-T supplémenté avec 2% de lait, pendant 1h à température ambiante. Les protéines ont été révélées après ajout du réactif ECLTM Prime Western blotting detection (GE Healthcare,

Uppsala, Suède) et visualisées avec le système Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Uppsala, Suède).

VI.4.4. Analyse des données TCGA (The Cancer Genome Atlas)

Les données RNA-Seq concernant les cancers œsophagien, gastrique et colorectal ont été extraites à partir de la base de données Firebrowse (<http://www.firebrowse.org>) et les données sont résumées dans le tableau suivant (Tableau 10) :

Tableau 10 : Données RNA-Seq Firebrowse pour les 3 cancers digestifs étudiés

Cancer	Nombre échantillons		Fichiers Sources (Firebrowse.org)	
	Tissus Sains	Tissus Tumoraux	Expression génique	Nombre de copies
Œsophagien	12	185	ESCA.uncv2.mRNAseq_RSEM_normalized_log2.txt	ESCA-TP.CopyNumber_GISTIC2.Level metadata
Gastrique	35	415	STAD.uncv2.mRNAseq_RSEM_normalized_log2.txt	STAD-TP.CopyNumber_GISTIC2.Level metadata
Colorectal	51	626	COADREAD.uncv2.mRNAseq_RSEM_normalized_log2.txt	COADREAD-TP.CopyNumber_GISTIC2.Level metadata

VI.4.5. Analyses statistiques

Les différences d'expressions géniques entre tissus sains et tissus tumoraux ont été comparées en réalisant des tests de Kruskal-Wallis, grâce au logiciel Past4. Les valeurs correspondent aux moyennes des données log₂ RSEM (RNA-Seq by Expectation-Maximization) ± l'écart à la moyenne (SEM), et les p-values à : *p < 0.05, **p < 0.01 et ***p < 0.001.

Les études de corrélation bivariées entre les expressions de *POFUT1* et *ST3GAL2* ont été réalisées avec des tests de corrélation Spearman, grâce au logiciel Past 4.

Chapitre VII. Discussion générale et perspectives

Comparées aux cellules saines, les cellules cancéreuses sont caractérisées par de nombreuses modifications dans leur fonctionnement qui peuvent être des dérégulations épigénétiques (Costa-Pinheiro et al. 2015) ou géniques, et des dérégulations de modifications post-traductionnelles comme la glycosylation. Plusieurs mécanismes induisent les changements de glycosylation : des duplications géniques qui entraînent une surexpression de certaines glycosyltransférases (Chabanais et al. 2018) ; des mutations au niveau des promoteurs (Almeida et al. 2006) ou encore des mutations dans les séquences codant les glycosyltransférases entraînant des changements d'expressions ou d'activités de ces dernières (McMillan et al. 2017). Ce travail de thèse s'est penché plus particulièrement sur l'étude de 2 glycosyltransférases (POFUT1 et ST3GAL2) dans le contexte du cancer colorectal.

Les mutations de POFUT1 identifiées dans des tumeurs colorectales favorisent l'activité de *O*-fucosylation de POFUT1 :

POFUT1 est impliquée dans plusieurs types de cancers. Sa surexpression est observée dans les tumeurs gastriques (Dong et al. 2017), mammaires (Wan et al. 2017), hépatiques (Ma et al. 2016) ou encore orales (Yokota et al. 2013). Cette surexpression entraîne une augmentation de la quantité d'enzymes et donc de l'activité de *O*-fucosylation, et favorise la tumorigenèse. Il a également été montré que POFUT1 est impliquée dans la transition adénome-carcinome colorectale (Komor et al. 2019). Bien que le travail de Chabanais et al. ait montré que dans 76,02% des cas de cancers colorectaux on trouve une amplification de la région chromosomique 20q11.21 qui conduit à une surexpression de *POFUT1* dans 90,13% des cas, dans les cas où il n'y a ni amplification ni surexpression de *POFUT1* on trouve 7 mutations

dans la séquence codante de *POFUT1*. Elles concernent différentes zones de la protéine et des résidus plus ou moins conservés : R43H impliqué dans la liaison au substrat donneur ; Y73C impliqué dans la liaison au substrat accepteur ; T115A et S300L, résidus peu conservés entre les espèces et à distance du site catalytique ; I343V et D348N, résidus conservés entre les espèces et proches du site catalytique ; et R364W conservé et très proche du site catalytique. D'après la base de données BioMuta, qui regroupe des informations concernant les SNV (Single-Nucleotide Variation) dans les cancers, les mutations R43H, Y73C et T115A n'ont été retrouvées que deux fois, et les autres une seule fois dans des cas de CCR. Certains de ces résidus sont également mutés dans d'autres types de cancers, notamment dans le cancer utérin où l'on retrouve le mutant R43C, dans les mélanomes (T115A et D348N) ou encore dans le cancer du poumon où l'acide aspartique 348 est remplacé par une tyrosine (D348Y). Aucun de ces variants n'avait été caractérisé jusqu'à présent. Nous avons montré que 6 des 7 protéines mutées identifiées dans les tumeurs colorectales peuvent *O*-fucosyler *in vitro* les motifs EGF 12 et 26 de NOTCH1. Les activités observées sont significativement supérieures à celle de POFUT1 WT (entre 2,4 et 3,4 fois plus). Cette augmentation d'activité pourrait compenser l'absence de surexpression de *POFUT1* (due aux amplifications). En fonction des tumeurs, l'accroissement de la *O*-fucosylation serait dû soit à une surexpression du gène dans le cas des amplifications soit à une augmentation de l'activité de l'enzyme pour les variants observés dans des cas de CCR sans surexpression de *POFUT1* (Chabanais et al., 2018).

Nous avons réalisé des modèles de prédiction 3D de POFUT1 avec son substrat donneur, le GDP-fucose, et un substrat accepteur, un motif EGF-like de NOTCH1 afin d'essayer d'expliquer cette augmentation d'activité. Le modèle pour le mutant R43H a montré que le remplacement de l'arginine 43, impliquée dans la liaison au GDP-fucose, par une histidine entraîne un changement de conformation de la poche dans laquelle se place le substrat donneur, rendant le fucose plus accessible et donc potentiellement plus facile à transférer sur son substrat

accepteur. La tyrosine 73 (78 chez la souris) est impliquée dans la liaison au motif EGF receveur. Son remplacement par une cystéine pourrait engendrer une nouvelle liaison hydrogène avec le motif EGF-like et renforcer cette interaction. L'incidence des 4 autres mutations engendrant une augmentation d'activité (T115A, I343V, D348N et R364W) est plus complexe à comprendre. Ces résidus se trouvent dans des régions conservées de l'enzyme (excepté T115) mais n'interagissent pas directement avec les substrats (donneur ou accepteur). Il est cependant possible que ces modifications d'acides aminés entraînent un changement plus global de conformation et rendent les substrats plus accessibles. Même si les modèles de prédiction de fonction de plusieurs classes d'enzymes, basés sur les séquences d'acides aminés se sont avérés fiables lorsqu'ils sont testés biologiquement (Gao et al. 2019), les modèles réalisés qui ne sont que des prédictions, ne permettent pas de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse. Afin d'aller plus loin, des expériences de docking pourraient être réalisées et permettraient de connaître plus en détails les modes d'interaction entre les résidus mutés et les substrats. Des changements de conformation de POFUT1 plus globaux pourraient également être observés.

Ces variants de POFUT1 devraient aussi être étudiés dans le contexte cellulaire. Les réactions de *O*-fucosylation réalisées *in vitro* ne mettent en interaction que les 3 molécules d'intérêts que sont POFUT1, le GDP-fucose et un motif EGF-like. Il serait intéressant d'utiliser des lignées cancéreuses colorectales et d'y recréer ces mutations. Les mutations identifiées chez les patients sont hétérozygotes, afin de recréer ce modèle l'outil moléculaire CRISPR-Cas9 serait le plus adéquat (Das, Bhatia, and Singh 2019). Ces ciseaux moléculaires permettraient d'introduire la mutation voulue dans la séquence génomique de *POFUT1*, la protéine mutée produite pourrait (hyper)*O*-fucosyler ses cibles, et les conséquences de cette hyper *O*-fucosylation être observées. Notamment sur l'activation de la voie NOTCH via le clivage de la partie intracellulaire du récepteur (NICD) et son transport dans le noyau. Ceci afin de confirmer

si l'augmentation d'activité, observée *in vitro* sur un motif EGF-like isolé, est la même *in cellulo* sur le récepteur entier.

D'autres cibles de POFUT1 pourraient également être testées, la protéine WIF1 (Wnt Inhibitory Factor) par exemple (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017), connue pour être une protéine inhibitrice de la voie Wnt/ β -caténine. La voie canonique de signalisation Wnt repose sur l'interaction entre une protéine de la famille Wnt et un récepteur membranaire Frizzled (MacDonald and He 2012). En absence de liaison, la formation d'un complexe de dégradation entraîne l'ubiquitinylation et la dégradation de la β -caténine. En présence de Wnt, le complexe de dégradation est incapable de se former, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis est transloquée dans le noyau afin d'y jouer son rôle de facteur de transcription (Taciak et al. 2018). La protéine WIF1 possède 5 motifs EGF-like (Schneider, Al-Shareffi, and Haltiwanger 2017), et la présence d'un *O*-fucose n'a été démontré que sur un seul motif EGF-like pour la forme murine de la protéine (Pennarubia et al. 2020). En supposant que la forme humaine de WIF1 soit *O*-fucosylée de la même manière que la forme murine, il est possible d'envisager qu'une surexpression de *POFUT1* ou bien que la présence des formes mutées de POFUT1 aboutissent à une protéine WIF1 plus abondamment *O*-fucosylée. Les conséquences de la *O*-fucosylation de WIF1 sont encore inconnues, mais vu l'importance de la *O*-fucosylation de NOTCH, on peut tout à fait imaginer que la *O*-fucosylation de WIF1 puisse altérer son activité, auquel cas, une hyper *O*-fucosylation de WIF1 pourrait entraîner une inhibition de la voie Wnt et une dégradation accrue de la β -caténine. Les gènes régulés par la β -caténine (c-myc, jun, cycline D1, CD44,...) (Shang, Hua, and Hu 2017)(Taciak et al. 2018) ne le seraient plus et on pourrait observer une modification du comportement tumoral des cellules par exemple.

De plus, il a été montré sur des lignées cancéreuses colorectales, que la β -caténine pouvait interagir avec le NICD dans le cytoplasme et que cette interaction favorisait le transport de la β -caténine dans le noyau des cellules tumorales colorectales, et l'activation des gènes cibles

(Hideyuki Ishiguro et al. 2017). *POFUT1* partage un promoteur bidirectionnel avec *PLAGL2*, un facteur de transcription également surexprimé dans les tumeurs colorectales. Il a été montré que la surexpression de ces deux gènes favorisait la tumorigenèse colorectale en régulant de façon positive les voies Wnt et NOTCH (Li et al. 2019). En effet, la surexpression de *PLAGL2* augmente les quantités protéiques de Wnt et de β -caténine, tandis que la surexpression de *POFUT1* régule la voie NOTCH. Si l'on cumule les conséquences d'un changement de *O*-fucosylation sur le récepteur NOTCH et les conséquences hypothétiques d'un tel changement sur la protéine WIF1 (et donc sur la signalisation Wnt/ β -caténine), *POFUT1* pourrait en grande partie réguler le processus de tumorigenèse.

POFUT1 étant considéré comme un oncogène (Dong et al. 2017)(Du et al. 2018)(Komor et al. 2020), il y a fort à penser que les formes hyperactives de l'enzyme favorisent les propriétés tumorales des cellules, comme celles observées lors d'une surexpression de *POFUT1* à la suite des duplications (Chabanais et al. 2018). Évidemment, tous ces éléments peuvent s'appliquer à d'autres cancers, notamment ceux où sont présentes les mêmes mutations de *POFUT1*, comme le cancer utérin, les mélanomes ou le cancer du poumon (d'après la base de données BioMuta). Cependant, même si ces formes de *POFUT1* sont plus actives que la forme sauvage, aucun changement dans la disponibilité des substrats accepteurs et donneurs n'a été observé. Lors de nos expériences de chimie click *in vitro*, les substrats donneurs et accepteurs étaient apportés en excès. Au sein de la cellule, il est difficile de savoir si un des substrats est limitant, voire les deux. Des formes hyperactives de l'enzyme, ou sa surexpression, mais avec une quantité inchangée de GDP-fucose à disposition ne permettraient pas de *O*-fucosyler plus de cibles de *POFUT1*.

Le rallongement du *O*-fucose greffé par *POFUT1* est essentiel pour l'activité du récepteur NOTCH (Taylor et al. 2014). Avec un nombre de copies du gène plus important ou des formes hyperactives de l'enzyme aboutissant dans tous les cas à une augmentation de la *O*-fucosylation

des cibles de POFUT1, est-ce que le *O*-fucose sera systématiquement rallongé ? Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'isoler le récepteur NOTCH et d'analyser par spectrométrie de masse si le *O*-fucose est bien rallongé, et si oui par quels sucres ; est-il seulement rallongé par le GlcNAc ou rallongé jusqu'à obtenir le tétrasaccharide (Sia α 2–3/6Gal β 1–4GlcNAc β 1–3Fuc-*O*) ? Isoler le récepteur NOTCH natif entier est compliqué. Une approche intéressante serait de faire produire des fragments du récepteur NOTCH recombinant dans les cellules exprimant des variants de POFUT1. Utiliser un récepteur NOTCH synthétique a déjà été réalisé pour visualiser la signalisation. Ces études utilisaient un récepteur avec soit la partie intracellulaire remplacée par un facteur de transcription artificiel pour créer un rapporteur de l'activité NOTCH, ou la partie extracellulaire du récepteur remplacée par différents domaines de reconnaissance (anticorps, tags peptidiques) permettant d'activer la voie NOTCH en présence du ligand approprié (Morsut et al. 2016)(Yang et al. 2020).

Nous pourrions utiliser un récepteur NOTCH synthétique avec sa partie intracellulaire modifiée comme précédemment décrit afin de visualiser l'activation de la voie NOTCH, mais également avec un tag dans sa partie extracellulaire afin de pouvoir l'analyser par la suite. Une fois la partie extracellulaire du récepteur NOTCH récupérée (fragmentée), des analyses par spectrométrie de masse seraient réalisées pour chercher la présence de *O*-fucoses dans un premier temps, puis regarder la composition du glycane. Bien entendu des expériences similaires ciblant d'autres cibles de POFUT1 seraient également intéressantes.

La surexpression de *ST3GAL2* dans les tumeurs colorectales favorise le caractère tumoral des cellules. *ST3GAL2*, un nouvel oncogène ?

La sialylation est une modification post-traductionnelle essentielle pour l'organisme. Parmi les 20 sialyltransférases, beaucoup sont déjà impliquées dans différents cancers. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à une α 2-3 sialyltransférase : *ST3GAL2*.

Notre analyse des bases de données RNA-Seq a révélé que *ST3GAL2* était le seul gène de sialyltransférases significativement surexprimé dans les tumeurs colorectales, et à tous les stades. Des études concernent *ST3GAL2* à travers son produit SSEA-4 dans des cas de cancer du sein (Aloia et al. 2015), de la prostate (Harada et al. 2021) ou encore de la vessie (Blomqvist et al. 2021), mais jusqu'alors *ST3GAL2* n'avait jamais encore été étudié dans le contexte du cancer colorectal. Cette surexpression ayant été confirmée sur une série de patients atteints de tumeurs colorectales à différents stades, nous avons décidé de réaliser un knock-down de *ST3GAL2* dans des cellules HT29, représentant un stade 2 de CCR, afin de reproduire un niveau d'expression proche de celui d'une cellule saine. Nous avons montré que la sous-expression de *ST3GAL2* diminuait significativement les propriétés tumorales des cellules (prolifération, migration, invasion), augmentait l'apoptose, et impactait également la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. *ST3GAL2* étant principalement connue pour sialyler des glycolipides, nous avons émis plusieurs hypothèses quant aux résultats observés. Dans les cellules cancéreuses colorectales, la surexpression de *ST3GAL2* pourrait engendrer une quantité plus importante de certains gangliosides notamment GT1b et GD1a, ce dernier étant par ailleurs connu pour favoriser la dimérisation de l'EGFR et activer la voie de signalisation sous-jacente en présence d'EGF (Liu, Li, and Ladisch 2004). La voie de l'EGFR est associée au processus de tumorigenèse en particulier colorectal (Sigismund, Avanzato, and Lanzetti 2018)(Martinelli et al. 2020). Bien que *ST3GAL2* agisse principalement sur des glycolipides, elle peut greffer des acides sialiques en α 2-3 sur des glycoprotéines, mais aucune cible protéique précise de *ST3GAL2* n'est actuellement connue. Nos résultats préliminaires suggèrent que le KD de *ST3GAL2* impacte la sialylation de protéines. Des marquages à la lectine MAA II par lectine-blot, capable de reconnaître les acides sialiques greffées en α 2-3 sur le disaccharide Gal β 1-3GalNAc, ont mis en évidence un marquage moins important sur les protéines issues des cellules HT29-sh*ST3GAL2* comparées aux cellules HT29-shctrl,

notamment sur les protéines membranaires. Une perspective à court terme serait d'identifier au moins une cible protéique de *ST3GAL2* impliquée dans la tumorigenèse colorectale. Pour ce faire, des analyses basées sur la chimie-click seraient envisageables. Cette technique a déjà été utilisée auparavant afin d'identifier des changements globaux dans la lignée cancéreuse HCT116 (Lee et al. 2015). Cette étude a utilisé du *N*-azido-acetyl-D-mannosamine (ManAzido) comme donneur de sucre, le ManNAc (*N*-acétylmannosamine) est le précurseur du CMP-Neu5Ac utilisé par les sialyltransférases. Ce ManAzido est donc métabolisé par les cellules et utilisé pour produire du CMP-Neu5Ac-azido. L'inconvénient de cette technique est que toutes les sialyltransférases peuvent potentiellement utiliser ce sucre modifié. Pour pallier ce problème, un traitement des cellules des lignées HT29 KD pour *ST3GAL2* et des lignées contrôles avec une enzyme *ST3GAL2* recombinante en présence d'un donneur d'acide sialique modifié porteur d'un groupement azido (CMP-Neu5Ac azido) est envisagé. Les sialyltransférases étant des enzymes golgiennes, les protéines exportées à la membrane sont déjà porteuses d'acides sialiques. L'utilisation de nos cellules KD pour *ST3GAL2* générera des protéines avec un défaut de sialylation, qui pourra être comblé grâce à l'apport de CMP-Neu5Ac azido ainsi que de l'enzyme *ST3GAL2* recombinante. En utilisant directement du CMP-Neu5Ac-azido ajouté dans le milieu de culture des cellules avec l'enzyme recombinante, seules les protéines membranaires seront modifiées, et en grande majorité par *ST3GAL2* recombinante qui sera donc présente dans le milieu de culture. L'enzyme recombinante greffera l'acide sialique modifié sur les cibles protéiques et lipidiques (qui sont donc peu voire pas sialylées dans les lignées KD pour *ST3GAL2*). Après une réaction de chimie-click, les protéines marquées pourront alors être isolées en utilisant des billes magnétiques couplées à de la streptavidine, en se basant sur la forte affinité entre la biotine et la streptavidine. Ces protéines isolées pourraient par la suite être identifiées par spectrométrie de masse (Lee et al. 2015), et nous pourrions également identifier le motif glycanique qu'elles portent (North et al. 2009)

(Hui Wang et al. 2020). Nous pensons que les effets observés sur les cellules HT29 impliquent principalement des protéines membranaires. Les premières expériences sont en cours afin de produire l'enzyme ST3GAL2 humaine recombinante. La production dans des cellules de mammifères s'étant avérée difficile, nous avons donc pris le parti de produire cette enzyme en utilisant le système baculovirus, qui permet de produire des quantités plus importantes de protéines.

Au sein d'une population de cellules cancéreuses, on retrouve une sous-population, les cellules souches cancéreuses (CSC), présentes en faible proportion au sein d'une tumeur, mais impliquées dans les phénomènes de résistance à certains traitements ou encore dans l'agressivité tumorale (Barbato et al. 2019)(Papaccio et al. 2017). Ces CSC sont porteuses de marqueurs (ALDH1A, CD133, CD44, EpCAM, NANOG, OCT4, SOX2...) permettant de les identifier (Munro et al. 2018), dont certains sont glycosylés (CD133, CD44, EpCAM) et en particulier sialylés (Khan and Cabral 2021). On sait que la surexpression de *ST6GALNAC1* favorise la formation de CSC dans les tumeurs colorectales (Ogawa et al. 2017), il a également été montré que l' α 2-3 sialylation de CD133 sur ses *N*-glycanes stabilise la protéine (Zhou et al. 2010). La sialylation en α 2-3 de CD44 impacte sa liaison avec certains ligands (Tianfu Wang et al. 2020). Ces données laissent supposer une possible implication de l' α 2-3 sialylation dans le caractère souche des cellules tumorales. Des premières expériences ont été réalisées afin de tester la proportion de CSC dans la lignée KD pour *ST3GAL2* et la lignée contrôle. Les expressions de plusieurs marqueurs des CSC (*ALDH1A*, *CD133*, *CD44*, *NANOG*, *OCT-4*) ont été testées dans les 2 populations cellulaires. Ces résultats préliminaires indiqueraient que le KD de *ST3GAL2* diminue significativement les expressions de ces marqueurs suggérant une quantité moindre de cellules souches. Des expériences complémentaires devront être réalisées afin de confirmer cette sous-expression au niveau protéique. Il serait intéressant de réaliser des

expériences de tri cellulaire afin d'enrichir les cultures en cellules souches. Une autre méthode pour enrichir une population cellulaire en CSC est la culture de sphéroïdes, c'est à dire des cultures en 3 dimensions qui favorisent la population de CSC au sein des cultures (Tatsuya Ishiguro et al. 2017). Des sphéroïdes de 1^{ère} génération puis de seconde génération permettraient d'enrichir en CSC mais également de comparer les capacités de formation des sphéroïdes entre les cellules contrôle et les cellules KD pour *ST3GAL2*. Une fois ces cellules souches obtenues, il serait intéressant de comparer les propriétés tumorales de ces CSC sous-exprimant *ST3GAL2*, ainsi que leur résistance à plusieurs agents anti-tumoraux. Les xénogreffes des cellules HT29 KD pour *ST3GAL2* et des cellules contrôles ont montré que la baisse d'expression de *ST3GAL2* impactait fortement la formation des tumeurs *in vivo*. Des xénogreffes chez des souris mais cette fois-ci avec des sphéroïdes (enrichis en CSC) (Ong et al. 2018) pourraient s'avérer très intéressantes. Cela permettrait de voir si la surexpression de *ST3GAL2* est impliquée dans la formation de cellules souches cancéreuses *in vivo*.

POFUT1/ST3GAL2 : un régulateur commun ?

POFUT1 et ST3GAL2 sont 2 enzymes que tout oppose, elles diffèrent dans leurs cibles (sérine ou thréonine de motifs EGF-like *vs* galactose lié en β 1-3 sur un GlcNAc), leurs substrats (GDP-fucose *vs* Neu5Ac) et leurs localisations (réticulum endoplasmique *vs* appareil de Golgi). Elles partagent cependant un point commun, nous avons remarqué que ces 2 gènes sont tous deux surexprimés dans les cancers colorectaux, mais également œsophagiens et gastriques, 3 cancers du système digestif. Existe-t-il un mécanisme de régulation commun entre ces 2 gènes aboutissant à leur surexpression dans 3 cancers de l'appareil digestif ?

La recherche de miRNA pouvant cibler ces 2 gènes n'a révélé qu'un seul miRNA avec cependant quelques réserves sur la régulation de *POFUT1* par ce dernier.

Ces petits ARN non codants sont souvent dérégulés dans des cas de cancers et servent maintenant de marqueurs tumoraux (Mitchell et al. 2008). Dans les tumeurs colorectales, les miRNA sont impliqués dans la progression tumorale, en effet plusieurs miRNA conduisent à l'activation des voies Wnt/ β -caténine, de l'EGFR ou encore l'inactivation du suppresseur de tumeur p53 aboutissant à la progression tumorale colorectale (Balacescu et al. 2018). Pour la voie Wnt/ β -caténine par exemple, plusieurs miRNA peuvent conduire à la suppression directe de APC, acteur essentiel à la signalisation ; d'autres miRNA conduisent à l'activation aberrante de la voie ; et d'autres encore peuvent cibler des acteurs sous-jacents qui aboutiront à une non destruction de la β -caténine et une activation des gènes cibles favorisant la tumorigenèse.

Un miRNA pouvant réguler jusqu'à 200 ARN messagers et un ARN messager pouvant être régulé par plusieurs miRNA (Krek et al. 2005), *POFUT1* et *ST3GAL2* pourraient être régulés par des miRNA différents. Cette régulation aboutirait à leur surexpression et favoriserait le processus tumoral. Cette voie des miRNA reste encore à explorer, mais offre des perspectives prometteuses quant à l'implication d'un potentiel miRNA commun à *POFUT1* et *ST3GAL2*.

Un travail préliminaire a été engagé afin de comprendre les mécanismes pouvant réguler les expressions de *POFUT1* et de *ST3GAL2*. Bien que la majorité des cas de cancers colorectaux présente une amplification de la région génique associée à *POFUT1*, pour certains patients malgré l'absence d'amplification, *POFUT1* est quand même surexprimé. A quoi serait due cette surexpression ? La région génique associée à *ST3GAL2* n'est pas amplifiée dans les tumeurs colorectales (d'après la base de données Firebrowse), n'augmentant pas le nombre de copies du gène. Il en est de même pour les tumeurs œsophagiennes et gastriques, le nombre de copies de *POFUT1* et *ST3GAL2* ne semble pas augmenter.

La recherche d'un mécanisme de régulation commun entre ces 2 gènes a permis d'identifier 9 protéines exprimées dans le colon et capables d'interagir à la fois avec les séquences

nucléotidiques de *POFUT1* et de *ST3GAL2*. L'analyse du taux d'expression de ces 9 gènes dans les tumeurs colorectales, œsophagiennes et gastriques révèle qu'un seul gène est systématiquement surexprimé comparé aux tissus sains : *SMC1A*. Il code la protéine SMC1A qui fait partie du complexe de la cohésine (Losada and Hirano 2005). En plus de son rôle de cohésion entre les chromatides, ce complexe est connu pour participer à des processus biologiques importants comme l'activation des points de contrôles du cycle cellulaire (Watrin and Peters 2009), la réparation de l'ADN par recombinaison homologue et non homologue (Gelot et al. 2016)(Sjögren and Nasmyth 2001) ou encore le contrôle de la vitesse de la fourche de réplication (Cucco et al. 2018)(Terret et al. 2009). SMC1A est impliquée dans la tumorigenèse colorectale, et sa surexpression dans les tumeurs colorectales est associée à un faible pronostic ainsi qu'à une faible survie des patients (Wang et al. 2015). L'expression de *SMC1A* corrèle avec l'avancée de la tumeur, il est plus exprimé dans les carcinomes colorectaux que dans les adénomes (Sarogni et al. 2019). Cette surexpression est associée à une augmentation des propriétés tumorales, puisque des xénogreffes de cellules HCT116 surexprimant *SMC1A* dans un modèle murin forment des tumeurs de tailles et de poids supérieurs à des tumeurs issues de cellules HCT116 classiques (Sarogni et al. 2019).

Un KD de *SMC1A* a été réalisé dans un modèle cellulaire de kératinocytes (Noutsou et al. 2017), et révèle que le complexe de la cohésine et en particulier SMC1A est nécessaire pour l'auto-renouvellement des cellules progénitrices de la couche profonde de l'épiderme. La perte de SMC1A provoque une augmentation de la compaction de la chromatine, et donc une diminution d'expression des gènes associés (Noutsou et al. 2017). Il était déjà connu que la perte de la cohésine engendrait de tels résultats (Mazumdar et al. 2015)(Yan et al. 2013).

Le complexe de la cohésine est impliqué dans la régulation génique. En effet, l'inactivation de la cohésine via la dégradation de RAD21 qui fait partie du complexe, dans la lignée colorectale

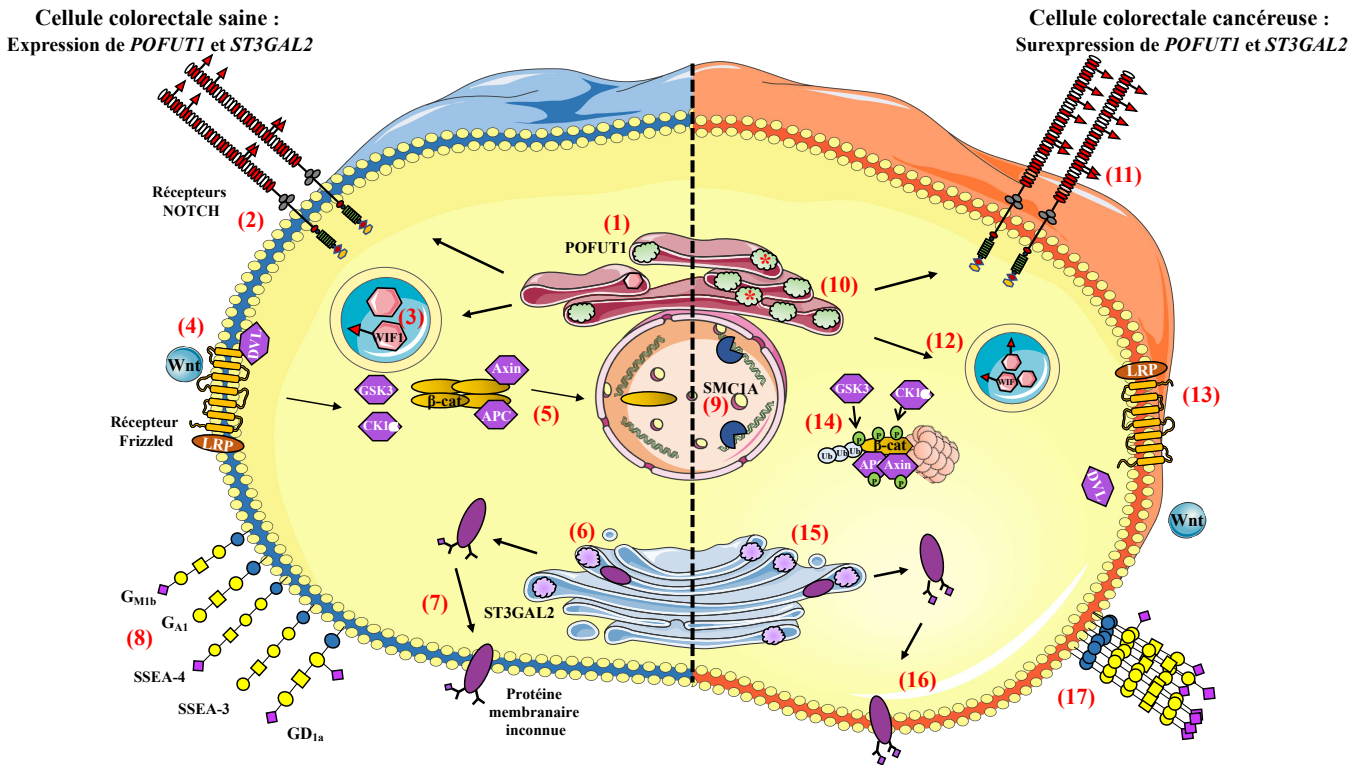


Figure 39 : Figure de synthèse

Dans une cellule colorectale saine, la présence de POFUT1 dans le réticulum endoplasmique (1) permet la *O*-fucosylation du récepteur NOTCH (2) et d'autres protéines cibles notamment WIF1 (3). La voie Wnt/ β -caténine est régulée de manière normale, à la suite de la liaison de Wnt au récepteur Frizzled (4), le complexe de destruction de la β -caténine est inactivé et cette dernière s'accumule dans le cytoplasme (5) puis est transloquée dans le noyau afin d'assurer son rôle de facteur de transcription.

L'expression de ST3GAL2 dans l'appareil de Golgi (6) pourrait permettre la sialylation de protéines de surface inconnues pour l'instant (7), ainsi que la synthèse de plusieurs gangliosides comme G_{M1b} et SSEA-4 par exemple (8).

Dans une cellule cancéreuse colorectale, le potentiel régulateur commun à POFUT1 et ST3GAL2, SMC1A, serait surexprimé (9). Cette surexpression pourrait entraîner la surexpression de POFUT1 et ST3GAL2. L'augmentation de POFUT1 ou la présence de formes mutées de l'enzyme (symbolisées par des astérisques *) dans le réticulum endoplasmique (10) peut conduire à une augmentation de la *O*-fucosylation du récepteur NOTCH (11) et/ou de la protéine WIF1 (12). La *O*-fucosylation de WIF1 pourrait empêcher la liaison du ligand Wnt au récepteur Frizzled (13), entraînant la non-destruction du complexe de dégradation de la β -caténine. Cette dernière serait alors ubiquitinylée et dégradée par le protéasome (14) et incapable de réguler ses gènes cibles aboutissant à la survie des cellules cancéreuses. La surexpression de ST3GAL2 dans ces mêmes cellules (15), pourrait aboutir à une sialylation plus importante de protéines de surfaces (16), et permettrait une synthèse plus importante de la forme sialylée de certains gangliosides qui pourrait favoriser la formation de rafts lipidiques (17).

HCT116 aboutit à un changement d'expression génique global (Rao et al. 2017). Les gènes impactés par l'inactivation du complexe sont pour la majorité sous-exprimés (61%), alors que 39% sont surexprimés, sans que l'on sache précisément à quelle famille génique ils appartiennent (Rao et al. 2017). Il est tout à fait possible que la surexpression de *SMC1A* dans les cancers œsophagien, gastrique et colorectal favorise l'activation du complexe de la cohésine et, au contraire de son inactivation, favorise majoritairement la surexpression de certains gènes, dont possiblement *POFUT1* et *ST3GAL2*. Un KD de *SMC1A* dans des cellules colorectales HT29 a été réalisé (Li et al. 2016) et montre que la sous-expression de *SMC1A* induit les mêmes effets que le KD de *ST3GAL2* réalisé par notre équipe, c'est à dire une diminution de la prolifération dès 48h, une augmentation de la proportion de cellules en apoptose et un changement de répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire (Li et al. 2016). Un KD de *POFUT1* dans des lignées cancéreuses colorectales (HCT116 et SW620) provoque les mêmes effets, c'est à dire une diminution de la prolifération, une augmentation de la proportion de cellules en apoptose et un changement de répartition des cellules dans le cycle cellulaire (Du et al. 2018). Si *SMC1A* régule les expressions de *POFUT1* et de *ST3GAL2*, sa dérégulation génique dans un modèle cellulaire colorectal provoquerait une diminution de leur expression.

La découverte d'un potentiel régulateur commun entre ces 2 gènes est un résultat très intéressant qui montre une fois de plus que la biologie est une discipline complexe et que nous avons encore énormément de choses à comprendre, notamment en ce qui concerne les glycosylations. Ces modifications post-traductionnelles sont étudiées depuis de nombreuses décennies mais certains aspects sont encore incompris. Il a d'ailleurs été publié très récemment que des ARN pouvaient être modifiés par des *N*-glycanes (Flynn et al. 2021).

Références bibliographiques

- Aetius, James V. Ricci, and Janus Cornarius
1950 *The Gynaecology and Obstetrics of the VIth Century, A. D. Tetra Biblon, Bk. 16* English. Philadelphia: Blakiston. <https://catalog.hathitrust.org/Record/001586507>, accessed October 2, 2020.
- Al Jaam, Bilal, Katy Heu, Florian Pennarubia, et al.
2016 Reduced Notch Signalling Leads to Postnatal Skeletal Muscle Hypertrophy in Pofut1^{cax/Cax} Mice. *Open Biology* 6(9): 160211.
- Almeida, Antonio M., Yoshiko Murakami, D. Mark Layton, et al.
2006 Hypomorphic Promoter Mutation in PIGM Causes Inherited Glycosylphosphatidylinositol Deficiency. *Nature Medicine* 12(7): 846–851.
- Aloia, Andrea, Evgeniya Petrova, Stefan Tomiuk, et al.
2015 The Sialyl-Glycolipid Stage-Specific Embryonic Antigen 4 Marks a Subpopulation of Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Cells with Mesenchymal Features. *Breast Cancer Research : BCR* 17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4660783/>, accessed June 25, 2019.
- Amado, Rafael G., Michael Wolf, Marc Peeters, et al.
2008 Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26(10): 1626–1634.
- Arderne, John
1999 *Treatises of Fistula in Ano: Haemorrhoids, and Clysters* / by John Arderne. <http://name.umdl.umich.edu/ArderneFistula>.
- Astler, V. B., and F. A. Collier
1954 The Prognostic Significance of Direct Extension of Carcinoma of the Colon and Rectum. *Annals of Surgery* 139(6): 846–852.
- Aulus Cornelius Celsus (1478)
2016 *The James Lind Library*. <https://www.jameslindlibrary.org/celsus-alus-cornelius-1st-century-ce/>, accessed September 1, 2021.
- Bacher, Jeffery W., Laura A. Flanagan, Regenia L. Smalley, et al.
2004 Development of a Fluorescent Multiplex Assay for Detection of MSI-High Tumors. *Disease Markers* 20(4–5): 237–250.
- Balacescu, Ovidiu, Daniel Sur, Calin Cainap, et al.
2018 The Impact of MiRNA in Colorectal Cancer Progression and Its Liver Metastases. *International Journal of Molecular Sciences* 19(12): E3711.
- Barbato, Luisa, Marco Bocchetti, Anna Di Biase, and Tarik Regad
2019 Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *Cells* 8(8): E926.

- Bennett, Eric P., Ulla Mandel, Henrik Clausen, et al.
2012 Control of Mucin-Type O-Glycosylation: A Classification of the Polypeptide GalNAc-Transferase Gene Family. *Glycobiology* 22(6): 736–756.
- Béroud, Christophe, and Thierry Soussi
2003 The UMD-P53 Database: New Mutations and Analysis Tools. *Human Mutation* 21(3): 176–181.
- Bestor, T. H.
2000 The DNA Methyltransferases of Mammals. *Human Molecular Genetics* 9(16): 2395–2402.
- Bhide, Gaurang P., and Karen J. Colley
2017 Sialylation of N-Glycans: Mechanism, Cellular Compartmentalization and Function. *Histochemistry and Cell Biology* 147(2): 149–174.
- Blomqvist, Matias, Ilmari Koskinen, Eliisa Löyttyniemi, et al.
2021 Prognostic and Predictive Value of ALDH1, SOX2 and SSEA-4 in Bladder Cancer. *Scientific Reports* 11(1): 13684.
- Boland, C. R., S. N. Thibodeau, S. R. Hamilton, et al.
1998 A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Research* 58(22): 5248–5257.
- Born, G. V., and W. Palinski
1985 Unusually High Concentrations of Sialic Acids on the Surface of Vascular Endothelia. *British Journal of Experimental Pathology* 66(5): 543–549.
- Botteri, Edoardo, Simona Iodice, Vincenzo Bagnardi, et al.
2008 Smoking and Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *JAMA* 300(23): 2765–2778.
- Braccioli, Luca, and Elzo de Wit
2019 CTCF: A Swiss-Army Knife for Genome Organization and Transcription Regulation. *Essays in Biochemistry* 63(1): 157–165.
- Britain, Colleen M., Andrew T. Holdbrooks, Joshua C. Anderson, Christopher D. Willey, and Susan L. Bellis
2018 Sialylation of EGFR by the ST6Gal-I Sialyltransferase Promotes EGFR Activation and Resistance to Gefitinib-Mediated Cell Death. *Journal of Ovarian Research* 11(1): 12.
- Brockhausen, Inka, Harry Schachter, and Pamela Stanley
2009 O-GalNAc Glycans. *In* *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Ajit Varki, Richard D. Cummings, Jeffrey D. Esko, et al., eds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1896/>, accessed April 30, 2021.
- Brückner, K., L. Perez, H. Clausen, and S. Cohen
2000 Glycosyltransferase Activity of Fringe Modulates Notch-Delta Interactions. *Nature* 406(6794): 411–415.

- Campbell, Iain D., and Peer Bork
1993 Epidermal Growth Factor-like Modules. *Current Opinion in Structural Biology* 3(3): 385–392.
- Canavan, C., K. R. Abrams, and J. Mayberry
2006 Meta-Analysis: Colorectal and Small Bowel Cancer Risk in Patients with Crohn's Disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 23(8): 1097–1104.
- Centelles, Josep J.
2012 General Aspects of Colorectal Cancer. *ISRN Oncology* 2012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3504424/>, accessed March 12, 2021.
- Chabanais, Julien, François Labrousse, Alain Chaunavel, Agnès Germot, and Abderrahman Maftah
2018 POFUT1 as a Promising Novel Biomarker of Colorectal Cancer. *Cancers* 10(11).
- Chadeneau, C., K. Hay, H. W. Hirte, S. Gallinger, and S. Bacchetti
1995 Telomerase Activity Associated with Acquisition of Malignancy in Human Colorectal Cancer. *Cancer Research* 55(12): 2533–2536.
- Chandrasekaran, E. V., Jun Xue, Jie Xia, et al.
2008 Reversible Sialylation: Synthesis of Cytidine 5'-Monophospho-N-Acetylneuraminic Acid from Cytidine 5'-Monophosphate with Alpha2,3-Sialyl O-Glycan-, Glycolipid-, and Macromolecule-Based Donors Yields Diverse Sialylated Products. *Biochemistry* 47(1): 320–330.
- Chen, J., D. J. Moloney, and P. Stanley
2001 Fringe Modulation of Jagged1-Induced Notch Signaling Requires the Action of Beta 4galactosyltransferase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(24): 13716–13721.
- Chen, Mingfei, Yi Li, Hong Liu, et al.
2014 Analysis of POFUT1 Gene Mutation in a Chinese Family with Dowling-Degos Disease. *PloS One* 9(8): e104496.
- Choo, Young-Kug, Kazuyoshi Chiba, Tadashi Tai, Manabu Ogiso, and Motonori Hoshi
1995 Differential Distribution of Gangliosides in Adult Rat Ovary during the Oestrous Cycle. *Glycobiology* 5(3): 299–309.
- Christie, Daniel R., Faheem M. Shaikh, John A. Lucas, John A. Lucas, and Susan L. Bellis
2008 ST6Gal-I Expression in Ovarian Cancer Cells Promotes an Invasive Phenotype by Altering Integrin Glycosylation and Function. *Journal of Ovarian Research* 1(1): 3.
- Clevers, Hans, and Roel Nusse
2012 Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell* 149(6): 1192–1205.
- Costa-Pinheiro, Pedro, Diana Montezuma, Rui Henrique, and Carmen Jerónimo
2015 Diagnostic and Prognostic Epigenetic Biomarkers in Cancer. *Epigenomics* 7(6): 1003–1015.

- Crooks, Ema T., Samantha L. Grimley, Michelle Cully, et al. 2018 Glycoengineering HIV-1 Env Creates “supercharged” and “Hybrid” Glycans to Increase Neutralizing Antibody Potency, Breadth and Saturation. *PLoS Pathogens* 14(5): e1007024.
- Cucco, Francesco, Elisa Palumbo, Serena Camerini, et al. 2018 *Separase Prevents Genomic Instability by Controlling Replication Fork Speed*. *Nucleic Acids Research* 46(1): 267–278.
- Cumin, Cécile, Yen-Lin Huang, Arun Everest-Dass, and Francis Jacob 2021 Deciphering the Importance of Glycosphingolipids on Cellular and Molecular Mechanisms Associated with Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. *Biomolecules* 11(1).
- Cunha, F. 1949 The Edwin Smith Surgical Papyrus. *American Journal of Surgery* 78(2): 277.
- D’Angelo, Giovanni, Serena Capasso, Lucia Sticco, and Domenico Russo 2013 Glycosphingolipids: Synthesis and Functions. *The FEBS Journal* 280(24): 6338–6353.
- Das, Jhumki, Prateek Bhatia, and Aditya Singh 2019 CRISP Points on Establishing CRISPR-Cas9 In Vitro Culture Experiments in a Resource Constraint Haematology Oncology Research Lab. *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion: An Official Journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion* 35(2): 208–214.
- Datta, A. K., R. Chammas, and J. C. Paulson 2001 Conserved Cysteines in the Sialyltransferase Sialylmotifs Form an Essential Disulfide Bond. *The Journal of Biological Chemistry* 276(18): 15200–15207.
- Datta, A. K., and J. C. Paulson 1995 The Sialyltransferase “Sialylmotif” Participates in Binding the Donor Substrate CMP-NeuAc. *The Journal of Biological Chemistry* 270(4): 1497–1500.
- Datta, A. K., A. Sinha, and J. C. Paulson 1998 Mutation of the Sialyltransferase S-Sialylmotif Alters the Kinetics of the Donor and Acceptor Substrates. *The Journal of Biological Chemistry* 273(16): 9608–9614.
- Datta, Arun K. 2009 Comparative Sequence Analysis in the Sialyltransferase Protein Family: Analysis of Motifs. *Current Drug Targets* 10(6): 483–498.
- Dell, Anne, Alaa Galadari, Federico Sastre, and Paul Hitchen 2010 Similarities and Differences in the Glycosylation Mechanisms in Prokaryotes and Eukaryotes. *International Journal of Microbiology* 2010: 1–14.
- Der Vartanian, Audrey, Aymeric Audfray, Bilal Al Jaam, et al. 2015 Protein O-Fucosyltransferase 1 Expression Impacts Myogenic C2C12 Cell Commitment via the Notch Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology* 35(2): 391–405.

Dong, Shuang, Zhe Wang, Binbin Huang, et al.
2017 Bioinformatics Insight into Glycosyltransferase Gene Expression in Gastric Cancer: POFUT1 Is a Potential Biomarker. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483(1): 171–177.

Donné, Alfred, and Léon Foucault
1845 *Cours de microscopie complémentaire des études médicales : anatomie microscopique et physiologie des fluides de l'économie*. Paris : J.-B. Baillière.
http://archive.org/details/BIUSante_00576, accessed August 24, 2021.

Doucey, Marie-Agnès, Daniel Hess, René Cacan, and Jan Hofsteenge
1998 Protein C-Mannosylation Is Enzyme-Catalysed and Uses Dolichyl-Phosphate-Mannose as a Precursor. *Molecular Biology of the Cell* 9(2): 291–300.

Draht, Muriel X. G., Robert R. Riedl, Hanneke Niessen, et al.
2012 Promoter CpG Island Methylation Markers in Colorectal Cancer: The Road Ahead. *Epigenomics* 4(2): 179–194.

Drickamer, Kurt
1993 Letters to the Glyco-Forum: A Conserved Disulphide Bond in Sialyltransferases. *Glycobiology* 3(1): 2–3.

Du, Yuheng, Daojiang Li, Nanpeng Li, et al.
2018 POFUT1 Promotes Colorectal Cancer Development through the Activation of Notch1 Signaling. *Cell Death & Disease* 9(10). <http://www.nature.com/articles/s41419-018-1055-2>, accessed July 3, 2019.

Duffy, M. J, A van Dalen, C Haglund, et al.
2003 Clinical Utility of Biochemical Markers in Colorectal Cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) Guidelines. *European Journal of Cancer* 39(6): 718–727.

Dukes, Cuthbert E.
1932 The Classification of Cancer of the Rectum. *The Journal of Pathology and Bacteriology* 35(3): 323–332.

Eaden, J. A., K. R. Abrams, and J. F. Mayberry
2001 The Risk of Colorectal Cancer in Ulcerative Colitis: A Meta-Analysis. *Gut* 48(4): 526–535.

Ellegren, Hans
2004 Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution. *Nature Reviews. Genetics* 5(6): 435–445.

Engelhardt, M., P. Drullinsky, J. Guillem, and M. A. Moore
1997 Telomerase and Telomere Length in the Development and Progression of Premalignant Lesions to Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 3(11). American Association for Cancer Research: 1931–1941.

Fan, Tan-Chi, Hui Ling Yeo, Huan-Ming Hsu, et al.
2018 Reciprocal Feedback Regulation of ST3GAL1 and GFRA1 Signaling in Breast Cancer

Cells. *Cancer Letters* 434: 184–195.

Fast, D. G., J. C. Jamieson, and G. McCaffrey
1993 The Role of the Carbohydrate Chains of Gal Beta-1,4-GlcNAc Alpha 2,6-Sialyltransferase for Enzyme Activity. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1202(2): 325–330.

Fedorova, Maria S., George S. Krasnov, Elena N. Lukyanova, et al.
2019 The CIMP-High Phenotype Is Associated with Energy Metabolism Alterations in Colon Adenocarcinoma. *BMC Medical Genetics* 20(Suppl 1): 52.

Fenderson, B. A., E. M. Eddy, and S. Hakomori
1990 Glycoconjugate Expression during Embryogenesis and Its Biological Significance. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 12(4): 173–179.

Flynn, Ryan A., Kayvon Pedram, Stacy A. Malaker, et al.
2021 Small RNAs Are Modified with N-Glycans and Displayed on the Surface of Living Cells. *Cell*.

Fujiwara, Miho, Shintaro Kato, Yuki Niwa, et al.
2016 C-Mannosylation of R-Spondin3 Regulates Its Secretion and Activity of Wnt/ β -Catenin Signaling in Cells. *FEBS Letters* 590(16): 2639–2649.

Fukushima, K., T. Ohkura, M. Kanai, et al.
1995 Carbohydrate Structures of a Normal Counterpart of the Carcinoembryonic Antigen Produced by Colon Epithelial Cells of Normal Adults. *Glycobiology* 5(1): 105–115.

Furmanek, A., and J. Hofsteenge
2000 Protein C-Mannosylation: Facts and Questions. *Acta Biochimica Polonica* 47(3): 781–789.

Gao, Ruibo, Mengmeng Wang, Jiaoyan Zhou, et al.
2019 Prediction of Enzyme Function Based on Three Parallel Deep CNN and Amino Acid Mutation. *International Journal of Molecular Sciences* 20(11): E2845.

Garneau, A. P., S. Slimani, L. E. Tremblay, et al.
2019 K⁺-Cl⁻ Cotransporter 1 (KCC1): A Housekeeping Membrane Protein That Plays Key Supplemental Roles in Hematopoietic and Cancer Cells. *Journal of Hematology & Oncology* 12(1): 74.

Garnham, Rebecca, Emma Scott, Karen E. Livermore, and Jennifer Munkley
2019 ST6GAL1: A Key Player in Cancer. *Oncology Letters* 18(2): 983–989.

Gelot, Camille, Josée Guirouilh-Barbat, Tangui Le Guen, et al.
2016 The Cohesin Complex Prevents the End Joining of Distant DNA Double-Strand Ends. *Molecular Cell* 61(1): 15–26.

Geremia, R. A., A. Harduin-Lepers, and P. Delannoy
1997 Identification of Two Novel Conserved Amino Acid Residues in Eukaryotic Sialyltransferases: Implications for Their Mechanism of Action. *Glycobiology* 7(2): v–vii.

- Gerhard, Daniela S., Lukas Wagner, Elise A. Feingold, et al. 2004 The Status, Quality, and Expansion of the NIH Full-Length CDNA Project: The Mammalian Gene Collection (MGC). *Genome Research* 14(10B): 2121–2127.
- Gertler, Ralf, Robert Rosenberg, Dominik Stricker, et al. 2004 Telomere Length and Human Telomerase Reverse Transcriptase Expression as Markers for Progression and Prognosis of Colorectal Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 22(10): 1807–1814.
- Gillespie, W., S. Kelm, and J. C. Paulson 1992 Cloning and Expression of the Gal Beta 1, 3GalNAc Alpha 2,3-Sialyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 267(29). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 21004–21010.
- Giordanengo, Valerie, Sylvie Bannwarth, Catherine Laffont, et al. 1997 Cloning and Expression of CDNA for a Human Gal(Beta1-3)GalNAc Alpha2,3-Sialyltransferase from the CEM T-Cell Line. *European Journal of Biochemistry* 247(2): 558–566.
- Grady, William M., and John M. Carethers 2008 Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* 135(4): 1079–1099.
- Groux-Degroote, Sophie, Yann Guérardel, and Philippe Delannoy 2017 Gangliosides: Structures, Biosynthesis, Analysis, and Roles in Cancer. *ChemBioChem* 18(13): 1146–1154.
- Hajdu, Steven I. 2004 Greco-Roman Thought about Cancer. *Cancer* 100(10): 2048–2051.
2011 A Note from History: Landmarks in History of Cancer, Part 2: A Note from History, Part 2. *Cancer* 117(12): 2811–2820.
- Hampel, Heather, Wendy L. Frankel, Edward Martin, et al. 2005 Screening for the Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). *The New England Journal of Medicine* 352(18): 1851–1860.
- Harada, Junki, Yasuyoshi Miyata, Takenobu Taima, et al. 2021 Stage-Specific Embryogenic Antigen-4 Expression in Castration-Resistant Prostate Cancer and Its Correlation With the Androgen Receptor. *Anticancer Research* 41(7): 3327–3335.
- Harduin-Lepers, Anne, Marie-Ange Krzewinski-Recchi, Florent Colomb, et al. 2012 Sialyltransferases Functions in Cancers. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 4: 499–515.
- Harduin-Lepers, Anne, Rosella Mollicone, Philippe Delannoy, and Rafael Oriol 2005 The Animal Sialyltransferases and Sialyltransferase-Related Genes: A Phylogenetic Approach. *Glycobiology* 15(8): 805–817.
- Harduin-Lepers, Anne, Veronica Vallejo-Ruiz, Marie-Ange Krzewinski-Recchi, et al.

2001 The Human Sialyltransferase Family. *Biochimie* 83(8): 727–737.

Harris, R. J., H. van Halbeek, J. Glushka, et al.
1993 Identification and Structural Analysis of the Tetrasaccharide NeuAc Alpha(2-->6)Gal Beta(1-->4)GlcNAc Beta(1-->3)Fuc Alpha 1-->O-Linked to Serine 61 of Human Factor IX. *Biochemistry* 32(26): 6539–6547.

Hennet, T., D. Chui, J. C. Paulson, and J. D. Marth
1998 Immune Regulation by the ST6Gal Sialyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(8): 4504–4509.

Henrissat, Bernard, Avadesha Surolia, and Pamela Stanley
2009 A Genomic View of Glycobiology. *In* *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Ajit Varki, Richard D. Cummings, Jeffrey D. Esko, et al., eds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1916/>, accessed September 1, 2021.

Herman, J. G., A. Umar, K. Polyak, et al.
1998 Incidence and Functional Consequences of HMLH1 Promoter Hypermethylation in Colorectal Carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(12): 6870–6875.

Hermesen, Mario, Cindy Postma, Jan Baak, et al.
2002 Colorectal Adenoma to Carcinoma Progression Follows Multiple Pathways of Chromosomal Instability. *Gastroenterology* 123(4): 1109–1119.

Higel, Fabian, Andreas Seidl, Fritz Sörgel, and Wolfgang Friess
2016 N-Glycosylation Heterogeneity and the Influence on Structure, Function and Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies and Fc Fusion Proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 100: 94–100.

Hill, Victoria K., Jung-Sik Kim, and Todd Waldman
2016 Cohesin Mutations in Human Cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1866(1): 1–11.

Hippocrates, and Emile Littré
1839 *Oeuvres complètes d’Hippocrate : traduction nouvelle avec le texte grec en regard, collationné sur les manuscrits et toutes les éditions : accompagnée d’une introduction de commentaires médicaux, de variantes et de notes philologiques : suivie d’une table générale des matières.* Paris : J.B. Baillière. <http://archive.org/details/oeuvrescomplte01hippuoft>, accessed April 28, 2021.

Hofsteenge, J., K. G. Huwiler, B. Macek, et al.
2001 C-Mannosylation and O-Fucosylation of the Thrombospondin Type 1 Module. *The Journal of Biological Chemistry* 276(9): 6485–6498.

Hofsteenge, J., D. R. Müller, T. de Beer, et al.
1994 New Type of Linkage between a Carbohydrate and a Protein: C-Glycosylation of a Specific Tryptophan Residue in Human RNase Us. *Biochemistry* 33(46): 13524–13530.

- Holdener, Bernadette C., and Robert S. Haltiwanger
2019 Protein O-Fucosylation: Structure and Function. *Current Opinion in Structural Biology* 56: 78–86.
- Holst, Stephanie, Anna J. M. Deuss, Gabi W. van Pelt, et al.
2016 N-Glycosylation Profiling of Colorectal Cancer Cell Lines Reveals Association of Fucosylation with Differentiation and Caudal Type Homeobox 1 (CDX1)/Villin mRNA Expression. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 15(1): 124–140.
- Hong, Hye Kyung, Dae Hee Pyo, Tae Won Kim, et al.
2019 Efficient Primary Culture Model of Patient-derived Tumor Cells from Colorectal Cancer Using a Rho-associated Protein Kinase Inhibitor and Feeder Cells. *Oncology Reports* 42(5): 2029–2038.
- Huang, Xiwen, Yongquan Lan, En Li, et al.
2021 Diagnostic Values of MMP-7, MMP-9, MMP-11, TIMP-1, TIMP-2, CEA, and CA19-9 in Patients with Colorectal Cancer. *The Journal of International Medical Research* 49(5): 3000605211012570.
- Imamura, Y., K. Yasutake, Y. Yoshimura, et al.
1990 Contents of Tissue CEA and CA19-9 in Colonic Polyp and Colorectal Cancer, and Their Clinical Significance. *Gastroenterologia Japonica* 25(2): 186–192.
- Ionov, Y., M. A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata, and M. Perucho
1993 Ubiquitous Somatic Mutations in Simple Repeated Sequences Reveal a New Mechanism for Colonic Carcinogenesis. *Nature* 363(6429): 558–561.
- Isgrò, Maria Antonietta, Patrizia Bottoni, and Roberto Scatena
2015 Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 867: 125–143.
- Ishiguro, Hideyuki, Tomotaka Okubo, Yoshiyuki Kuwabara, et al.
2017 NOTCH1 Activates the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Colon Cancer. *Oncotarget* 8(36): 60378–60389.
- Ishiguro, Tatsuya, Hirokazu Ohata, Ai Sato, et al.
2017 Tumor-derived Spheroids: Relevance to Cancer Stem Cells and Clinical Applications. *Cancer Science* 108(3): 283–289.
- Itzkowitz, S. H., M. Yuan, C. K. Montgomery, et al.
1989 Expression of Tn, Sialosyl-Tn, and T Antigens in Human Colon Cancer. *Cancer Research* 49(1): 197–204.
- Jacques, Jean-Marie
1998 La bile noire dans l'antiquité grecque : médecine et littérature. *Revue des Études Anciennes* 100(1). Persée - Portail des revues scientifiques en SHS: 217–234.
- Jeanneau, Charlotte, Valérie Chazalet, Claudine Augé, et al.
2004 Structure-Function Analysis of the Human Sialyltransferase ST3Gal I: Role of n-Glycosylation and a Novel Conserved Sialylmotif. *The Journal of Biological Chemistry*

279(14): 13461–13468.

Jiricny, Josef
2006 The Multifaceted Mismatch-Repair System. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7(5): 335–346.

Johnson, C.D., M-H. Chen, A.Y. Toledano, et al.
2008 Accuracy of CT Colonography for Detection of Large Adenomas and Cancers. *The New England Journal of Medicine* 359(12): 1207–1217.

Kaji, Hiroyuki, Jun-ichi Kamiie, Hirotaka Kawakami, et al.
2007 Proteomics Reveals N-Linked Glycoprotein Diversity in *Caenorhabditis Elegans* and Suggests an Atypical Translocation Mechanism for Integral Membrane Proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* 6(12). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 2100–2109.

Kampen, Kim R.
2012 The Discovery and Early Understanding of Leukemia. *Leukemia Research* 36(1): 6–13.

Kannagi, Reiji
2007 Carbohydrate Antigen Sialyl Lewis A--Its Pathophysiological Significance and Induction Mechanism in Cancer Progression. *Chang Gung Medical Journal* 30(3): 189–209.

Karapetis, Christos S., Shirin Khambata-Ford, Derek J. Jonker, et al.
2008 K-Ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine* 359(17): 1757–1765.

Karpozilos, A., and N. Pavlidis
2004 The Treatment of Cancer in Greek Antiquity. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 40(14): 2033–2040.

Khan, Thahomina, and Horacio Cabral
2021 Abnormal Glycosylation of Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *Frontiers in Oncology* 11: 649338.

Kim, Jin-Woo, Hyo-Jin Park, Sung-Kyu Chae, et al.
2016 Ganglioside GD1a Promotes Oocyte Maturation, Furthers Preimplantation Development, and Increases Blastocyst Quality in Pigs. *The Journal of Reproduction and Development* 62(3): 249–255.

Kim, Jung Ho, and Gyeong Hoon Kang
2014 Molecular and Prognostic Heterogeneity of Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 20(15): 4230–4243.

Kim, Mi-Lyang, Kumaran Chandrasekharan, Matthew Glass, et al.
2008 O-Fucosylation of Muscle Agrin Determines Its Ability to Cluster Acetylcholine Receptors. *Molecular and Cellular Neurosciences* 39(3): 452–464.

Kitano, Masato, Yasuhiko Kizuka, Tomoaki Sobajima, et al.
2021 Rab11-Mediated Post-Golgi Transport of the Sialyltransferase ST3GAL4 Suggests a

New Mechanism for Regulating Glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry*: 100354.

Kojima, N., Y. C. Lee, T. Hamamoto, N. Kurosawa, and S. Tsuji
1994 Kinetic Properties and Acceptor Substrate Preferences of Two Kinds of Gal Beta 1,3GalNAc Alpha 2,3-Sialyltransferase from Mouse Brain. *Biochemistry* 33(19): 5772–5776.

Kojima, N., Y. Yoshida, N. Kurosawa, Y. C. Lee, and S. Tsuji
1995 Enzymatic Activity of a Developmentally Regulated Member of the Sialyltransferase Family (STX): Evidence for Alpha 2,8-Sialyltransferase Activity toward N-Linked Oligosaccharides. *FEBS Letters* 360(1): 1–4.

Komor, Malgorzata A., Meike de Wit, Jose van den Berg, et al.
2019 Molecular Characterization of Colorectal Adenomas Reveals POFUT1 as a Candidate Driver of Tumor Progression. *International Journal of Cancer*.

2020 Molecular Characterization of Colorectal Adenomas Reveals POFUT1 as a Candidate Driver of Tumor Progression. *International Journal of Cancer* 146(7): 1979–1992.

Kono, M., Y. Ohyama, Y. C. Lee, et al.
1997 Mouse Beta-Galactoside Alpha 2,3-Sialyltransferases: Comparison of in Vitro Substrate Specificities and Tissue Specific Expression. *Glycobiology* 7(4): 469–479.

Koprowski, H., Z. Stepkowski, K. Mitchell, et al.
1979 Colorectal Carcinoma Antigens Detected by Hybridoma Antibodies. *Somatic Cell Genetics* 5(6): 957–971.

Krek, Azra, Dominic Grün, Matthew N. Poy, et al.
2005 Combinatorial MicroRNA Target Predictions. *Nature Genetics* 37(5): 495–500.

Kuhn, Bernd, Jörg Benz, Michael Greif, et al.
2013 The Structure of Human α -2,6-Sialyltransferase Reveals the Binding Mode of Complex Glycans. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 69(Pt 9): 1826–1838.

Kurosawa, N., N. Kojima, M. Inoue, T. Hamamoto, and S. Tsuji
1994 Cloning and Expression of Gal Beta 1,3GalNAc-Specific GalNAc Alpha 2,6-Sialyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 269(29). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 19048–19053.

Lakshmanan, Imayavaramban, Sanjib Chaudhary, Raghupathy Vengoji, et al.
2021 ST6GalNAc-I Promotes Lung Cancer Metastasis by Altering MUC5AC Sialylation. *Molecular Oncology*.

Lane, W. Arbuthnot
1908 Remarks ON THE RESULTS OF THE OPERATIVE TREATMENT OF CHRONIC CONSTIPATION. *British Medical Journal* 1(2455): 126–130.

Lao, Victoria Valinluck, and William M. Grady
2011 Epigenetics and Colorectal Cancer. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology* 8(12): 686–700.

Laporte, Benoit, Sara Gonzalez-Hilarion, Abderrahman Maftah, and Jean-Michel Petit

2009 The Second Bovine Beta-Galactoside-Alpha2,6-Sialyltransferase (ST6Gal II): Genomic Organization and Stimulation of Its in Vitro Expression by IL-6 in Bovine Mammary Epithelial Cells. *Glycobiology* 19(10): 1082–1093.

Lara-Gonzalez, Pablo, Frederick G. Westhorpe, and Stephen S. Taylor
2012 The Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology: CB* 22(22): R966-980.

Lee, Jennifer, Uwe Warnken, Martina Schnölzer, Johannes Gebert, and Jürgen Kopitz
2015 A New Method for Detection of Tumor Driver-Dependent Changes of Protein Sialylation in a Colon Cancer Cell Line Reveals Nectin-3 as TGFBR2 Target: Nectin-3 as a Novel TGFBR2 Target Protein for Sialylation. *Protein Science* 24(10): 1686–1694.

Lee, Y. C., N. Kojima, E. Wada, et al.
1994 Cloning and Expression of cDNA for a New Type of Gal Beta 1,3GalNAc Alpha 2,3-Sialyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 269(13): 10028–10033.

Lehmann, Friederike, Sørge Kelm, Frank Dietz, Mark von Itzstein, and Joe Tiralongo
2008 The Evolution of Galactose Alpha2,3-Sialyltransferase: *Ciona intestinalis* ST3GAL I/II and Takifugu Rubripes ST3GAL II Sialylate Galbeta1,3GalNAc Structures on Glycoproteins but Not Glycolipids. *Glycoconjugate Journal* 25(4): 323–334.

Lengauer, C., K. W. Kinzler, and B. Vogelstein
1998 Genetic Instabilities in Human Cancers. *Nature* 396(6712): 643–649.

Leonhard-Melief, Christina, and Robert S. Haltiwanger
2010 O-Fucosylation of Thrombospondin Type 1 Repeats. *Methods in Enzymology* 480: 401–416.

Levin, Bernard, David A. Lieberman, Beth McFarland, et al.
2008 Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008: A Joint Guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 58(3): 130–160.

Li, Daojiang, Changwei Lin, Miao Chen, et al.
2017 Comprehensive Bioinformatics Analysis of the Characterization and Determination Underlying Mechanisms of Over-Expression and Co-Expression of Genes Residing on 20q in Colorectal Cancer. *Oncotarget* 8(45): 78642–78659.

Li, Daojiang, Changwei Lin, Nanpeng Li, et al.
2019 PLAGL2 and POFUT1 Are Regulated by an Evolutionarily Conserved Bidirectional Promoter and Are Collaboratively Involved in Colorectal Cancer by Maintaining Stemness. *EBioMedicine* 45: 124–138.

Li, Jin, Wanting Feng, Longbang Chen, and Jingdong He
2016 Downregulation of SMC1A Inhibits Growth and Increases Apoptosis and Chemosensitivity of Colorectal Cancer Cells. *The Journal of International Medical Research* 44(1): 67–74.

Li, Ming, Ruhong Cheng, Jianying Liang, et al.

2013 Mutations in POFUT1, Encoding Protein O-Fucosyltransferase 1, Cause Generalized Dowling-Degos Disease. *American Journal of Human Genetics* 92(6): 895–903.

Li, Zhijie, Kristina Han, John E. Pak, et al.
2017 Recognition of EGF-like Domains by the Notch-Modifying O-Fucosyltransferase POFUT1. *Nature Chemical Biology* 13(7): 757–763.

Linnekamp, Janneke F., Sander R. van Hooff, Pramudita R. Prasetyanti, et al.
2018 Consensus Molecular Subtypes of Colorectal Cancer Are Recapitulated in in Vitro and in Vivo Models. *Cell Death and Differentiation* 25(3): 616–633.

Lira-Navarrete, Erandi, Jessika Valero-González, Marta Martínez-Júlvez, et al.
2011 Structural Insights into the Mechanism of Protein O-Fucosylation. *PLoS ONE* 6(9). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3180450/>, accessed April 7, 2017.

Liu, Weijun, and Xiaowei Wang
2019 Prediction of Functional MicroRNA Targets by Integrative Modeling of MicroRNA Binding and Target Expression Data. *Genome Biology* 20(1): 18.

Liu, Yihui, Ruixiang Li, and Stephan Ladisch
2004 Exogenous Ganglioside G_{D1a} Enhances Epidermal Growth Factor Receptor Binding and Dimerization. *Journal of Biological Chemistry* 279(35): 36481–36489.

Livingston, B. D., and J. C. Paulson
1993 Polymerase Chain Reaction Cloning of a Developmentally Regulated Member of the Sialyltransferase Gene Family. *Journal of Biological Chemistry* 268(16). Elsevier: 11504–11507.

Lopez, Pablo Hh, Susan Aja, Kazuhiro Aoki, et al.
2017 Mice Lacking Sialyltransferase ST3Gal-II Develop Late-Onset Obesity and Insulin Resistance. *Glycobiology* 27(2): 129–139.

Loriol, C., F. Dupuy, R. Rampal, et al.
2006 Molecular Evolution of Protein O-Fucosyltransferase Genes and Splice Variants. *Glycobiology* 16(8): 736–747.

Loriol, Céline, Aymeric Audfray, Fabrice Dupuy, Agnès Germot, and Abderrahman Maftah
2007 The Two N-Glycans Present on Bovine Pofut1 Are Differently Involved in Its Solubility and Activity. *FEBS Journal* 274(5): 1202–1211.

Losada, Ana, and Tatsuya Hirano
2005 Dynamic Molecular Linkers of the Genome: The First Decade of SMC Proteins. *Genes & Development* 19(11): 1269–1287.

Lote, C. J., and Jacqueline B. Weiss
1971 Identification of Digalactosylcysteine in a Glycopeptide Isolated from Urine by a New Preparative Technique. *FEBS Letters* 16(2): 81–85.

Lou, Yi-Wei, Pao-Yuan Wang, Shih-Chi Yeh, et al.
2014 Stage-Specific Embryonic Antigen-4 as a Potential Therapeutic Target in Glioblastoma

Multiforme and Other Cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(7): 2482–2487.

Loureiro, Liliana R., Diana P. Sousa, Dylan Ferreira, et al. 2018 Novel Monoclonal Antibody L2A5 Specifically Targeting Sialyl-Tn and Short Glycans Terminated by Alpha-2-6 Sialic Acids. *Scientific Reports* 8(1): 12196.

Luo, Hai, Kexin Shen, Hongyan Sun, et al. 2020 Correlation Study between Serum Neuro-Specific Enolase and Gastric and Colorectal Cancers. *Medicine* 99(16). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7440092/>, accessed May 12, 2021.

Ma, Lijie, Pingping Dong, Longzi Liu, et al. 2016 Overexpression of Protein O-Fucosyltransferase 1 Accelerates Hepatocellular Carcinoma Progression via the Notch Signaling Pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 473(2): 503–510.

Ma, Wei, Xuzi Zhao, Leilei Liang, et al. 2017 MiR-146a and MiR-146b Promote Proliferation, Migration and Invasion of Follicular Thyroid Carcinoma via Inhibition of ST8SIA4. *Oncotarget* 8(17): 28028–28041.

Maccioni, Hugo J. F., Rodrigo Quiroga, and Mariana L. Ferrari 2011 Cellular and Molecular Biology of Glycosphingolipid Glycosylation. *Journal of Neurochemistry* 117(4): 589–602.

MacDonald, Bryan T., and Xi He 2012 Frizzled and LRP5/6 Receptors for Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(12): a007880.

Major, Ralph H. 1930 The Papyrus Ebers. *Annals of Medical History* 2(5): 547–555.

Margolis, R. K., and R. U. Margolis 1983 Distribution and Characteristics of Polysialosyl Oligosaccharides in Nervous Tissue Glycoproteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 116(3): 889–894.

Mármol, Inés, Cristina Sánchez-de-Diego, Alberto Pradilla Dieste, Elena Cerrada, and María Rodríguez Yoldi 2017 Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 18(1): 197.

Martinelli, E., D. Ciardiello, G. Martini, et al. 2020 Implementing Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: Challenges and Future Perspectives. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 31(1): 30–40.

Martinez-Duncker, Ivan, Rosella Mollicone, Jean-Jacques Candelier, Christelle Breton, and Rafael Oriol 2003 A New Superfamily of Protein-O-Fucosyltransferases, Alpha2-Fucosyltransferases, and Alpha6-Fucosyltransferases: Phylogeny and Identification of Conserved Peptide Motifs.

Glycobiology 13(12): 1C-5C.

Mazumdar, Claire, Ying Shen, Seethu Xavy, et al.
2015 Leukemia-Associated Cohesin Mutants Dominantly Enforce Stem Cell Programs and Impair Human Hematopoietic Progenitor Differentiation. *Cell Stem Cell* 17(6): 675–688.

McMillan, Brian J., Brandon Zimmerman, Emily D. Egan, et al.
2017 Structure of Human POFUT1, Its Requirement in Ligand-Independent Oncogenic Notch Signaling, and Functional Effects of Dowling-Degos Mutations. *Glycobiology* 27(8): 777–786.

Mehta, Kruti A., Kinjal A. Patel, Shashank J. Pandya, and Prabhudas S. Patel
2020 Aberrant Sialylation Plays a Significant Role in Oral Squamous Cell Carcinoma Progression. *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 49(3): 253–259.

Melo-Braga, Marcella Nunes, Melanie Schulz, Qiuyue Liu, et al.
2014 Comprehensive Quantitative Comparison of the Membrane Proteome, Phosphoproteome, and Sialome of Human Embryonic and Neural Stem Cells. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 13(1): 311–328.

Menendez, Daniel, Alberto Inga, and Michael A. Resnick
2009 The Expanding Universe of P53 Targets. *Nature Reviews. Cancer* 9(10): 724–737.

Mercier, D., A. Wierinckx, A. Oulmouden, et al.
1999 Molecular Cloning, Expression and Exon/Intron Organization of the Bovine Beta-Galactoside Alpha2,6-Sialyltransferase Gene. *Glycobiology* 9(9): 851–863.

Mitchell, Patrick S., Rachael K. Parkin, Evan M. Kroh, et al.
2008 Circulating MicroRNAs as Stable Blood-Based Markers for Cancer Detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(30): 10513–10518.

Mollicone, Rosella, Stuart E. H. Moore, Nicolai Bovin, et al.
2009 Activity, Splice Variants, Conserved Peptide Motifs, and Phylogeny of Two New Alpha1,3-Fucosyltransferase Families (FUT10 and FUT11). *The Journal of Biological Chemistry* 284(7): 4723–4738.

Moloney, D. J., V. M. Panin, S. H. Johnston, et al.
2000 Fringe Is a Glycosyltransferase That Modifies Notch. *Nature* 406(6794): 369–375.

Moremen, Kelley W., Annapoorani Ramiah, Melissa Stuart, et al.
2018 Expression System for Structural and Functional Studies of Human Glycosylation Enzymes. *Nature Chemical Biology* 14(2): 156–162.

Morgan, B. L., and M. Winick
1980 Effects of Administration of N-Acetylneuraminic Acid (NANA) on Brain NANA Content and Behavior. *The Journal of Nutrition* 110(3): 416–424.

- Morsut, Leonardo, Kole T. Roybal, Xin Xiong, et al. 2016 Engineering Customized Cell Sensing and Response Behaviors Using Synthetic Notch Receptors. *Cell* 164(4): 780–791.
- Mouradov, Dmitri, Clare Sloggett, Robert N. Jorissen, et al. 2014 Colorectal Cancer Cell Lines Are Representative Models of the Main Molecular Subtypes of Primary Cancer. *Cancer Research* 74(12): 3238–3247.
- Munro, Matthew J., Susrutha K. Wickremesekera, Lifeng Peng, Swee T. Tan, and Tinte Itinteang 2018 Cancer Stem Cells in Colorectal Cancer: A Review. *Journal of Clinical Pathology* 71(2): 110–116.
- Murphy, Kathleen M., Shengle Zhang, Tanya Geiger, et al. 2006 Comparison of the Microsatellite Instability Analysis System and the Bethesda Panel for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancers. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD* 8(3): 305–311.
- Musio, Antonio 2020 The Multiple Facets of the SMC1A Gene. *Gene* 743: 144612.
- Nakamura, Yuichiro, Yasuyoshi Miyata, Tomohiro Matsuo, et al. 2019 Stage-Specific Embryonic Antigen-4 Is a Histological Marker Reflecting the Malignant Behavior of Prostate Cancer. *Glycoconjugate Journal* 36(5): 409–418.
- North, Simon J., Paul G. Hitchen, Stuart M. Haslam, and Anne Dell 2009 Mass Spectrometry in the Analysis of N-Linked and O-Linked Glycans. *Current Opinion in Structural Biology* 19(5): 498–506.
- Noto, Zenko, Toshiko Yoshida, Motonori Okabe, et al. 2013 CD44 and SSEA-4 Positive Cells in an Oral Cancer Cell Line HSC-4 Possess Cancer Stem-like Cell Characteristics. *Oral Oncology* 49(8): 787–795.
- Noutsou, Maria, Jingting Li, Ji Ling, et al. 2017 The Cohesin Complex Is Necessary for Epidermal Progenitor Cell Function through Maintenance of Self-Renewal Genes. *Cell Reports* 20(13): 3005–3013.
- Odes, Edward J., Patrick S. Randolph-Quinney, Maryna Steyn, et al. 2016 Earliest Hominin Cancer: 1.7-Million-Year-Old Osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. *South African Journal of Science* 112(7–8). Academy of Science of South Africa: 1–5.
- Ogawa, Tadashi, Yoshihiko Hirohashi, Aiko Murai, et al. 2017 ST6GALNAC1 Plays Important Roles in Enhancing Cancer Stem Phenotypes of Colorectal Cancer via the Akt Pathway. *Oncotarget* 8(68). <http://www.oncotarget.com/fulltext/22545>, accessed March 17, 2020.
- O'Hagan, Rónán C., Sandy Chang, Richard S. Maser, et al. 2002 Telomere Dysfunction Provokes Regional Amplification and Deletion in Cancer Genomes. *Cancer Cell* 2(2): 149–155.

- Oka, C., T. Nakano, A. Wakeham, et al.
1995 Disruption of the Mouse RBP-J Kappa Gene Results in Early Embryonic Death. *Development (Cambridge, England)* 121(10): 3291–3301.
- Okajima, Tetsuya, Aiguo Xu, Liang Lei, and Kenneth D. Irvine
2005 Chaperone Activity of Protein O-Fucosyltransferase 1 Promotes Notch Receptor Folding. *Science (New York, N.Y.)* 307(5715): 1599–1603.
- Okamura, Yoshiaki, and Yumiko Saga
2008 Pofut1 Is Required for the Proper Localization of the Notch Receptor during Mouse Development. *Mechanisms of Development* 125(8): 663–673.
- Oman, Trent J., John M. Boettcher, Huan Wang, Xenia N. Okalibe, and Wilfred A. van der Donk
2011 Sublancin Is Not a Lantibiotic but an S-Linked Glycopeptide. *Nature Chemical Biology* 7(2): 78–80.
- Ong, Chin Siang, Xun Zhou, Jingnan Han, et al.
2018 In Vivo Therapeutic Applications of Cell Spheroids. *Biotechnology Advances* 36(2): 494–505.
- Ortiz-Soto, Maria Elena, Sabine Reising, Andreas Schlosser, and Jürgen Seibel
2019 Structural and Functional Role of Disulphide Bonds and Substrate Binding Residues of the Human Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 1 (HST3Gal1). *Scientific Reports* 9(1): 17993.
- Otani, Kei, Yuki Niwa, Takehiro Suzuki, et al.
2018 Regulation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor-Mediated Granulocytic Differentiation by C-Mannosylation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 498(3): 466–472.
- Papaccio, Federica, Francesca Paino, Tarik Regad, et al.
2017 Concise Review: Cancer Cells, Cancer Stem Cells, and Mesenchymal Stem Cells: Influence in Cancer Development. *Stem Cells Translational Medicine* 6(12): 2115–2125.
- Paulson, J. C., and K. J. Colley
1989 Glycosyltransferases. Structure, Localization, and Control of Cell Type-Specific Glycosylation. *The Journal of Biological Chemistry* 264(30): 17615–17618.
- Pennarubia, Florian, Emilie Pinault, Bilal Al Jaam, et al.
2020 Mouse WIF1 Is Only Modified with O-Fucose in Its EGF-like Domain III Despite Two Evolutionarily Conserved Consensus Sites. *Biomolecules* 10(9).
- Pennarubia, Florian, Emilie Pinault, Abderrahman Maftah, and Sébastien Legardinier
2018 In Vitro Acellular Method to Reveal O-Fucosylation on EGF-like Domains. *Glycobiology*.
- Pérez-Garay, Marta, Beatriz Arteta, Esther Llop, et al.
2013 A2,3-Sialyltransferase ST3Gal IV Promotes Migration and Metastasis in Pancreatic Adenocarcinoma Cells and Tends to Be Highly Expressed in Pancreatic Adenocarcinoma

Tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45(8): 1748–1757.

Pérez-Garay, Marta, Beatriz Arteta, Lluís Pagès, et al.
2010 Alpha2,3-Sialyltransferase ST3Gal III Modulates Pancreatic Cancer Cell Motility and Adhesion in Vitro and Enhances Its Metastatic Potential in Vivo. *PloS One* 5(9).

Petit, Daniel, Elin Teppa, Ugo Cenci, Steven Ball, and Anne Harduin-Lepers
2018 Reconstruction of the Sialylation Pathway in the Ancestor of Eukaryotes. *Scientific Reports* 8(1): 2946.

Petit, Daniel, Elin Teppa, Anne-Marie Mir, et al.
2015 Integrative View of A2,3-Sialyltransferases (ST3Gal) Molecular and Functional Evolution in Deuterostomes: Significance of Lineage-Specific Losses. *Molecular Biology and Evolution* 32(4): 906–927.

Phillips, Jennifer E., and Victor G. Corces
2009 CTCF: Master Weaver of the Genome. *Cell* 137(7): 1194–1211.

Picco, Gianfranco, Sylvain Julien, Inka Brockhausen, et al.
2010 Over-Expression of ST3Gal-I Promotes Mammary Tumorigenesis. *Glycobiology* 20(10): 1241–1250.

Petrobono, Silvia, and Barbara Stecca
2021 Aberrant Sialylation in Cancer: Biomarker and Potential Target for Therapeutic Intervention? *Cancers* 13(9).

Pilleul, Frank
2010 [Colonic CT-imaging or virtual colonoscopy]. *Revue Medicale Suisse* 6(240): 584–587.

Powell, S. M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, et al.
1992 APC Mutations Occur Early during Colorectal Tumorigenesis. *Nature* 359(6392): 235–237.

Pretlow, Theresa P., and Thomas G. Pretlow
2005 Mutant KRAS in Aberrant Crypt Foci (ACF): Initiation of Colorectal Cancer? *Biochimica Et Biophysica Acta* 1756(2): 83–96.

Rampal, Raajit, Joseph F. Arboleda-Velasquez, Alexandra Nita-Lazar, Kenneth S. Kosik, and Robert S. Haltiwanger
2005 Highly Conserved O-Fucose Sites Have Distinct Effects on Notch1 Function. *The Journal of Biological Chemistry* 280(37): 32133–32140.

Rana, Nadia A., and Robert S. Haltiwanger
2011 Fringe Benefits: Functional and Structural Impacts of O-Glycosylation on the Extracellular Domain of Notch Receptors. *Current Opinion in Structural Biology* 21(5): 583–589.

Rao, Francesco V., Jamie R. Rich, Bojana Rakić, et al.
2009 Structural Insight into Mammalian Sialyltransferases. *Nature Structural & Molecular Biology* 16(11): 1186–1188.

- Rao, Suhas S. P., Su-Chen Huang, Brian Glenn St Hilaire, et al. 2017 Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains. *Cell* 171(2): 305-320.e24.
- Ravi, Maddaly, V. Paramesh, S. R. Kaviya, E. Anuradha, and F. D. Paul Solomon 2015 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology* 230(1): 16–26.
- van Rossum, Leo G., Anne F. van Rijn, Robert J. Laheij, et al. 2008 Random Comparison of Guaiac and Immunochemical Fecal Occult Blood Tests for Colorectal Cancer in a Screening Population. *Gastroenterology* 135(1): 82–90.
- Rubinfeld, B., I. Albert, E. Porfiri, et al. 1996 Binding of GSK3beta to the APC-Beta-Catenin Complex and Regulation of Complex Assembly. *Science (New York, N.Y.)* 272(5264): 1023–1026.
- Ruggiero, Fernando M., Aldo A. Vilcaes, Ramiro Iglesias-Bartolomé, and José L. Daniotti 2015 Critical Role of Evolutionarily Conserved Glycosylation at Asn211 in the Intracellular Trafficking and Activity of Sialyltransferase ST3Gal-II. *The Biochemical Journal* 469(1): 83–95.
- Russo, Domenico, Laura Capolupo, Jaipreet Singh Loomba, Lucia Sticco, and Giovanni D'Angelo 2018 Glycosphingolipid Metabolism in Cell Fate Specification. *Journal of Cell Science* 131(24).
- Saito, S., S. Orikasa, M. Satoh, et al. 1997 Expression of Globo-Series Gangliosides in Human Renal Cell Carcinoma. *Japanese Journal of Cancer Research: Gann* 88(7): 652–659.
- Saito, Seiichi, Hiroshi Aoki, Akihiro Ito, et al. 2003 Human A2,3-Sialyltransferase (ST3Gal II) Is a Stage-Specific Embryonic Antigen-4 Synthase*. *Journal of Biological Chemistry* 278(29): 26474–26479.
- Sajid, K.M., R. Parveen, Durr-e-Sabih, et al. 2007 Carcinoembryonic Antigen (CEA) Levels in Hookah Smokers, Cigarette Smokers and Non-Smokers. *Journal of the Pakistan Medical Association* 57(12). Scopus: 595–599.
- Samuels, Yardena, and Victor E. Velculescu 2004 Oncogenic Mutations of PIK3CA in Human Cancers. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 3(10): 1221–1224.
- Sarkar, T. R., V. L. Battula, S. J. Werden, et al. 2015 GD3 Synthase Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in Breast Cancer. *Oncogene* 34(23): 2958–2967.
- Sarma, D. P. 1988 Dukes' Classification of Rectal Cancer. *Southern Medical Journal* 81(3): 407–408.
- Sarogni, Patrizia, Orazio Palumbo, Adele Servadio, et al. 2019 Overexpression of the Cohesin-Core Subunit SMC1A Contributes to Colorectal Cancer

Development. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*: CR 38. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6397456/>, accessed February 22, 2021.

Sasazawa, Yukiko, Natsumi Sato, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, and Siro Simizu
2015 C-Mannosylation of Thrombopoietin Receptor (c-Mpl) Regulates Thrombopoietin-Dependent JAK-STAT Signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 468(1): 262–268.

Savage, C. R., T. Inagami, and S. Cohen
1972 The Primary Structure of Epidermal Growth Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 247(23): 7612–7621.

Schauer, Roland, and P. Kamerling
2018 Exploration of the Sialic Acid World. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 75: 1–213.

Schneider, Michael, Esam Al-Shareffi, and Robert S. Haltiwanger
2017 Biological Functions of Fucose in Mammals. *Glycobiology*.

Shang, Shuang, Fang Hua, and Zhuo-Wei Hu
2017 The Regulation of β -Catenin Activity and Function in Cancer: Therapeutic Opportunities. *Oncotarget* 8(20): 33972–33989.

Shen, Lanlan, Minoru Toyota, Yutaka Kondo, et al.
2007 Integrated Genetic and Epigenetic Analysis Identifies Three Different Subclasses of Colon Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(47): 18654–18659.

Sigismund, Sara, Daniele Avanzato, and Letizia Lanzetti
2018 Emerging Functions of the EGFR in Cancer. *Molecular Oncology* 12(1): 3–20.

Simon, Karen
2016 Colorectal Cancer Development and Advances in Screening. *Clinical Interventions in Aging* 11: 967–976.

Sivasubramaniyan, Kavitha, Abhishek Harichandan, Karin Schilbach, et al.
2015 Expression of Stage-Specific Embryonic Antigen-4 (SSEA-4) Defines Spontaneous Loss of Epithelial Phenotype in Human Solid Tumor Cells. *Glycobiology* 25(8): 902–917.

Sjögren, C., and K. Nasmyth
2001 Sister Chromatid Cohesion Is Required for Postreplicative Double-Strand Break Repair in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Current Biology*: CB 11(12): 991–995.

Stahl, Mark, Kazuhide Uemura, Changhui Ge, et al.
2008 Roles of Pofut1 and O-Fucose in Mammalian Notch Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 283(20): 13638–13651.

Stikma, Jolanda, Diana C. Grootendorst, and Peter Willem G. van der Linden
2014 CA 19-9 as a Marker in Addition to CEA to Monitor Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer* 13(4): 239–244.

- Strul, H., and N. Arber
2002 Fecal Occult Blood Test for Colorectal Cancer Screening. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology* 13(1): 51–56.
- Sturgill, Elizabeth R., Kazuhiro Aoki, Pablo H. H. Lopez, et al.
2012 Biosynthesis of the Major Brain Gangliosides GD1a and GT1b. *Glycobiology* 22(10): 1289–1301.
- Suzuki, Y., M. Matsunaga, Y. Nagao, et al.
1985 Ganglioside GM1b as an Influenza Virus Receptor. *Vaccine* 3(3 Suppl): 201–203.
- Svennerholm, L., K. Boström, P. Fredman, et al.
1989 Human Brain Gangliosides: Developmental Changes from Early Fetal Stage to Advanced Age. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1005(2): 109–117.
- Swindall, Amanda F., and Susan L. Bellis
2011 Sialylation of the Fas Death Receptor by ST6Gal-I Provides Protection against Fas-Mediated Apoptosis in Colon Carcinoma Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 286(26): 22982–22990.
- Taciak, B., I. Pruszyńska, L. Kiraga, M. Bialasek, and M. Krol
2018 Wnt Signaling Pathway in Development and Cancer. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 69(2).
- Takashima, Shou
2008 Characterization of Mouse Sialyltransferase Genes: Their Evolution and Diversity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72(5): 1155–1167.
- Takayama, T., M. Ohi, T. Hayashi, et al.
2001 Analysis of K-Ras, APC, and Beta-Catenin in Aberrant Crypt Foci in Sporadic Adenoma, Cancer, and Familial Adenomatous Polyposis. *Gastroenterology* 121(3): 599–611.
- Takeuchi, Hideyuki, Derek Wong, Michael Schneider, et al.
2018 Variant in Human POFUT1 Reduces Enzymatic Activity and Likely Causes a Recessive Microcephaly, Global Developmental Delay with Cardiac and Vascular Features. *Glycobiology* 28(5): 276–283.
- Tangvoranuntakul, Pam, Pascal Gagneux, Sandra Diaz, et al.
2003 Human Uptake and Incorporation of an Immunogenic Nonhuman Dietary Sialic Acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(21): 12045–12050.
- Taylor, Paul, Hideyuki Takeuchi, Devon Sheppard, et al.
2014 Fringe-Mediated Extension of O-Linked Fucose in the Ligand-Binding Region of Notch1 Increases Binding to Mammalian Notch Ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(20): 7290–7295.
- Terret, Marie-Emilie, Rebecca Sherwood, Sadia Rahman, Jun Qin, and Prasad V. Jallepalli
2009 Cohesin Acetylation Speeds the Replication Fork. *Nature* 462(7270): 231–234.

- Thiagalingam, S., S. Laken, J. K. Willson, et al. 2001 Mechanisms Underlying Losses of Heterozygosity in Human Colorectal Cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(5): 2698–2702.
- Torres, C. R., and G. W. Hart 1984 Topography and Polypeptide Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Residues on the Surfaces of Intact Lymphocytes. Evidence for O-Linked GlcNAc. *The Journal of Biological Chemistry* 259(5): 3308–3317.
- Toyota, Minoru, Nita Ahuja, Mutsumi Ohe-Toyota, et al. 1999 CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(15): 8681–8686.
- Ucar, Gokhan, Yakup Ergun, Selin Aktürk Esen, et al. 2020 Prognostic and Predictive Value of KRAS Mutation Number in Metastatic Colorectal Cancer. *Medicine* 99(39). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7523797/>, accessed February 5, 2021.
- Vajaria, Bhairavi N., and Prabhudas S. Patel 2017 Glycosylation: A Hallmark of Cancer? *Glycoconjugate Journal* 34(2): 147–156.
- Varki, Ajit 2008 Sialic Acids in Human Health and Disease. *Trends in Molecular Medicine* 14(8): 351–360.
- Varki, Ajit, Richard D. Cummings, Jeffrey D. Esko, et al., eds. 2009 *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1908/>, accessed November 10, 2020.
- Varki, Ajit, Reiji Kannagi, Bryan Toole, and Pamela Stanley 2015 Glycosylation Changes in Cancer. *In* *Essentials of Glycobiology*. 3rd edition. Ajit Varki, Richard D. Cummings, Jeffrey D. Esko, et al., eds. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453023/>, accessed June 3, 2020.
- Vasconcelos-dos-Santos, Andréia, Isadora A. Oliveira, Miguel Clodomiro Lucena, et al. 2015 Biosynthetic Machinery Involved in Aberrant Glycosylation: Promising Targets for Developing of Drugs Against Cancer. *Frontiers in Oncology* 5. *Frontiers*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2015.00138/full>, accessed March 19, 2021.
- Vasudevan, Deepika, and Robert S. Haltiwanger 2014 Novel Roles for O-Linked Glycans in Protein Folding. *Glycoconjugate Journal* 31(0): 417–426.
- Vergé, Caroline, Amel Bouchatal, Frédéric Chirat, et al. 2020 Involvement of ST6Gal I-Mediated A2,6 Sialylation in Myoblast Proliferation and Differentiation. *FEBS Open Bio* 10(1): 56–69.

Very, Ninon, Tony Lefebvre, and Ikram El Yazidi-Belkoura
2017 Drug Resistance Related to Aberrant Glycosylation in Colorectal Cancer. *Oncotarget* 9(1): 1380–1402.

Vidal, E.
1856 De la leucocythemie splenique, ou de l'hypertrophie de la rate avec alteration du sang consistant dans une augmentation considerable du nombre blancs. *Gaz Hebd Sci Med Bordeaux* 3. Scopus.

Volkers, Gesa, Liam J. Worrall, David H. Kwan, et al.
2015 Structure of Human ST8SiaIII Sialyltransferase Provides Insight into Cell-Surface Polysialylation. *Nature Structural & Molecular Biology* 22(8): 627–635.

Wan, Guoxing, Lin Tian, Yuandong Yu, et al.
2017 Overexpression of Pofut1 and Activated Notch1 May Be Associated with Poor Prognosis in Breast Cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 491(1): 104–111.

Wang, B., J. Brand-Miller, P. McVeagh, and P. Petocz
2001 Concentration and Distribution of Sialic Acid in Human Milk and Infant Formulas. *The American Journal of Clinical Nutrition* 74(4): 510–515.

Wang, Bing
2012 Molecular Mechanism Underlying Sialic Acid as an Essential Nutrient for Brain Development and Cognition. *Advances in Nutrition* 3(3): 465S-472S.

Wang, Huan, Trent J. Oman, Ran Zhang, et al.
2014 The Glycosyltransferase Involved in Thurandacin Biosynthesis Catalyzes Both O- and S-Glycosylation. *Journal of the American Chemical Society* 136(1): 84–87.

Wang, Hui, Jingwei Zhang, Junchuan Dong, et al.
2020 Identification of Glycan Branching Patterns Using Multistage Mass Spectrometry with Spectra Tree Analysis. *Journal of Proteomics* 217: 103649.

Wang, Jianwei, Shaojun Yu, Liming Cui, et al.
2015 Role of SMC1A Overexpression as a Predictor of Poor Prognosis in Late Stage Colorectal Cancer. *BMC Cancer* 15.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4352287/>, accessed May 31, 2021.

Wang, Tianfu, Zhiyu Hao, Changcheng Liu, et al.
2020 MiR-193b Modulates Osteoarthritis Progression through Targeting ST3GAL4 via Sialylation of CD44 and NF- κ B Pathway. *Cellular Signalling* 76: 109814.

Wang, Xiaowei
2008 MiRDB: A MicroRNA Target Prediction and Functional Annotation Database with a Wiki Interface. *RNA* 14(6): 1012–1017.

Wang, Y., and M. W. Spellman
1998 Purification and Characterization of a GDP-Fucose:Polypeptide Fucosyltransferase from Chinese Hamster Ovary Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 273(14): 8112–8118.

- Watrin, Erwan, and Jan-Michael Peters
2009 The Cohesin Complex Is Required for the DNA Damage-Induced G2/M Checkpoint in Mammalian Cells. *The EMBO Journal* 28(17): 2625–2635.
- Weber, Kim S. C., Ronen Alon, and Lloyd B. Klickstein
2004 Sialylation of ICAM-2 on Platelets Impairs Adhesion of Leukocytes via LFA-1 and DC-SIGN. *Inflammation* 28(4): 177–188.
- Weiss, Jacqueline B., C. J. Lote, and H. Bobinski
1971 New Low Molecular Weight Glycopeptide Containing Triglycosylcysteine in Human Erythrocyte Membrane. *Nature New Biology* 234(44). Nature Publishing Group: 25–26.
- Wells, Lance, and Ten Feizi
2019 Editorial Overview: Carbohydrates: O-Glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology* 56. Sequences and Topology • Carbohydrates: iii–v.
- Wen, Kuo-Chang, Pi-Lin Sung, Shie-Liang Hsieh, et al.
2017 A2,3-Sialyltransferase Type I Regulates Migration and Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer Cells. *Oncotarget* 8(17). Impact Journals: 29013–29027.
- Wouters, Merridee A., Isidore Rigoutsos, Carmen K. Chu, et al.
2005 Evolution of Distinct EGF Domains with Specific Functions. *Protein Science: A Publication of the Protein Society* 14(4): 1091–1103.
- Yan, Jian, Martin Enge, Thomas Whittington, et al.
2013 Transcription Factor Binding in Human Cells Occurs in Dense Clusters Formed around Cohesin Anchor Sites. *Cell* 154(4): 801–813.
- Yang, Guang, Ru-yi Zheng, and Zai-shun Jin
2019 Correlations between Microsatellite Instability and the Biological Behaviour of Tumours. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 145(12): 2891–2899.
- Yang, Xiaoyong, and Kevin Qian
2017 Protein O-GlcNAcylation: Emerging Mechanisms and Functions. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18(7): 452–465.
- Yang, Xue-Qin, Chuang Chen, Chun-Wei Peng, Shao-Ping Liu, and Yan Li
2012 Carbohydrate Antigen 242 Highly Consists with Carbohydrate Antigen 19-9 in Diagnosis and Prognosis of Colorectal Cancer: Study on 185 Cases. *Medical Oncology (Northwood, London, England)* 29(2): 1030–1036.
- Yang, Zi-jie, Zi-yan Yu, Yi-ming Cai, Rong-rong Du, and Liang Cai
2020 Engineering of an Enhanced Synthetic Notch Receptor by Reducing Ligand-Independent Activation. *Communications Biology* 3. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7069970/>, accessed May 26, 2021.
- Yokota, Satoshi, Satoshi Yokota, Katsunori Ogawara, et al.
2013 Protein O-Fucosyltransferase 1: A Potential Diagnostic Marker and Therapeutic Target for Human Oral Cancer. *International Journal of Oncology* 43(6): 1864–1870.

Zhang, Qiong, Wei Liu, Hong-Mei Zhang, et al. 2020 HTFtarget: A Comprehensive Database for Regulations of Human Transcription Factors and Their Targets. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 18(2): 120–128.

Zheng, Qi, Ke-jun Nan, and Huai-lin Zheng 2010 [Hippocrates' viewpoint on cancer]. *Zhonghua Yi Shi Za Zhi* (Beijing, China: 1980) 40(4): 234–236.

Zhou, Fengbiao, Chunhong Cui, Yuqing Ge, et al. 2010 Alpha2,3-Sialylation Regulates the Stability of Stem Cell Marker CD133. *Journal of Biochemistry* 148(3): 273–280.

Zhou, Pengyang, Nan Xiao, Jian Wang, et al. 2017 SMC1A Recruits Tumor-Associated-Fibroblasts (TAFs) and Promotes Colorectal Cancer Metastasis. *Cancer Letters* 385: 39–45.

Zielinska, Dorota F., Florian Gnad, Jacek R. Wiśniewski, and Matthias Mann 2010 Precision Mapping of an in Vivo N-Glycoproteome Reveals Rigid Topological and Sequence Constraints. *Cell* 141(5): 897–907.

Résumé

Le cancer colorectal est un problème de santé mondial, caractérisé par de nombreuses modifications géniques, notamment des changements d'expressions de glycosyltransférases. La protéine *O*-fucosyltransférase 1 (POFUT1) est surexprimée dans plusieurs types de tumeurs, les tumeurs gastriques, hépatiques, mammaires ou encore colorectales. Cette enzyme catalyse le transfert d'un *O*-fucose sur une sérine ou une thréonine de motifs EGF-like, selon une séquence consensus de *O*-fucosylation C²-X₁₋₄-S/T-C³. Les protéines cibles de POFUT1 ont été identifiées sur la présence de cette séquence consensus, la plus étudiée étant le récepteur membranaire NOTCH. Dans les tumeurs colorectales, la surexpression est due à une amplification de la région chromosomique 20q11.21 dans laquelle se situe le gène *POFUT1*. Dans de rares cas où *POFUT1* n'est ni surexprimé ni amplifié, on retrouve 7 mutations dans la séquence codante de *POFUT1* sans que les conséquences fonctionnelles de ces dernières ne soient connues. Ce travail révèle que 6 des 7 variants protéiques de POFUT1 produits de façon recombinante ont des activités de *O*-fucosylation *in vitro* significativement supérieures à la forme sauvage de l'enzyme, en particulier sur le motif EGF 26 du récepteur NOTCH. Ces résultats laissent supposer que des patients possédant ces mutations de POFUT1 ont une activité de *O*-fucosylation supérieure qui favoriserait la tumorigénèse via entre autres la voie de signalisation NOTCH.

Après une étude approfondie de l'expression des sialyltransférases dans les bases de données RNA-Seq, *ST3GAL2* s'est avéré être le seul gène codant une sialyltransférase significativement surexprimé dans les tumeurs colorectales. Ce travail de recherche montre qu'un KD de *ST3GAL2* dans une lignée cancéreuse colorectale aboutit à une diminution significative des capacités de prolifération, migration et d'invasion des cellules, à un changement de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire et à une augmentation de la mort cellulaire par apoptose *in vitro*. Des xénogreffes de ces mêmes cellules chez des souris montrent que le KD de *ST3GAL2* ralentit l'évolution tumorale. Nous montrons que le KD de *ST3GAL2* altère l' α 2-3 sialylation de glycoprotéines membranaires ainsi que de glycolipides. *ST3GAL2* pourrait être considéré comme un nouvel oncogène impliqué, avec *POFUT1*, dans la tumorigénèse colorectale. Tous deux partageraient un régulateur commun, *SMCIA*, capable de se fixer sur les séquences des deux gènes et également surexprimé dans les tumeurs colorectales.

Mots-clés : Cancer colorectal, POFUT1, EGF-like, ST3GAL2, RNA-Seq, Knock-down, HT29, glycoprotéines.

Abstract

Colorectal cancer is a global health problem, characterized by numerous gene alterations, including changes in the expression of glycosyltransferases. The protein *O*-fucosyltransferase 1 (POFUT1) is overexpressed in several tumor types, including gastric, liver, breast and colorectal tumors. This enzyme catalyzes the transfer of an *O*-fucose onto a serine or threonine of EGF-like motifs, according to a consensus *O*-fucosylation sequence C²-X₁₋₄-S/T-C³. POFUT1 target proteins have been identified on the presence of this consensus sequence, the most studied being the membrane receptor NOTCH. In colorectal tumors, overexpression is due to an amplification of the 20q11.21 chromosomal region in which the *POFUT1* gene is located. In rare cases where *POFUT1* is neither overexpressed nor amplified, 7 mutations are found in the coding sequence of *POFUT1* without knowing the consequences. This work reveals that 6 of the 7 recombinantly produced POFUT1 protein variants have significantly higher *in vitro* *O*-fucosylation activities *in vitro* than the wild-type form of the enzyme, more particularly on the EGF motif 26 of the NOTCH receptor. These results suggest that patients with these POFUT1 mutations have a higher *O*-fucosylation activity that would promote tumorigenesis *via* NOTCH signaling pathway, among others.

After an extensive study of sialyltransferase expression in RNA-Seq databases, *ST3GAL2* was found to be the only gene encoding a sialyltransferase significantly overexpressed in colorectal tumors. Our works shows that a KD of *ST3GAL2* in a colorectal cancer line results in a significant decrease in cell proliferation, migration and invasion capacities, a change in cell cycle distribution and an increase in cell death by apoptosis *in vitro*. Xenografts of these same cells in mice show that the KD of *ST3GAL2* slows tumor progression. We show that the KD of *ST3GAL2*, alters the α 2-3 sialylation of glycolipids as well as membrane glycoproteins. *ST3GAL2* could be considered a novel oncogene involved, along with *POFUT1*, in colorectal tumorigenesis. Both would share a common regulator, *SMCIA*, also overexpressed in colorectal tumors, able of binding to both gene sequences to promote their expression.

Keywords : Colorectal cancer, POFUT1, EGF-like, ST3GAL2, RNA-Seq, Knock-down, HT29, glycoproteins.

