

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université de MOSTEFA BENBOULAIID-Batna 2



Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Département de Biochimie



N°...../SNV/2019



Présentée en vue de l'obtention du diplôme de

DOCTORAT en SCIENCES

Filière : BIOLOGIE

Spécialité : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE

Par: BELDJOUDI Mona Féryale

Thème:

**Implication de la transduction du signal
par le facteur de transcription E2F1 dans les cancers
broncho-pulmonaires : Détection de glycanes
tronquées par la lectine recombinée rPVL**

Soutenue le **10 Décembre 2019 à 10H**

Devant le Jury :

Présidente HAMBABA Leila
Directeur BOURAS Mourad

Prof. Univ. Mostefa Benboulaïd - Batna 2
Prof. Univ. Mostefa Benboulaïd - Batna 2

Examineurs SATTI Dalila
BENDJEMANA Katia
REZGOUNE-CHELLAT Djalila
MAGHCHICHE Abdelhak

Prof. Univ. des Frères Mentouri - Constantine 1
Prof. Univ. Laghrour Abbès - Khenchela
MCA Univ. des Frères Mentouri - Constantine 1
MCA Univ. Mostefa Benboulaïd - Batna 2

REMERCIEMENTS

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au **Pr Mourad Bouras** qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur.*

*Je remercie **Pr Jean Luc Coll** de m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche à l'INSERM de Grenoble et de m'avoir donné la possibilité d'intégrer l'équipe de recherche, et de m'avoir permis de travailler dans d'aussi bonnes conditions.*

*Je remercie toutes les personnes formidables de l'équipe 5, particulièrement **Dr Amandine Hurbin** et **Dr Benoit Busser**. Merci pour votre support et vos encouragements.*

*Je tiens à remercier **Pr Djebbar** et **Dr Hanachi** pour leur contribution active dans la réalisation de ce travail.*

*J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury : **Pr HAMBABA Leila**, **Pr SATTA Dalila**, **Pr BENDJEMANA Katia**, **Dr REZGOUNE-CHELLAT Djalila** et **Dr MAGHCHICHE Abdelhak**.*

J'adresse toute ma gratitude à tous mes ami(e)s et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail, en premier lieu, ma sœur d'adoption qui se reconnaitra.

Je tiens à remercier la vie de m'avoir gratifié de ta présence à mes côtés, être exceptionnel, qui m'a offert son soutien sur tous les plans.

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à ma maman; Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Une pensée, pour terminer ces remerciements, pour toi qui n'a pas vu l'aboutissement de mon travail mais je sais que tu aurais été très fier de ta fille.

AAL-2: Agrocyste Aegerita Lectin 2
ABO: Système de groupes sanguins A, B et O
A-cdk 2: A/cyclin-dependent kinase 2
ADK: Adénocarcinoma
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
AEC: 3-Amino-9-EthylCarbazole
AFP: Alphapétoprotéine
Apaf-1: Apoptotic protease activating factor 1
APC: Activated Protein C
ARN: Acide RiboNucléique
ARNm: ARN messenger
Asn: Asparagine
ATCC: American Type Culture Collection
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad 3 related
A375 cell: Malignant melanoma cell
A431 cell: Skin epidermoid carcinoma cell
A549 cell: Adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell
 β 1,4-GalT I : Beta 1,4-GalactosylTransferase I
B3GNT3: Beta 1,3-N-acetylGlucosaminylTransferase 3
BSA: Bovine Serum Albumin
CA 19.9: Carbohydrate Antigen 19.9
CA 125: Cancer Antigen 125
CA 27.29: Cancer Antigen 27.29
CA 15.3: Cancer Antigen 15.3
CBNPC: Carcinomes Bronchiques Non à Petites Cellules
CBPC: Carcinomes Bronchiques à Petites Cellules
CCLAT: Convention-Cadre pour la Lutte Anti-Tabac
CD4: Cluster de Différenciation 4
CD8: Cluster de Différenciation 8
Cdc 6: Cell division cycle 6
CDK: Cycline Dependent Kinase

CDKN2A: Cyclin-Dependent Kinase iNhibitor 2A
CE: Carcinome Epidermoïde
CEA: CarcinoEmbryonic Antigen
Cer: Céramide
c-erbB1: Chicken - erythroblastic leukemia viral oncogene 1
c-erbB2: Chicken - erythroblastic leukemia viral oncogene 2
Chk2: Checkpoint 2
CHO cell: Chinese Hamster Ovary cell
c-Myc: Avian MYeloCytomatosis virus oncogene cellular homolog
Colo 829 cell: Malignant melanoma cell
Con A: Concanavaline A
CPC: Carcinomes à Petites Cellules
CPNPC: Cancer du Poumon Non à Petites Cellules
c-ras: Rat sarcoma cellular oncogene
DAPI: 4',6-DiAmidino-2-PhénylIndole
DP: Dimerization Partner
DT2: Diabète de Type 2
EDTA: ÉthylèneDiamineTétraAcétique
E2F1: E2 promoter binding Factor 1
E.F.R.: Exploration Fonctionnelle Respiratoire
EGF: Epidermal Growth Factor
EGFR (ERBB1): Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA: Enzyme-Linked ImmunoScorbent Assay
FACS: Fluorescent-Activated Cell Sorting
FITC: Fluoresceïn IsoThioCyanate
Fuc: Fucose
Gal: Galactose
GalNAc: N-Acétyl Galactosamine
GAPDH: GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
GcNT3: Glucosaminyl (N-acetyl) Transferase
GD2: Ganglioside 2
GD3: Ganglioside 3

- GDF:** Growth differentiation factor
- GFAT:** Glutamine Fructose-6-phosphate AmidoTransférase
- Glc:** Glucose
- GlcA:** Acide Glucuronique
- GlcNAc :** N-Acétyl Glucosamine
- GM:** Ganglioside Monosialique
- GPI:** GlycosylPhosphatidylInositol
- GSL:** GlycoSphingoLipids
- GSL-II:** Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin II
- Gy:** Gray
- H322 cell:** Bronchioalveolar carcinoma cell 3 2 2
- H358 cell:** Bronchioalveolar carcinoma cell 3 5 8
- H441 cell:** Papillary adenocarcinoma cell 4 4 1
- HAP:** Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
- HBEC-3KT cell:** Normal Human Bronchial Epithelial cell
- HBP:** Hexoamine Biosynthesis Pathway
- hCG- β :** Hormone Chorionique Gonadotrope humaine - béta
- HEK 293 cell:** Human Embryonic Kidney cell
- HER2 (ERBB2):** Human Epidermal growth factor Receptor-2
- HRP:** HorseRadish Peroxidase
- HyL:** HydroxylLysine
- IASLC:** International Association for the Study of Lung Cancer
- IdoA:** Iduronic Acid
- IF:** Immunofluorescence
- IGFR:** Insulin-like Growth Factor Receptor
- IgG :** Immunoglobuline de type G
- IHC:** ImmunoHistoChimie
- IMA:** Invasive Mucinous Adenocarcinoma
- KRAS:** Kirsten RAAt Sarcoma viral oncogene homolog
- LacCer:** LactosylCéramide
- LCNEC:** Large Cell NeuroEndocrine Carcinoma

Le: Lewis

MALDI-TOF: Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation- Time Of Flight

Man: Mannose

MB: Marked box

MCF-7 cell: Breast cancer cell

MDA-MB231 cell: Triple negative breast cancer cell

MDM 2: Mouse Double Minute 2

myc: Myelocytomatosis oncogene

N-CAM: Neural Cell Adhesion Molecule

NES: Nuclear Export Signal

Neu5Ac: N-Acetylneuraminic acid

Neu5Gc: N-Glycolylneuraminic acid

NLS: Nuclear Localisation Signal

OGA: O-GlcNAcAse

OGT: O-GlcNAc Transferase

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PA-IL: Pseudomonas Aeruginosa Lectin I

PA-IIIL: Pseudomonas Aeruginosa Lectin II

PBS: Phosphate Buffered Saline

PFA: ParaFormaldehyde

PNL: Poumon Normal

PTEN: Phosphatase and TENsin homolog

pTNM: pathological Tumor Nodes Metastasis

p14^{ARF}: Alternate Reading Frame protein 14

p16^{INK4a}: Cyclin-dependent Kinase INhibitor protein 4a

p53: Tumor protein 53

Ras: Retrovirus-associated DNA sequences

Rb: Rétinoblastome

RB 1: Rétinoblastome 1

RCA-I: Ricinus Communis Agglutinin I

RE: Réticulum Endoplasmique

RPMI-1640: Rosewell Park Memorial Institute medium 1640

- rPVL:** Recombinant Psathyrella Velutina Lectin
- RT/PCR:** Reverse Transcription/ Polymerase Chain Reaction
- SCC:** Squamous Cell Carcinoma
- SDS PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
- Ser:** Sérine
- SK-Mel 28 cell:** Malignant melanoma cell
- SLe:** Sialyl Lewis
- SLT:** Shiga Like Toxin
- SNP:** Single Nucleotide Polymorphism
- SQC:** SQuameux (Carcinome épidermoïde)
- SRAS:** Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
- STn :** Sialyl Tn
- SVF:** Sérum de Veau Fœtal
- Th1:** T helper cell type 1
- Th2:** T helper cell type 2
- Th17:** T helper cell type 17
- Thr:** Thréonine
- TP 53:** Tumor Protein 53
- TS:** Thymidilate Synthetase
- Trp:** Tryptophane
- Tyr:** Tyrosine
- UDP-GlcNAc:** Uridine 5-DiPhospho N-AcétylGlucosamine
- UEA-II:** Ulex Europaeus Agglutinin II
- UICC:** Union Internationale Contre le Cancer
- U2OS cell:** Human bone OSteosarcoma epithelial cell
- VEGF-A:** Vascular Endothelial Growth Factor-A
- VEMS:** Volume Expiré Maximal en une Seconde
- WGA:** Wheat Germ Agglutinin
- Xyl:** Xylose

Figure 1.	Anatomie du système respiratoire.....	3
Figure 2.	Pourcentage de nouveaux cas par type de cancer, par région et par sexe (2018).....	7
Figure 3.	Formes de cancers les plus fréquents chez l’homme en Algérie (2010).	8
Figure 4.	Altérations des voies glycopeptidiques trouvés dans les glycoprotéines	17
Figure 5.	Activation du promoteur β 1,4GalT I par E2F1.....	19
Figure 6.	Principales liaisons glycopeptidiques trouvés dans les glycoprotéines.....	21
Figure 7.	Quelques exemples de glycolipides présents chez les procaryotes, les plantes et les animaux.....	22
Figure 8.	Identification des antigènes glycanes associés au cancer du poumon.....	25
Figure 9.	Glycanes majeurs caractérisés, détectés dans les tumeurs malignes exprimant les antigènes GlcNAc terminaux.....	27
Figure 10.	Structure cristalline du complexe rPVL / GlcNAc β 1-3Gal.....	30
Figure 11.	Microscope BX41 équipé d'un système de caméra numérique DP-70 et d'un microscope Pseudo-confocal ApoTome équipé de AxioCam GRM (N/B).....	34
Figure 12.	Cytomètre de débit C6 Accuri avec logiciel CFlow-plus (BD Biosciences).....	35
Figure 13.	Exemples de structures N-Glycanniques caractéristiques des glycoprotéines en fonction du système d’expression considéré.....	39
Figure 14.	Marquage par rPVL des lignées cellulaires tumorales. Histogrammes de cytométrie en flux montrent rPVL-Alexa488 se liant à une lignée cellulaire immortalisée du poumon (HBEC-3KT), une lignée cellulaire tumorale pulmonaire (H358) ainsi qu’à une lignée cellulaire d’ovaire d’Hamster chinois (CHO).....	41
Figure 15.	Abondance relative des glycanes liés à la biosynthèse avec des différences entre les lignées cellulaires NCI-H358 (poumon) et A549 (poumon).....	42
Figure 16.	Marquage par rPVL des lignées cellulaires tumorales pulmonaires. Histogrammes de cytométrie en flux montrent rPVL-Alexa 488 se liant à une lignée cellulaire immortalisée du poumon (HBEC-3KT) et deux lignées cellulaires tumorales pulmonaires (H358 et A549).	43
Figure 17.	Analyse par cytométrie de flux (FACS) de l’action de la lectine rPVL à différentes concentrations (1 et 5 μ g/ml) sur deux lignées cellulaires : H358 et CHO, en présence de l’enzyme Neuraminidase (1x : 40 μ g/ml et 5x : 200 μ g/ml) sous des temps d’incubation différents (2H et 4H) à 37°C.....	44
Figure 18.	Analyse par cytométrie de flux (FACS) de l’action de la lectine Rpvl à différentes concentrations (1 et 5 μ g/ml) sur différentes lignées cellulaires : H358, A549, HBEC-3KT, CHO et MCF7, en présence de l’enzyme Neuraminidase (40 μ g/ml).....	45
Figure 19.	Marquage par PA-IL des lignées cellulaires tumorales. Histogrammes de cytométrie en flux montrent PA-IL-Alexa488 se liant à une lignée cellulaire tumorale pulmonaire (H358), à une lignée cellulaire tumorale du sein (MCF7) et à une lignée cellulaire tumorale de la peau (Colo829).....	46

Figure 20.	Marquage par PA-IL des lignées cellulaires tumorales. Histogrammes de cytométrie en flux montrent PA-IL-Alexa 488 se liant à deux lignées cellulaires tumorales pulmonaires (H358 et A549), en présence de 100 mM de Gal.....	47
Figure 21.	Marquage par immunofluorescence de la lignée cellulaire H358 avec différentes concentrations de la lectine rPVL-Alexa488 (2, 6 et 10 µg/ml).....	48
Figure 22.	Mise en évidence de la location membranaire du marquage par immunofluorescence de la lignée cellulaire H358 avec la lectine rPVL-Alexa488 (5 µg/ml).....	49
Figure 23.	Marquage par immunofluorescence de la lignée cellulaire H358 avec de la lectine rPVL-Alexa488 (5 µg/ml), en présence de son inhibiteur GlcNAc (100 mM).....	50
Figure 24.	Marquage par immunofluorescence de différentes lignées cellulaires H358, H322 et H441 avec de la lectine rPVL-Alexa488 (5 µg/ml) et de la lectine PA-IL-Alexa488 (5 µg/ml).....	51
Figure 25.	Analyse par cytométrie de flux (FACS) de l'action de la lectine rPVL et de la lectine PA-IL à 5 µg/ml sur différentes lignées cellulaires : H358, H322, H441 et A549 et comparaison avec le marquage par immunofluorescence (IF).....	52
Figure 26.	Coloration HES de blocs paraffinés de biopsies humaines du poumon sain et présentant différents sous-types de cancer broncho-pulmonaire.....	53
Figure 27.	Marquage par immunohistochimie (IHC) avec la lectine rPVL biotinylée (10 µg/ml) de blocs paraffinés de biopsies humaines du poumon sain (PNL) et présentant différents sous-types de cancer broncho-pulmonaire (ADK, IMA, SQC) (x20).....	54
Figure 28.	Marquage par immunohistochimie (IHC) avec la lectine rPVL biotinylée (10 µg/ml) de blocs paraffinés de biopsies humaines du poumon sain (PNL) et présentant différents sous-types de cancer broncho-pulmonaire (ADK, IMA, SQC) (x40).....	55
Figure 29.	Gradient décroissant de la coloration par la lectine rPVL biotinylée, selon le sous-type de cancer broncho-pulmonaire.....	56
Figure 30.	Score de 0 à 3 attribué à chaque tumeur, basé sur le pourcentage de cellules tumorales colorées et l'intensité de la couleur et la distribution du niveau de coloration selon les sous-types histologiques de la tumeur, a été représenté sous forme d'histogramme.....	56
Figure 31.	Comparaison entre le mode de saturation par une solution de BSA (5 %) et par une solution de Carbo-free du marquage par immunohistochimie (IHC) avec la lectine rPVL biotinylée (5 µg/ml) du bloc paraffiné d'une biopsie humaine présentant un sous-type de cancer broncho-pulmonaire (SQC).....	57
Figure 32.	Comparaison entre deux lots différents de RpvI (CERMAV, Nantes) sur le marquage par immunohistochimie (IHC) avec la lectine RpvI biotinylée (5 µg/ml) du bloc paraffiné d'une biopsie humaine présentant un sous-type de cancer broncho-pulmonaire (SQC).....	58

Figure 33. Marquage par immunohistochimie (IHC) avec la lectine RpvI biotinylée (5 µg/ml) du bloc paraffiné d'une biopsie humaine d'un poumon sain (A, B, C) et présentant un sous-type de cancer broncho-pulmonaire (ADK) (D, E, F)..... **60**

Tableau 1.	Classification par stades dans la 7 ^{ème} édition.....	11
Tableau 2.	Lectines utilisées pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie.....	28
Tableau 3.	Lignées de cellules tumorales et conditions de culture cellulaire testées.....	38
Tableau 4.	Mise au point des conditions optimales d'incubation en présence des deux lectines étudiées: rPVL et PA1L.....	38
Tableau 5.	Rapport « dose/réponse » de l'analyse par cytométrie de flux (FACS) de l'action de la lectine rPVL à différentes concentrations (1 et 5 µg/ml) sur différentes lignées cellulaires.....	40

Remerciements	
Abréviations	i
Liste des figures	vi
Liste des tableaux	ix
Sommaire	x
INTRODUCTION	1
I/ REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre I : Cancer broncho-pulmonaire	
1.1. Anatomie du système respiratoire.....	3
1.2. Cancer broncho-pulmonaire.....	4
1.3. Facteurs de risque et facteurs prédisposants.....	4
1.3.1. Facteurs exogènes.....	4
1.3.1.1. Tabac.....	5
1.3.2. Facteurs endogènes.....	5
1.3.2.1. Métabolisme particulier des pro-carcinogènes et des carcinogènes, cas de la fumée de tabac.....	6
1.3.2.2. Rôle de l'inactivation d'un anti-oncogène.....	6
1.4. Epidémiologie du cancer broncho-pulmonaire.....	6
1.5. Classification histologique et pTNM des cancers broncho-pulmonaires.....	8
1.5.1. Classification histologique des cancers du poumon selon l'OMS.....	8
1.5.1.1. Carcinomes bronchiques non à petites cellules CBNPC.....	8
1.5.1.1.1. Adénocarcinomes.....	9
1.5.1.1.2. Carcinomes épidermoïdes (ou CE).....	9
1.5.1.1.3. Carcinomes à grandes cellules.....	10
1.5.1.2. Carcinomes à petites cellules (CPC).....	10
1.5.1.2.1. Tumeurs carcinoïdes.....	10
1.5.2. Classification pTNM des cancers du poumon selon l'UICC.....	11
1.6. Traitements du cancer-broncho-pulmonaire.....	12
1.6.1. Chirurgie.....	12
1.6.2. Radiothérapie.....	12
1.6.3. Chimiothérapie.....	13
1.6.4. Thérapie ciblée	14
1.6.5. Immunothérapie.....	14
Chapitre II : Glycanes tronqués et cancer broncho-pulmonaire	
2.1. Bases moléculaires du cancer broncho-pulmonaire.....	15
2.1.1. Oncogènes du cancer broncho-pulmonaire.....	15
2.1.2. Gènes suppresseurs du cancer broncho-pulmonaire.....	16
2.2. Facteur de transcription E2F1 : Structure et fonctions.....	16
2.2.1. Membres de la famille E2F chez l'Homme.....	16
2.2.2. Activités biologiques de E2F1.....	17
2.2.3. E2F1 et glycosylation dans le cancer broncho-pulmonaire	18
2.3. Glycosylation aberrante dans le cancer.....	19
2.3.1. Glycoconjugués.....	20

2.3.1.1. Glycoprotéines.....	20
2.3.1.2. Glycolipides.....	22
2.4. Glycoconjugués: biomarqueurs du cancer.....	23
Chapitre III : Lectine recombinée rPVL et cancer broncho-pulmonaire	24
3.1. N-Acétyleglucosamine et cancer du poumon.....	24
3.2. Lectines.....	26
3.2.1. Détection et spécificité des lectines.....	27
3.3. Lectine Psathyrella velutina recombinée : rPVL.....	28
3.3.1. Description de rPVL.....	28
3.3.2. Structure cristalline de rPVL / disaccharide.....	29
3.3.3. Lectine recombinée rPVL, GlcNAc et cancer broncho-pulmonaire.....	29

II/ MATERIEL ET METHODES

1. Lignées cellulaires.....	31
2. Culture cellulaire.....	31
3. Blocs de prélèvements paraffinés et congelés.....	32
4. Coupe des blocs de prélèvements paraffinés et congelés.....	32
5. Lectine PVL recombinée (rPVL) et lectine PA-IL.....	32
6. Enzyme et inhibiteurs.....	33
7. Analyse d'immunofluorescence (IF).....	33
8. Cytométrie de flux (FACS).....	34
9. Immunohistochimie (IHC).....	35

III/ RESULTATS ET DISCUSSION

Etude de la détection des glycanes tronqués par la lectine recombinée rPVL dans les cancers broncho-pulmonaires

I. Au niveau cellulaire.....	37
I.1. Cytométrie de flux (FACS).....	37
I.1.1. Etude du rapport dose/réponse de l'action de la lectine rPVL sur différentes lignées cellulaires.....	39
I.1.2. Etude de l'effet de l'inhibiteur sur l'action de la lectine rPVL sur différentes lignées cellulaires.....	42
I.1.3. Etude de l'effet de l'enzyme Neuraminidase sur l'action de la lectine rPVL sur différentes lignées cellulaires.....	43
I.1.4. Etude comparative sur l'action de deux lectines rPVL et PA-IL sur différentes lignées cellulaires.....	46
I.2. Immunofluorescence (IF).....	48
I.2.1. Etude du rapport « dose/réponse » de l'action de la lectine rPVL sur différentes lignées cellulaires.....	48
I.2.2. Etude de l'effet de l'inhibiteur sur l'action de la lectine rPVL sur différentes lignées Cellulaires.....	49
I.2.3. Etude comparative entre l'action de deux lectines rPVL et PA-IL sur différentes lignées cellulaires.....	50
II. Au niveau tissulaire.....	53
II.1. Immunohistochimie (IHC).....	53
II.1.1. Analyse par coloration HES de blocs paraffinés de biopsies humaines de poumon provenant du service d'anatomopathologie du CHU Benflis Touhami (Batna - Algérie).....	53
II.1.2. Analyse par immunohistochimie (IHC) de l'action de la lectine rPVL sur différents sous-types de cancer broncho-pulmonaire.....	54

II.1.3. Optimisation des conditions de marquage par IHC avec la lectine rPVL biotinylée....	57
II.1.3.1. Choix du mode de saturation.....	57
II.1.3.2. Choix du lot de rPVL biotinylé.....	58
II.1.3.3. Choix du protocole d'immunohistochimie par les lectines.....	59
II.1.4. Conditions et résultats optimales de marquage par rPVL biotinylé.....	59
IV/ CONCLUSION.....	61
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	63

ANNEXES**PRESENTATION DE L'ARTICLE :**

Audfray A, Beldjoudi MF, Breiman A, Hurbin A, Boos I, Unverzagt C, et al. (2015). A Recombinant Fungal Lectin for Labeling Truncated Glycans on Human Cancer Cells. PLoS ONE. 10 (6).

RESUME

INTRODUCTION

En Algérie, le cancer s'inscrit aujourd'hui parmi les nouveaux besoins prioritaires en santé publique. L'incidence du cancer est en nette augmentation. On compte 42 000 nouveaux cas par an, avec une survie à 5 ans relativement basse, comparée aux autres pays, notamment occidentaux.

Le cancer broncho-pulmonaire (CBP) est la première cause de mortalité par cancer dans le monde. Il se situe au 4^{ème} rang des cancers incidents; chez l'homme et se place au 2^{ème} rang après le cancer de prostate et chez la femme, il est le 3^{ème} cancer après le cancer du sein suivi du cancer du col de l'utérus.

La cause la plus fréquente de cancer du poumon est l'exposition chronique à la fumée de tabac, y compris au tabagisme passif. L'incidence du cancer du poumon chez les non-fumeurs, environ 15 % des cas, est souvent attribuée à une combinaison de facteurs génétiques, au radon dans l'air, à l'amiante, à la pollution de l'air et autres.

Dans cette pathologie, il reste beaucoup d'inconnues quant aux mécanismes biologiques et surtout immunologiques conduisant à son développement chez les patients. Le facteur de transcription E2F1 présente une fréquente perte d'expression dans les cancers broncho-pulmonaires.

Le facteur de transcription E2F1 est une protéine aux fonctions ambiguës impliqué à la fois dans la progression tumorale ou au contraire dans l'inhibition du développement des tumeurs selon le type tissulaire et le contexte génétique envisagés. Différentes études ont porté sur l'identification de nouvelles cibles et fonctions biologiques de E2F1 susceptibles d'être dérégulées dans les cancers broncho-pulmonaires, en réponse à l'expression anormale de E2F1.

Une glycosylation membranaire aberrante joue aussi un rôle fondamental dans les étapes pathologiques clés de développement et progression de la tumeur. Les glycanes jouent un rôle dans la signalisation des cellules cancéreuses, la dissociation et l'invasion des cellules tumorales, les interactions cellule-matrice, l'angiogenèse, les métastases et la modulation immunitaire.

La surexpression de E2F1 stimule l'activité du promoteur de la bêta 1,4 galactosyltransférase, qui transfère le galactose au N-acétylGlucosamine (GlcNAc) terminal du complexe N-glycanes.

Si dans les carcinomes pulmonaires humains, de faibles taux de E2F1 contribuent à la carcinogénèse, on peut observer une diminution de la bêta 1,4 galactosylation et donc une surexpression du GlcNAc terminal.

Les antigènes GlcNAc terminaux se sont révélés très rares sur les surfaces cellulaires humaines, ils ont été observés comme étant associés aux surfaces des cellules tumorales. Une galactosylation réduite des glycanes peut conduire à une exposition des antigènes GlcNAc terminaux sur les surfaces des cellules cancéreuses dans les tumeurs humaines, et que l'accumulation de ces glycanes peut devenir un déterminant majeur dans le glycome tumoral.

Il a été démontré que les lectines, généralement obtenues à partir de plantes, sont très efficaces pour détecter la glycosylation aberrante dans des échantillons biologiques. Une nouvelle approche technologique consiste à utiliser des lectines à large spectre de spécificité et donc à caractériser la variation de la glycosylation.

Ce travail est réparti en deux volets :

- Le premier volet présente une synthèse bibliographique, divisée en 3 chapitres : Cancer broncho-pulmonaire, Glycanes tronqués et cancer broncho-pulmonaire, Lectine recombinée rPVL et cancer broncho-pulmonaire.

- Le deuxième volet présente la partie expérimentale où l'on étudie une forme recombinante de la lectine *Psathyrella velutina* (rPVL), produite par *Escherichia coli*. Une caractérisation de sa spécificité a été mise en évidence, vis-à-vis des différents épitopes terminés par le GlcNAc qui sont présents sous des formes anormales de glycoconjugués humains liées au cancer broncho-pulmonaire, aux niveaux cellulaire (Lignées cellulaires: normale et tumorales) et tissulaire (Blocs paraffinés et congelés: poumon sain et sous-types de cancer du poumon).

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

Le **chapitre I** présente des notions générales sur le cancer broncho-pulmonaire, première cause de mortalité par le cancer dans le monde.

1.1. Anatomie du système respiratoire

L'appareil respiratoire se divise en deux parties séparées par le pharynx: les voies aériennes supérieures et l'appareil broncho-pulmonaire.

Les voies aériennes supérieures comprennent une série de cavités communicantes: le nez, les sinus, le rhinopharynx. L'appareil broncho-pulmonaire commence par le larynx, et se continue par la trachée dans le thorax, pour se diviser en deux bronches primaires ou principales. Ces dernières se divisent en branchements (une vingtaine) pour se terminer dans les alvéoles (**Figure 1**). [1]

Les poumons sont constitués de deux formations situées latéralement dans la cavité thoracique, séparées par le médiastin. Ils reposent sur le diaphragme qui délimite la cavité abdominale supérieure. Les poumons sont des structures rose-grisâtres, très résistantes et élastiques. Ils sont séparés des organes intra-thoraciques par une séreuse, la plèvre, qui permet leur glissement lors des mouvements respiratoires. Les poumons sont constitués de deux lobes à gauche et trois à droite, séparés par des scissures. Au niveau des hiles pulmonaires, les structures bronchiques et vasculaires pénètrent dans le tissu pulmonaire et s'effectue la réflexion de la séreuse pleurale. [2]

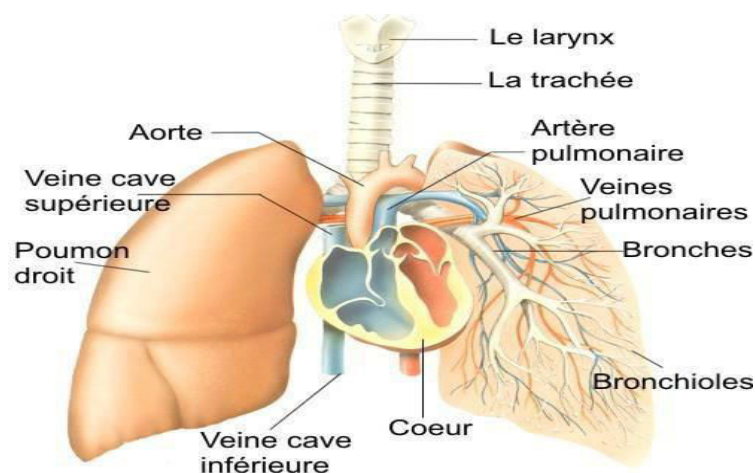


Figure 1. Anatomie du système respiratoire. [2]

1.2. Cancer broncho-pulmonaire

Le cancer du poumon est jusqu'à présent le plus commun et le plus fatal de toutes les tumeurs malignes dans le monde, avec la survie nette standardisée à 5 ans estimée à 18%, dont 85% sont le type de cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC). [3]

Bien que l'incidence des cancers pulmonaires décroisse légèrement chez les hommes, elle est en nette augmentation chez les femmes, en relation directe avec une augmentation de la consommation tabagique. [4]

La détection précoce du cancer broncho-pulmonaire par les biomarqueurs doit permettre d'orienter la prise en charge vers des méthodes diagnostiques plus invasives ou coûteuses, ainsi que la prise en charge thérapeutique et la surveillance de son efficacité dans une population à risque. Elle peut conduire à la détection et à la prise en charge précoce de lésions pré-néoplasiques. On peut également extrapoler vers un traitement préventif ciblé vers les mécanismes moléculaires initiaux.

L'utilisation des biomarqueurs au titre d'outils de dépistage ouvre des perspectives très séduisantes en termes de prise en charge du carcinome bronchique. Les enjeux actuels sont les suivants :

- validation de biomarqueurs sur des prélèvements de petite taille en complément de l'histopathologie, ou sur des échantillons non invasifs;
- validation de microtechniques applicables en dépistage de populations à risque. [5]

1.3. Facteurs de risque et facteurs prédisposants

Le cancer bronchique est la première cause de mortalité par cancer chez l'homme dans le monde. Son incidence croissante s'explique essentiellement par son lien causal avec le tabac et la pollution atmosphérique.

1.3.1. Facteurs exogènes

La plupart sont communs à tous les types histologiques du cancer bronchique. Le tabagisme est le facteur de risque principal.

D'autres agents carcinogènes que ceux majoritairement contenus dans la fumée du tabac, ont été incriminés : pollution atmosphérique, exposition professionnelle (l'arsenic, le nickel, le chrome, le béryllium, l'amiante, le radon, le bis-chlorométhyl-éther).

1.3.1.1. Tabac

Le tabac, facteur causal majeur jouerait un double rôle. Les multiples agents carcinogènes ou pro-carcinogènes identifiés, contenus dans la fumée du tabac, sont principalement: le benzo(a)pyrène, le dibenzo(a)anthracène, l'hydrazine, le formaldéhyde et le nitrosodiéthylamine. Le cadmium, le nickel et le polonium, contenus dans la fumée du tabac ont été incriminés. [6]

Face à cette épidémie tabagique, l'OMS a adopté en 2003, un traité international de santé publique « la Convention-Cadre pour la Lutte anti-Tabac » (CCLAT), entrée en vigueur le 27 février 2005. [7]

Le tabac entrainerait la sécrétion de facteurs de croissance fonctionnant de façon autocrine et paracrine. Cette sécrétion, correspondant à celle des facteurs de croissance habituellement impliqués dans le développement normal du poumon, faciliterait la survenue de mutations mitotiques. A défaut de contribuer directement à la transformation, elle confèrerait également un avantage sélectif aux cellules ayant subi par ailleurs certains évènements géniques transformants ou immortalisants.

Les agents pro-carcinogènes et carcinogènes contenus dans la fumée du tabac, dont le niveau de métabolisation en carcinogènes actifs pourrait être génétiquement déterminé, contribueraient aussi à l'accumulation de mutations portant à la fois sur des anti-oncogènes et sur des pro-oncogènes. Deux anti-oncogènes ont été identifiés: RB1 et TP53. Les pro-oncogènes activés sont principalement ceux de la famille *myc*. [6]

1.3.2. Facteurs endogènes

Deux types de prédispositions transmises héréditairement et révélées lors de l'exposition aux carcinogènes peuvent être envisagés.

1.3.2.1. Métabolisme particulier des pro-carcinogènes et des carcinogènes, cas de la fumée de tabac

Les systèmes de métabolisation des xénobiotiques, qui visent à les rendre facilement éliminables par l'organisme, utilisent de multiples réactions chimiques catalysées par de nombreuses enzymes différentes. Lors de ces réactions, il peut se former des métabolites plus réactifs que le produit initial. Ainsi, le benzo(a)pyrène est beaucoup moins mutagène et cancérigène que son métabolite, un diol-époxyde, appelé pour cette raison, cancérigène ultime. Pour tous les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), la formation de composés diol-époxydes paraît être l'élément principal de leur carcinogénicité. Ces composés sont particulièrement réactifs avec l'ADN (Alkylants).

1.3.2.2. Rôle de l'inactivation d'un anti-oncogène

La perte de l'activité d'un ou plusieurs anti-oncogènes est un phénomène fréquent dans différents modèles de tumeur. Il est alors possible qu'une des copies de l'un de ces anti-oncogènes soit transmise de façon héréditaire sous sa forme inactivée. L'action des carcinogènes de la fumée de tabac réaliserait le second évènement inactivateur. [6]

1.4. Epidémiologie du cancer broncho-pulmonaire

Dans de nombreuses communautés, le tabagisme et par conséquent le cancer du poumon, sont étroitement liés au statut social. L'incidence du cancer du poumon varie énormément entre les communautés dans le monde.

En 2018, des taux élevés sont observés dans certaines régions d'Amérique du Nord, alors que les pays en développement ont les taux les plus faibles (**Figure 2**).

En 2005, aux Etats-Unis, en Europe et au Japon, 83 à 92% des cancers du poumon chez les hommes, et 57 à 80 % chez les femmes, sont liés au tabac. L'impact du cancer du poumon est le plus fort lorsque la population a atteint une prévalence maximale du tabagisme qui s'est prolongée pratiquement tout au long de la durée de vie des fumeurs. [8]

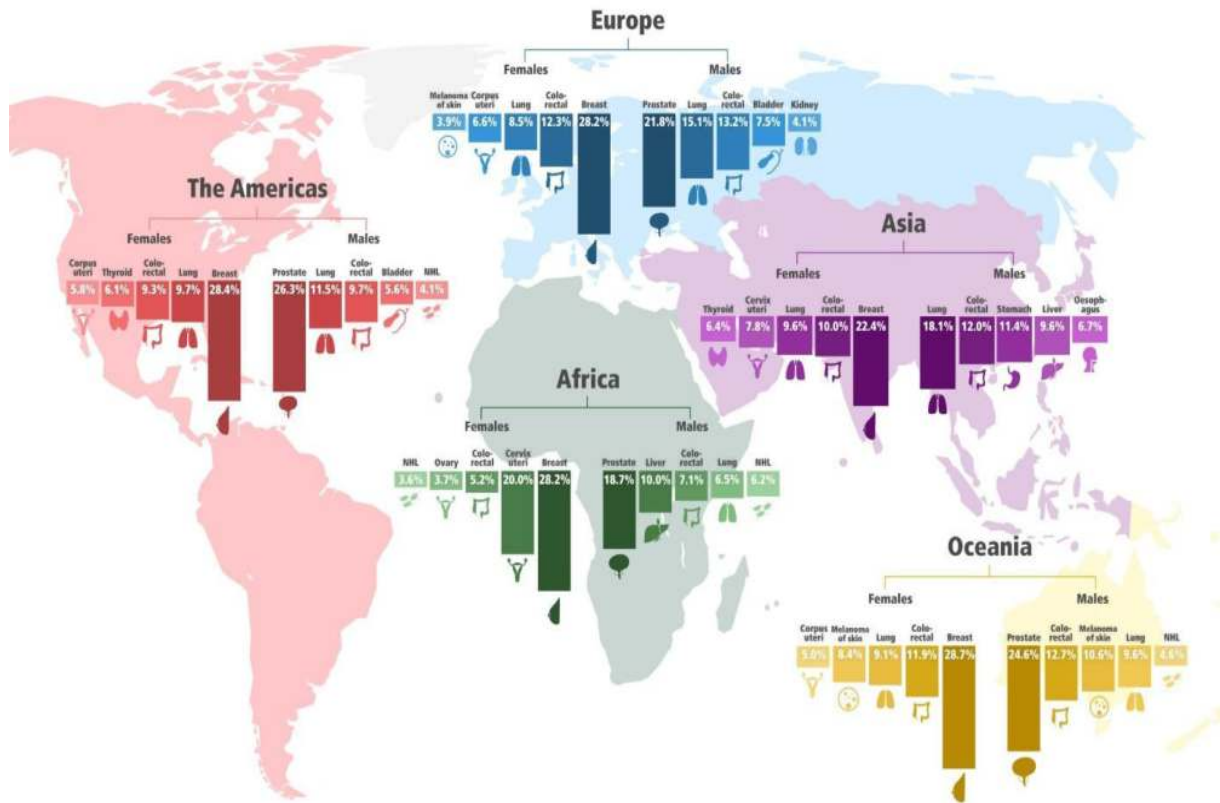


Figure 2. Pourcentage de nouveaux cas par type de cancer, par région et par sexe (2018). [8]

En 2002, le cancer broncho-pulmonaire en Afrique représente 6,0% de l'incidence mondiale, 7,5% de la mortalité mondiale et 4,1% de la prévalence mondiale. C'est le continent qui pèse le moins lourd pour ces trois variables après l'Océanie. [9]

En 2010, en Algérie, les formes de cancer les plus fréquentes chez l'homme sont ceux du poumon, du colo-rectum, de la vessie, de la prostate et de l'estomac. Ils constituent 52,5% de tous les cancers masculins (**Figure 3**). Le cancer du poumon à lui seul représente environ 15% des cancers masculins.

En Algérie, le tabagisme est principalement responsable de 70 % des cancers de la trachée, des bronches et du poumon, de 42% des cancers de la bouche et de l'oropharynx, de 42 % des cancers de l'œsophage, de 28 % des cancers de la vessie et de 22% des cancers du pancréas. [10]

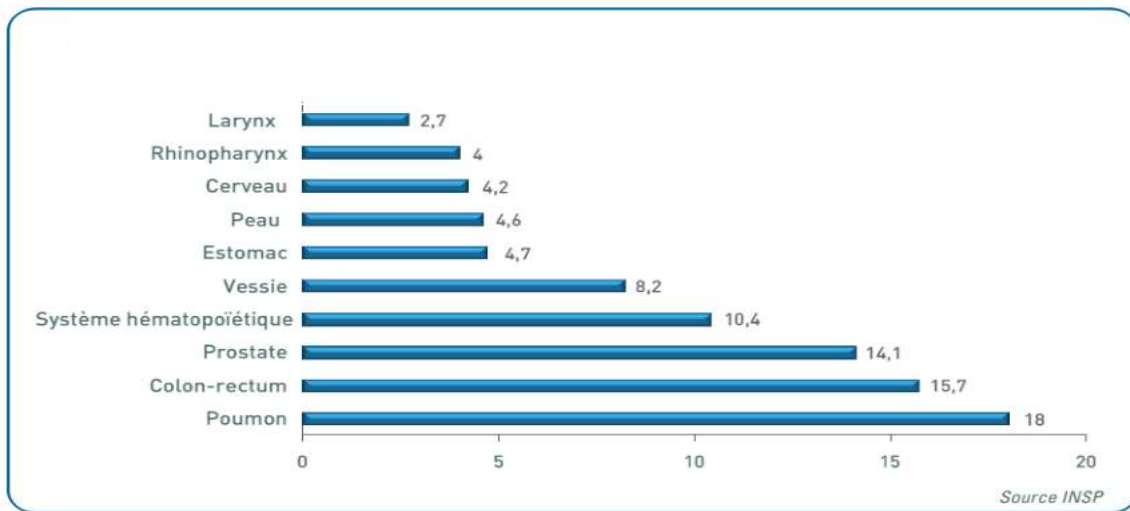


Figure 3. Formes de cancers les plus fréquents chez l'homme en Algérie (2010). [10]

1.5. Classification histologique et pTNM des cancers broncho-pulmonaires

1.5.1. Classification histologique des cancers du poumon selon l'OMS

L'intérêt d'une telle classification repose sur la nécessité de délivrer un diagnostic qui permet l'inclusion des patients dans des protocoles thérapeutiques et sert de base aux études épidémiologiques et biologiques. Le diagnostic doit reposer sur des critères histologiques simples, reproductibles et donc utilisables pour tous les pathologistes.

Les cancers du poumon sont subdivisés en deux différentes sous-classes: (I) les carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC) qui dérivent des cellules souches épithéliales de la muqueuse broncho-pulmonaire; (II) les carcinomes bronchiques à petites cellules (CBPC) qui regroupent plusieurs catégories de cancers présentant des caractéristiques morphologiques, histologiques et ultra-communes, dont en particulier la présence de granules neuro-sécréteurs et une importante activité mitotique [11].

1.5.1.1. Carcinomes bronchiques non à petites cellules CBNPC

Le cancer du poumon non à petites cellules peut apparaître n'importe où dans les tissus qui tapissent les voies aériennes des poumons.

Selon Moreau (2006) [12], On distingue trois grands groupes de CBNPC :

- *Les carcinomes épidermoïdes: 40 %*
- *Les adénocarcinomes: 40 %*
- *Les carcinomes à grandes cellules: 20 %*

Le cancer du poumon non à petites cellules représente 80 à 85 % de tous les cas de cancers du poumon. [4]

1.5.1.1.1. Adénocarcinomes

Il s'agit du type histologique le plus fréquemment diagnostiqué dans de nombreux pays et notamment aux Etats-Unis où ils représentent 60 % des cancers pulmonaires. Ils se sont accrus d'au moins 10 % depuis les 20 dernières années en Europe.

Les adénocarcinomes sont des tumeurs épithéliales présentant une différenciation glandulaire ou une sécrétion de mucines par les cellules tumorales, dont plusieurs variantes histologiques ont été décrites. [13]

1.5.1.1.2. Carcinomes épidermoïdes (ou CE)

Les CE ou carcinomes malpighiens du poumon sont des tumeurs épithéliales malignes avec des foyers de cellules kératinisées et/ou des ponts intercellulaires ou une morphologie de carcinome indifférencié exprimant les marqueurs immuno-histochimiques de différenciation squameuse. [14]

Il existe plusieurs variants: le carcinome épidermoïde papillaire, à cellules claires, à petites cellules (cellules de petite taille, comportant un noyau à la chromatine granuleuse au sein d'un cytoplasme ample) et basaloïde (cellules de petite taille, formant des lobules délimités par une assise palissadique et s'accompagnant de plages de différenciation épidermoïde). [11]

1.5.1.1.3. Carcinomes à grandes cellules

Parmi ces carcinomes, deux variantes se distinguent par leur impact pronostic: le carcinome neuroendocrine à grandes cellules et le carcinome basaloïde. Le premier présente une architecture endocrine et l'expression d'au moins l'un des trois marqueurs neuroendocrines. La présence d'un index mitotique élevé et/ou la présence de nécrose tumorale le distingue du carcinoïde atypique qui est de bien meilleur pronostic. Quant au second, il consiste en une prolifération de cellules souches basales à haut index prolifératif, et est également corrélé à un pronostic plus péjoratif que les autres carcinomes à grandes cellules.

Les carcinomes adénoquameux et sarcomatoïdes sont deux entités rarement diagnostiquées. [13]

1.5.1.2. Carcinomes à petites cellules (CPC)

Cette catégorie représente des tumeurs neuroendocrine de haut grade, constituées de cellules de petites tailles, au rapport noyau/cytoplasme très élevé, et dont la chromatine apparaît finement ponctuée dissimulant le nucléole. Ce sont des tumeurs de haut grade de malignité avec un index mitotique très élevée et une nécrose tumorale souvent présente et extensive. Les carcinomes à petites cellules expriment tous au moins l'un des trois facteurs de différenciation neuroendocrine suivant: synaptophysine, chromogranine, N-CAM. [15]

1.5.1.2.1. Tumeurs carcinoïdes

Ces tumeurs sont caractérisées par une différenciation neuroendocrine du poumon et sont considérées comme des tumeurs de bas grade de malignité ou de grade intermédiaire. Elles se distinguent des carcinomes à petites cellules et des carcinomes neuroendocrine à grandes cellules par leur bon pronostic et leur prévalence élevée chez le non-fumeur. [13]

1.5.2. Classification pTNM des cancers du poumon selon l’UICC

Le système pTNM est la classification de référence pour les cliniciens et les pathologistes pour classer l'ampleur de la propagation d'un cancer. Elle permet de définir le stade histopathologique d'extension d'une tumeur après examen macroscopique et microscopique de la pièce de résection.

La 8^e édition de la classification TNM proposée par l’IASLC est entrée en vigueur, en Janvier 2017, après avoir été validée par l’Union internationale contre le cancer (UICC). [16]

Le changement des descripteurs (7^{ème} Edition) s'est associé à une nouvelle classification par stades reprise dans le **Tableau 1**.

Il est à noter que cette classification s'est révélée tout à fait applicable également aux cancers bronchiques à petites cellules et aux tumeurs carcinoïdes, ces dernières étant auparavant exclues de la classification TNM. Donc, toute tumeur primitive du poumon peut être caractérisée par le même stade TNM. [17]

Tableau 1. Classification par stades dans la 7^e édition. [17]

	N0	N1	N2	N3	M1a-b Tout N	M1c Tout N
T1a	IA-1	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1b	IA-2	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T1c	IA-3	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T2b	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IV-A	IV-B
T3	IIB	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B
T4	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC	IV-A	IV-B

1.6. Traitements du cancer broncho-pulmonaire

Il y a globalement 05 armes thérapeutiques spécifiques pour le traitement des cancers bronchiques : la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, la thérapie ciblée et l'immunothérapie. Ces traitements peuvent être réalisés soit de manière isolée, soit de manière séquentielle ou combinée.

1.6.1. Chirurgie

La chirurgie est le traitement de référence des cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC). Celle-ci n'est malheureusement possible que dans moins de 25% des cas. L'intervention n'est envisageable que dans les stades I, II et certains stades IIIA. Dans ces cas, un bilan d'opérabilité générale est réalisé, comportant des E.F.R (Exploration Fonctionnelle Respiratoire) et une scintigraphie pulmonaire de perfusion (dont les résultats couplés permettront de prédire la capacité vitale et le Volume Expiré Maximal en une Seconde (VEMS) postopératoire), un examen cardiovasculaire approfondi, notamment au-delà de 60 ans, avec, entre autres, la réalisation d'un échoflow carotidien.

Enfin, les fonctions rénales et hépatiques seront vérifiées. L'âge limite pour une intervention est généralement fixé à 75 ans, mais cette limite n'a rien d'absolu, l'âge physiologique étant plus important.

Une chimiothérapie préopératoire est de plus en plus fréquemment réalisée. Selon les cas, une lobectomie, une bi-lobectomie (ablation d'un ou plusieurs lobes pulmonaires), une pneumonectomie (ablation d'un poumon entier) sera réalisée. En cas de nécessité, l'exérèse peut être élargie, dans une certaine mesure, à la paroi ou au péricarde.

Dans tous les cas, la chirurgie doit comprendre un curage ganglionnaire. Les complications sont importantes (VEMS -20% dans les lobectomies, -50% dans les pneumonectomies), voire fatales (1 à 3% dans les lobectomies ; 5 à 8% dans les pneumonectomies chez les patients de plus de 70 ans). En fait, seul un patient sur quatre sera opéré. Quand le patient est inopérable, une radiothérapie et/ou une chimiothérapie peuvent être proposées. [18]

1.6.2. Radiothérapie

Pour les cancers diagnostiqués alors qu'ils sont localisés, donc le plus souvent accessibles à un traitement local (chirurgie, radiothérapie en conditions stéréotaxiques), le taux de survie

à 5 ans peut atteindre 50 %. Mais du fait d'une maladie longtemps asymptomatique, la majorité des patients sont d'emblée atteints d'une maladie localement évoluée ou métastatique.

Chez ces patients, la radiothérapie, le plus souvent associée à une chimiothérapie, est le traitement de référence. [19]

Lorsque les stades précoces ne peuvent faire l'objet d'une chirurgie pour des raisons de contre-indication médicale ou de refus, on propose au patient une irradiation médiastino-tumorale, lorsque le volume à irradier le permet. Les stades IIIA inopérables et les stades IIIB font généralement l'objet d'une radiothérapie médiastino-tumorale. La dose administrée doit être au moins égale à 60 Gray (Gy) en cas de lésions macroscopiques (sur la tumeur et les adénopathies) et de 45 Gy sur le médiastin supérieur et moyen. Appliquée aux malades inopérables, non métastasés d'emblée, elle ne donne qu'une survie d'environ 5% à 5 ans. Les nouvelles techniques permettent une irradiation respectant davantage les tissus sains avoisinants et peuvent ainsi faire appel, après dosimétrie très précise « conformationnelle », à plusieurs portes d'entrée du rayonnement, et ce d'autant plus que le volume sera complexe. De ce fait, les doses délivrées à la tumeur peuvent être portées à plus de 70Gy. [18]

1.6.3. Chimiothérapie

La chimiothérapie, associée ou non à la radiothérapie, constitue le principal traitement des CBPC. Celle-ci comporte du cis-platine associé à un alcaloïde de la pervenche (vinorelbine) ou du carboplatine associé à du paclitaxel ou de l'étoposide.

La chimiothérapie est administrée soit avant la radiothérapie (2 ou 3 cycles espacés de 28 jours) ou concomitamment à la radiothérapie. Dans ce dernier cas, la toxicité, notamment digestive, est majorée. Certains stades IIIA, jugés inopérables dans un premier temps, sont traités par chimiothérapie première suivie d'une réévaluation. Les stades IV font l'objet d'une chimiothérapie lorsque l'index d'activité le permet. Cette chimiothérapie est généralement à base de sels de platine associés à la vinorelbine, la gemcitabine ou encore à du paclitaxel.

Les taux de réponse s'établissent autour de 30% à 35% seulement, mais il existe un bénéfice indéniable, bien que modeste sur la survie. Par ailleurs, des traitements locaux réalisés sous endoscopie bronchique (laser, cryothérapie, thermocoagulation, curiethérapie-radiothérapie endobronchique) sont appliqués dans certains cas. [18]

1.6.4. Thérapie ciblée

Malgré les progrès observés au cours de ces vingt dernières années dans le traitement du cancer bronchique non à petites cellules, en particulier avec la chimiothérapie à base de sels de platine, les bénéfices en termes de survie dans les formes avancées restent modestes et semblent avoir atteint un plateau. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de transformation néoplasique a permis l'avènement de nouvelles molécules ciblant spécifiquement une étape de l'oncogenèse.

Le but de ces traitements est d'assurer une meilleure sélectivité thérapeutique et d'atténuer les effets toxiques des thérapeutiques moins sélectives comme la chimiothérapie. Les thérapeutiques moléculaires ciblées peuvent agir sur différents médiateurs moléculaires impliqués dans l'acquisition de ces propriétés.

Ce domaine en pleine évolution permet d'agir sur trois étapes différentes de la division cellulaire :

- L'inhibition du signal de transduction cellulaire,
- L'inhibition de l'angiogenèse,
- La modulation de l'apoptose. [20]

1.6.5. Immunothérapie

Contrairement aux traitements de première ligne tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie à base de platine, ces nouvelles approches ont porté sur les propriétés et les fonctions de la tumeur elle-même ainsi que sur la compréhension du microenvironnement environnant.

Le but de l'immunothérapie dans le cancer est d'induire ou de ré-induire une réponse immunitaire à médiation cellulaire, principalement des cellules T CD4+ et CD8+ (cellules T cytotoxiques) qui peuvent détruire sélectivement les cellules qui présentent des antigènes associés aux tumeurs. L'immunothérapie pour le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) peut être grossièrement classée en deux catégories : passive et active. [21]

Le chapitre II met en évidence l'implication du facteur de transcription E2F1 dans la cancérogenèse broncho-pulmonaire ainsi que dans la glycosylation aberrante de ces cellules cancéreuses.

2.1. Bases moléculaires du cancer broncho-pulmonaire

L'homéostasie tissulaire est un mécanisme intime qui régule l'équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaires, assurant le maintien de la structure et le fonctionnement d'un tissu. Au sein d'une population cellulaire normale, cette homéostasie nécessite l'expression équilibrée de gènes prolifératifs, favorisant la division et la survie cellulaire (proto-oncogènes) et de gènes antiprolifératifs (gènes suppresseurs de tumeurs) freinant le cycle cellulaire ou induisant l'apoptose. La rupture de cet équilibre au cours de la carcinogénèse bronchique est la conséquence d'une activité anormale de certains proto-oncogènes corrélée à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. [22]

2.1.1. Oncogènes du cancer broncho-pulmonaire

Les proto-oncogènes codent pour des gènes essentiels à la division cellulaire. Dans les cellules tumorales, la modification de structure (altérations qualitatives) ou d'expression (altérations quantitatives) de ces gènes en réponse à des mutations, amplifications géniques, translocations chromosomiques ou à des anomalies épigénétiques conduit à leur activation constitutive sous la forme d'oncogènes.

Les protéines produites par les proto-oncogènes ont des rôles variés. Certaines sont excrétées et sont des facteurs de croissance agissant à distance comme des hormones pour stimuler la prolifération de leurs cellules-cibles. D'autres sont des récepteurs de ces facteurs de croissance présents au niveau de la membrane cytoplasmique (par exemple c-erbB1 qui produit le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor)). De nombreux proto-oncogènes (*c-ras*), sont impliqués dans les voies de signalisation et acheminent le signal de la membrane jusqu'au noyau où se prennent les décisions de prolifération ou de différenciation. Certains oncogènes sont capables d'induire (seul ou en coopération) la transformation tumorale, certains étant capables d'immortaliser les cellules (*c-myc*) ou d'induire l'acquisition du phénotype tumoral (*Ras*). [22]

L'analyse par puce SNP de 371 adénocarcinomes broncho-pulmonaires a mis en évidence 57 variations récurrentes du nombre de copies alléliques, dont 31 anomalies étaient focales : 24 amplifications et 07 délétions alléliques. Seules six (06) de ces altérations survenaient sur des oncogènes connus. [23]

L'intégration des données avec celles du séquençage de gènes impliqués dans la carcinogénèse a montré des corrélations entre amplification et mutation oncogénique pour les oncogènes EGFR, KRAS, MDM2 et HER2, et entre perte d'hétérozygotie et mutation pour les gènes suppresseurs de tumeur CDKN2A, RB1, PTEN, TP53, et APC. [24]

2.1.2. Gènes suppresseurs du cancer broncho-pulmonaire

Au cours du processus de la carcinogénèse pulmonaire, les gènes suppresseurs de tumeur préférentiellement inactivés codent pour des protéines appartenant aux deux grandes voies de signalisation des protéines p16^{INK4a}/Rb et p14^{ARF}/p53 (**Figure 4**). Ce sont deux voies de régulation clés car elles contribuent au bon déroulement du cycle cellulaire et au maintien de l'intégrité du génome via leur implication dans les points de contrôle des transitions G1/S et G2/M du cycle cellulaire. En réponse à un stress (ex : dommages de l'ADN), elles vont induire un arrêt du cycle (afin de réparer l'ADN endommagé) et/ou l'apoptose (si la cellule est incapable de prendre en charge ces lésions). [25]

2.2. Facteur de transcription E2F1 : Structure et fonctions

2.2.1. Membres de la famille E2F chez l'Homme

A ce jour, huit membres de la famille E2F ont été identifiés, E2F1-8. E2F1-6 nécessitent une dimérisation avec l'une des trois protéines DP (DP1, DP2/3 ou DP4) pour former un complexe transcriptionnellement actif et lier l'ADN avec une grande affinité. D'un point de vue structural, E2F1-5 sont très semblables puisqu'ils partagent un domaine de liaison à l'ADN en N-terminal, un domaine de dimérisation avec l'une des protéines DP, un domaine conservé « marked box » impliqué dans la dimérisation et la liaison à l'ADN, et en C-terminal un domaine de transactivation ainsi qu'un domaine d'interaction avec la protéine Rb. [25]

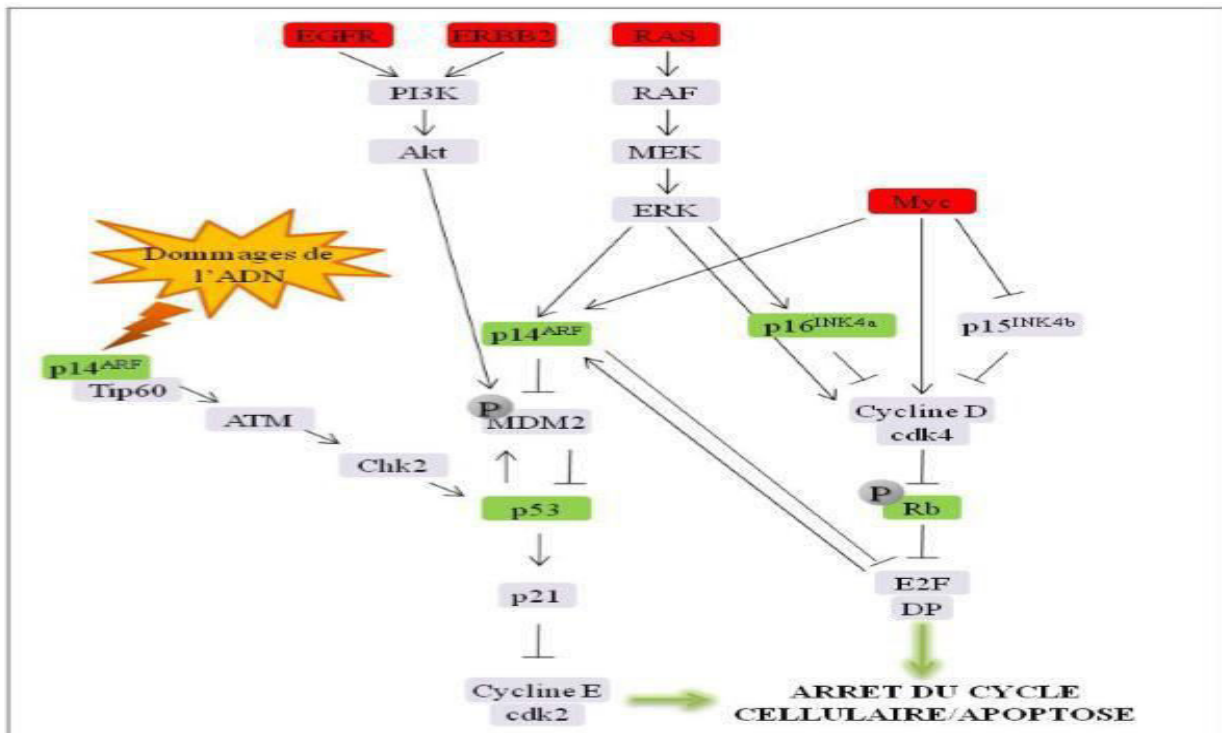


Figure 4. Altération des voies suppressives de tumeur dans les cancers du poumon. Les deux voies de signalisation majeures (p14ARF-p53 et p16INK⁴a-Rb) dont l'inactivation est impliquée au cours de la carcinogénèse pulmonaire sont fonctionnellement liées, et jouent des rôles critiques dans les points de contrôle, l'inhibition de la croissance cellulaire et ou apoptose. Ces deux voies sont interconnectées via les protéines p14ARF et E2F1. De plus, des signaux émanant de divers oncogènes et facteurs de croissance leurs sont aussi connectés. De nombreux éléments de ces deux voies sont inactivés dans les cancers du poumon (Rouge: oncogènes fréquemment activés, Vert: inactivation fréquente). [25]

2.2.2. Activités biologiques de E2F1

Dans un premier temps, E2F1 a été identifiée pour son rôle important dans la progression du cycle cellulaire, notamment via la régulation positive de l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de l'ADN. L'apparition de nouvelles technologies telles que les puces à ADN, la technique d'immunoprécipitation de la chromatine et la bioinformatique, a considérablement élargi le nombre et la nature des gènes potentiellement régulés par E2F1. Cette diversité de fonctions s'étend des gènes régulateurs traditionnels de la transition G1/S à des gènes impliqués dans le point de contrôle mitotique, la réparation de l'ADN, l'apoptose, l'angiogénèse, la différenciation et le développement, aussi bien qu'à des gènes de fonction encore inconnue. [26]

2.2.3. E2F1 et glycosylation de surface dans le cancer broncho-pulmonaire

E2F1 régule la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. La dérégulation de l'activité transcriptionnelle de E2F1 par l'inactivation de Rb peut être un événement clé dans la plupart des cancers humains. [27]

Il a été démontré que E2F1 est surexprimé dans 92% des carcinomes pulmonaires à petites cellules (SCLC) et dans 50% des carcinomes neuroendocriniens à grandes cellules (LCNEC) alors qu'il est indétectable dans 90% des cas d'adénocarcinome et 82% du carcinome épidermoïde par rapport au poumon normal correspondant.

Aucune amplification n'a été observée mais une augmentation de l'expression de l'ARNm de E2F1 a été détectée dans 75% de SCLC, du E2F1 surexprimé. Dans ces tumeurs et contrairement au NSCLC, la régulation en amont de E2F1 est associée à son accumulation nucléaire et à la surexpression de plusieurs de ses gènes cibles. [28]

Les chaînes glucidiques de la surface cellulaire sont largement connues pour contribuer à la migration cellulaire, à la reconnaissance et à la prolifération. Il est rapporté que l'expression de β 1,4GalT I est régulée par les facteurs de transcription E2F1. (**Figure 5**)

La β 1,4-galactosyltransférase I (β 1,4GalT I) transfère le galactose à la N-acétylglucosamine terminale du N-glycane de type complexe et contribue à la prolifération, à la différenciation et à la migration des cellules.

Les protéines E2F1 interagissent avec le promoteur du gène β 1,4-GalT I *in vivo*, et la surexpression E2F1 stimule l'activité du promoteur β 1,4-GalT I et l'expression de l'ARNm et de la protéine de β 1,4-GalT I, et augmente le niveau de β 1,4-galactosylation.

Plusieurs travaux ont montré que l'expression de l'ARNm de β 1,4-GalT I est régulée par le cycle cellulaire dans les cellules de mammifères et que le β 1,4-GalT I régule la progression du cycle cellulaire. L'inhibition de l'expression de β 1,4-GalT I empêche la progression du cycle cellulaire induite par E2F1. [29]

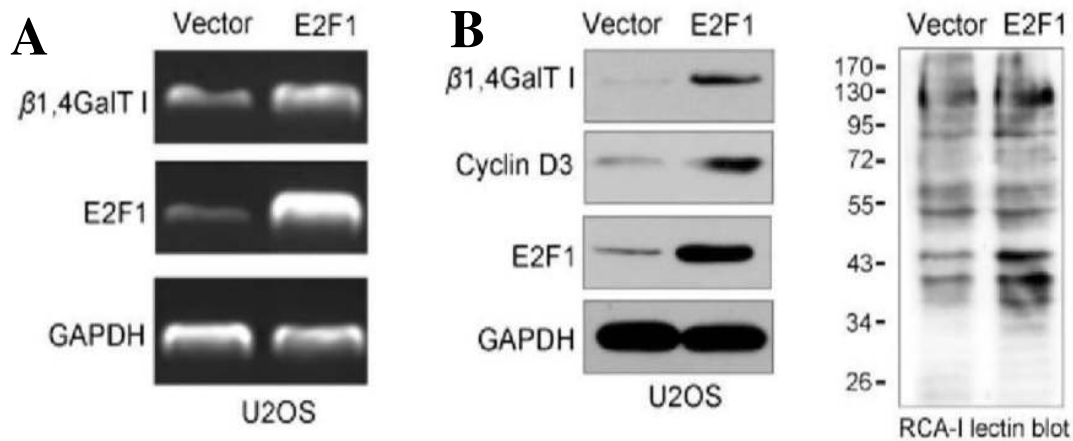


Figure 5. Activation du promoteur $\beta 1,4\text{GalT I}$ par E2F1.

(A) Analyse par RT-PCR de l'ARNm de 1,4GalT I et du niveau d'expression de l'ARNm de E2F1 dans des cellules U2OS transfectées avec un vecteur témoin ou une construction d'expression de E2F1. Le niveau d'expression de l'ARNm de GAPDH a servi de contrôle de chargement. (B) Analyse par transfert de Western du taux d'expression de la protéine 1,4GalT I, Cyclin D3 et E2F1 dans des cellules U2OS transfectées avec un vecteur témoin ou une construction d'expression E2F1 (panneau de gauche). Les protéines ont également été séparées par SDS PAGE et la liaison à RCA-I a été analysée par la lectine de RCA-I (panneau de droite). Le Western blot de la GAPDH a servi de contrôle de chargement. [29]

2.3. Glycosylation aberrante dans le cancer

La glycosylation est le processus enzymatique qui produit des liaisons glycosidiques entre les saccharides et d'autres saccharides, lipides ou protéines. La glycosylation est une modification protéique post-traductionnelle fréquente et bien connue, et probablement beaucoup plus fréquente que la phosphorylation.

Le glycome, ou schéma complet des modifications des glycanes dans une cellule ou un tissu, est assemblé par l'action synchronisée de nombreuses enzymes modifiant les glycanes. Ces enzymes comprennent des glycosyltransférases et des glycosidases qui glycosylent divers hydrates de carbone complexes tels que des glycoprotéines, des glycolipides et des protéoglycanes.

Le degré de glycosylation d'une protéine donnée dépend de la présence et de la fréquence des sites de glycosylation dans la séquence protéique, ainsi que de l'expression et des activités des enzymes de glycosylation spécifiques dans la cellule ou le tissu.

Les glycanes jouent un rôle dans la signalisation des cellules cancéreuses, la dissociation et l'invasion des cellules tumorales, les interactions cellule-matrice, l'angiogénèse, la métastase et la modulation immunitaire. [30]

2.3.1. Glycoconjugués

La connaissance approfondie des structures glycaniques, de leurs fonctions biologiques et de leurs voies de biosynthèse permet aujourd'hui de trouver de nombreuses applications aux glycoconjugués tant dans le domaine thérapeutique que dans l'alimentaire et la cosmétique. Notamment, grâce aux molécules glucidiques, on est capable de déceler certaines maladies graves telles que le cancer en réalisant un diagnostic plus spécifique et plus précoce, et les thérapies basées sur les molécules portant les glycanes sont plus efficaces et moins lourdes que d'autres utilisées actuellement. [31]

Des glycanes complexes, éventuellement substitués par des résidus sulfates ou phosphates, sont reconnus par des récepteurs appelés « lectines ». Les lectines sont impliquées dans la reconnaissance entre leucocytes et cellules endothéliales (sélectines), dans les phénomènes infectieux (lectines virales), dans le routage intracellulaire des enzymes lysosomiales (récepteurs spécifiques des oligomannosides phosphorylés), et dans le trafic nucléocytoplasmique et la machinerie moléculaire du noyau (lectines nucléaires). [32]

2.3.1.1. Glycoprotéines

Les glycoprotéines sont largement distribuées dans la nature et se trouvent dans les vertébrés, les invertébrés, les plantes vertes, les champignons, les bactéries et les virus. Ces macromolécules contiennent des quantités variables d'hydrates de carbone liés de manière covalente aux squelettes des protéines par des liaisons glycopeptidiques.

Les glycoprotéines fonctionnent comme des enzymes (glucoamylase, 1,3-hexosaminidase, γ -glutamyl-transpeptidase), des hormones (gonadotrophine chorionique humaine, thyroglobuline), des récepteurs (récepteur de l'acétylcholine, récepteur des lipoprotéines de basse densité), des lubrifiants, des protéines de transport (fibrinogène), des protéines structurales (collagène, glycoprotéines de la paroi cellulaire de levure), des protéines immunoprotectrices (immunoglobulines, interféron) et réserves alimentaires (ovalbumine, caséine).

Deux fonctions majeures des portions glucidiques des glycoprotéines sont :

(i) pour agir comme "signaux de tri" pour diriger les glycoprotéines vers des organites

cellulaires et des tissus spécifiques, et (ii) pour protéger les glycoprotéines de la dégradation protéolytique.

En plus de ces deux fonctions majeures, il est de plus en plus évident que les fractions hydrates de carbone des glycoprotéines sont souvent impliquées dans les déterminants antigéniques de ces molécules. [33]

Sur la base de la liaison entre la protéine et le glycanes, on distingue deux grands types de glycosylation : dans la N-glycosylation une asparagine et un GlcNAc sont invariablement impliqués dans la liaison et dans l'O-glycosylation, le premier monomère de la chaîne glucidique est lié à un résidu hydroxylé, qui est le plus souvent une sérine ou une thréonine (**Figure 6**). [31]

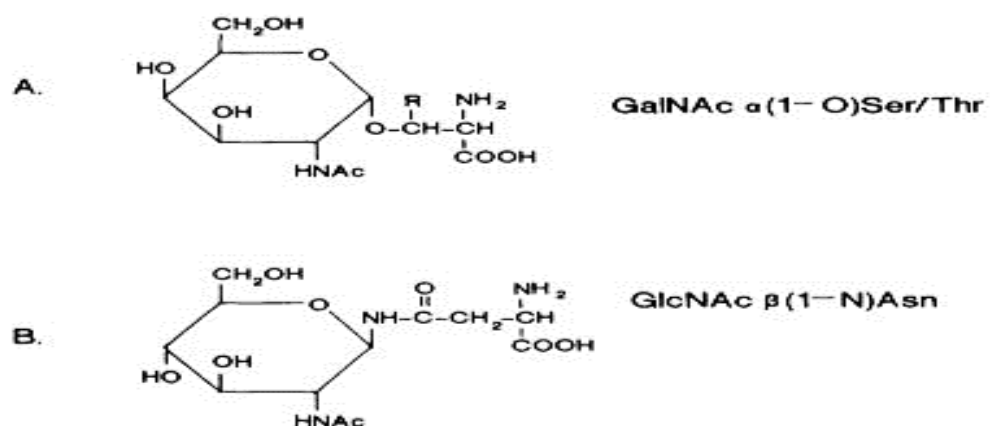


Figure 6. Principales liaisons glycopeptidiques trouvés dans les glycoprotéines. (A) une liaison O-glycosidique entre la N-acétylgalactosamine (GalNAc) et la sérine / thréonine (Ser / Thr) ; (B) liaison N-glycosidique entre la N-acétylglucosamine (GlcNAc) et l'asparagine (Asn). [33]

L'élaboration de glycanes complexes sur les glycoprotéines et les glycolipides est une fonction majeure de l'appareil de Golgi. Cependant, l'initiation de nombreux types de glycosylation des protéines, comme la N-glycosylation, l'O-mannosylation et l'addition d'ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), se produit dans le réticulum endoplasmique (RE). De telles modifications protéiques sont typiquement post-traductionnelles mais parfois co-traductionnelles et sont irréversibles, avec une exception connue, O-GlcNAc, qui se produit sur les protéines dans le cytoplasme / noyau. [34]

Les glycoprotéines sont les protéines qui sont liées de manière covalente par des glycanes à leur asparagine ou sérine / thréonine.

La glycosylation peut être spécifique à la maladie et est donc associée au niveau de progression de la maladie. Par exemple, les patients atteints d'un cancer présentent souvent

des niveaux élevés de protéines sériques hautement sialylées, mais leurs taux de glycoprotéines sont diminués lorsque les patients reçoivent une chimiothérapie. [35].

Les lectines sont des protéines liant les hydrates de carbone qui capturent les épitopes oligosaccharidiques sur les glycoprotéines. En utilisant des stratégies basées sur la lectine, l'enrichissement sélectif des glycoprotéines à partir du sérum ou du plasma est mis en œuvre pour la découverte de biomarqueurs du cancer. [36]

2.3.1.2. Glycolipides

Les glycolipides sont formés par une ou plusieurs unités monosaccharidiques, liées de façon covalente à une partie hydrophobe comme un céramide, un sphingoside, un acylglycérol ou un prényl phosphate. Dans les deux premiers cas, ces glycolipides sont des glycosphingolipides et peuvent être de type neutre ou acide. Quand la partie lipidique possède un groupement inositol, ils sont appelés glycoposphatidylinositol. [32] (**Figure 7**)

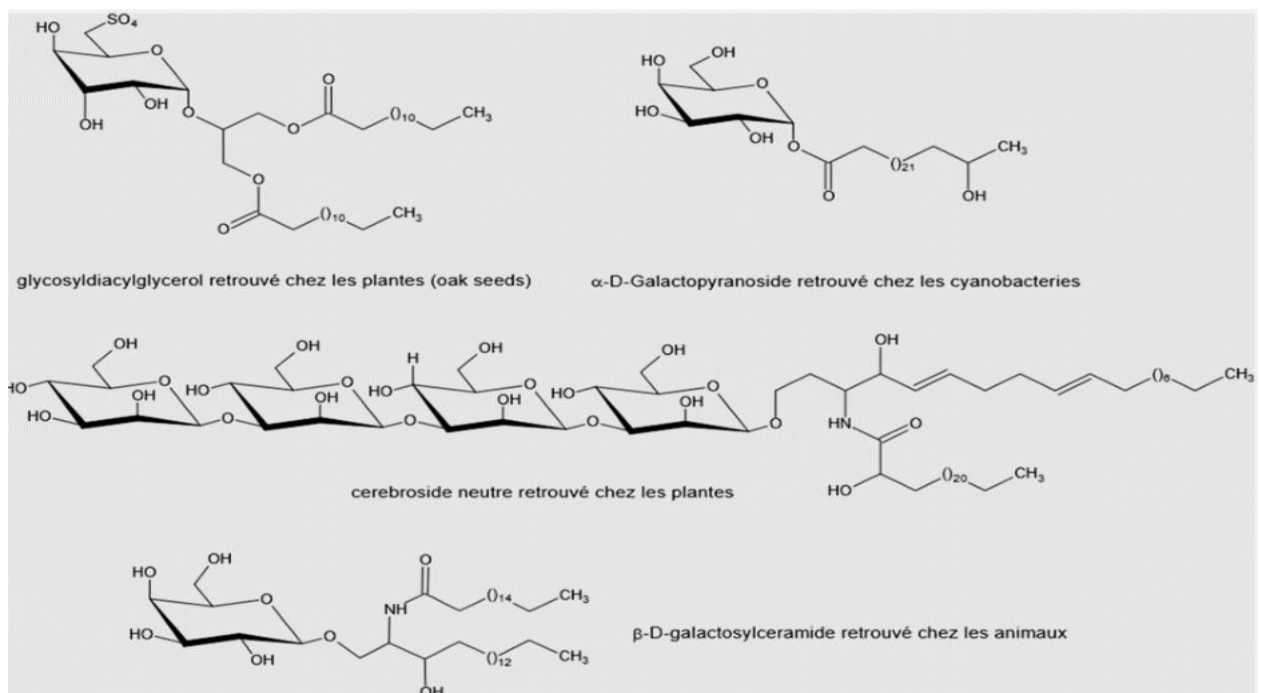


Figure 7. Quelques exemples de glycolipides présents chez les procaryotes, les plantes et les animaux. [37]

Les glycolipides présents dans le feuillet externe de la membrane plasmique peuvent fortement contribuer à la rigidité et à la fluidité de la membrane plasmique. Des changements dans la composition des glycolipides dans les cellules transformées peuvent

affecter le changement de la fluidité de la membrane qui a été largement observé dans de nombreuses cellules transformées. La possibilité existe que des changements de transport dans de nombreuses cellules transformées puissent également être corrélés avec des changements de glycolipides. De nombreux gangliosides, en particulier des gangliosides de type cellulaire non spécifiques, peuvent réguler l'adhésivité cellulaire. La diminution de l'adhésivité cellulaire et de la croissance cellulaire indépendante de l'ancrage pourrait bien être liée à la perte de certains gangliosides et à l'accumulation d'un ganglioside associé aux cellules tumorales. [33]

2.4. Glycoconjugués : biomarqueurs du cancer

Des preuves considérables, résumées dans certaines revues, indiquent qu'un grand nombre de glycoconjugués sont altérés dans les tissus cancéreux et métastatiques primaires. [38]

De nombreux chercheurs ont trouvé des différences dans les glycoconjugués de surface cellulaire accompagnant la transformation maligne chez les animaux et les humains à la fois dans la culture cellulaire (*in vitro*) et dans les tissus solides (*in vivo*). [39]

Il apparaît de plus en plus clairement que des changements se produisent sur la surface cellulaire maligne et que beaucoup, sinon la plupart, de ces changements sont dus à des glycoprotéines modifiées et des glycolipides, on ignore encore si ces changements sont des épiphénomènes ou s'ils font partie intégrante du processus malignité. [40]

A la surface des cellules cancéreuses, certaines glycoprotéines comme les mucines et des glycolipides sont surexprimés [41]. A partir des principaux marqueurs tumoraux, on souligne les gènes qui correspondent aux glycoprotéines humaines telles que la gonadotrophine chorionique humaine (hCG- β), l'alphafoetoprotéine (AFP), l'antigène carcino-embryonnaire (CEA), le récepteur du facteur de croissance épidermique 2 (ErbB-2) et des mucines hautement glycosylées comme CA 19.9, CA 125, CA 27.29, CA 15.3, qui sont les plus utilisées dans la pratique clinique actuelle. [42]

Le **chapitre III** présente la structure et les fonctions de rPVL, son action spécifique sur la N-AcétyleGlucosamine et son utilisation dans la détection de la glycosylation aberrante des cellules cancéreuses et, plus précisément, dans le cancer broncho-pulmonaire.

3.1. N-Acétyleglucosamine (GlcNAc) et cancer broncho-pulmonaire

La présence du GlcNAc à la surface de différents types de cellules humaines permet de participer à la signalisation cellulaire, analogue à d'autres types de molécules qui agissent comme des messagers, y compris des ions, des nucléotides et des acides aminés. [43]

Des études récentes révèlent de nouvelles façons de médiation du GlcNAc directe et indirecte dans la signalisation cellulaire [44]. La comparaison subséquente de ces réponses, aux changements induits par GlcNAc dans les bactéries, révélera des manières distinctes pour GlcNAc d'activer la signalisation, y compris l'interaction directe de GlcNAc avec les régulateurs transcriptionnels qui influencent la production des facteurs de virulence [45].

Un autre rôle de GlcNAc, en tant que modificateur de la signalisation, a été identifié dans des cellules animales dans lesquelles le GlcNAc influence la glycosylation des protéines. [46]

Une modification significative du glycome tissulaire est une caractéristique des tumeurs malignes, avec une caractéristique structurale commune, la β -N-Acétyle-D-Glucosamine (GlcNAc). Elle était caractéristique d'un groupe de glycanes liés aux protéines et aux lipides surexprimés en particulier dans les tumeurs malignes du poumon (carcinome à petites cellules et adénocarcinome), rein (carcinome à cellules rénales), sein (carcinome canalaire) et ovaire (adénocarcinome). Les antigènes GlcNAc terminaux se sont révélés très rares sur les surfaces cellulaires humaines, les antigènes GlcNAc ont été observés comme étant associés aux surfaces des cellules tumorales. Une galactosylation réduite des glycanes peut conduire à une exposition des antigènes GlcNAc terminaux sur les surfaces des cellules cancéreuses dans les tumeurs humaines, et que l'accumulation de ces glycanes peut devenir un déterminant majeur dans le glycome tumoral.

Pour évaluer l'ampleur de la modification du glycome associé au cancer, une différence de profil quantitatif total a été observée entre les profils de N-glycanes normaux et de tissus tumoraux (**Figure 8**). Les principaux signaux de glycanes associés aux tumeurs se sont ainsi révélés contenir une caractéristique structurale commune: la présence de résidus GlcNAc terminaux non réducteurs.

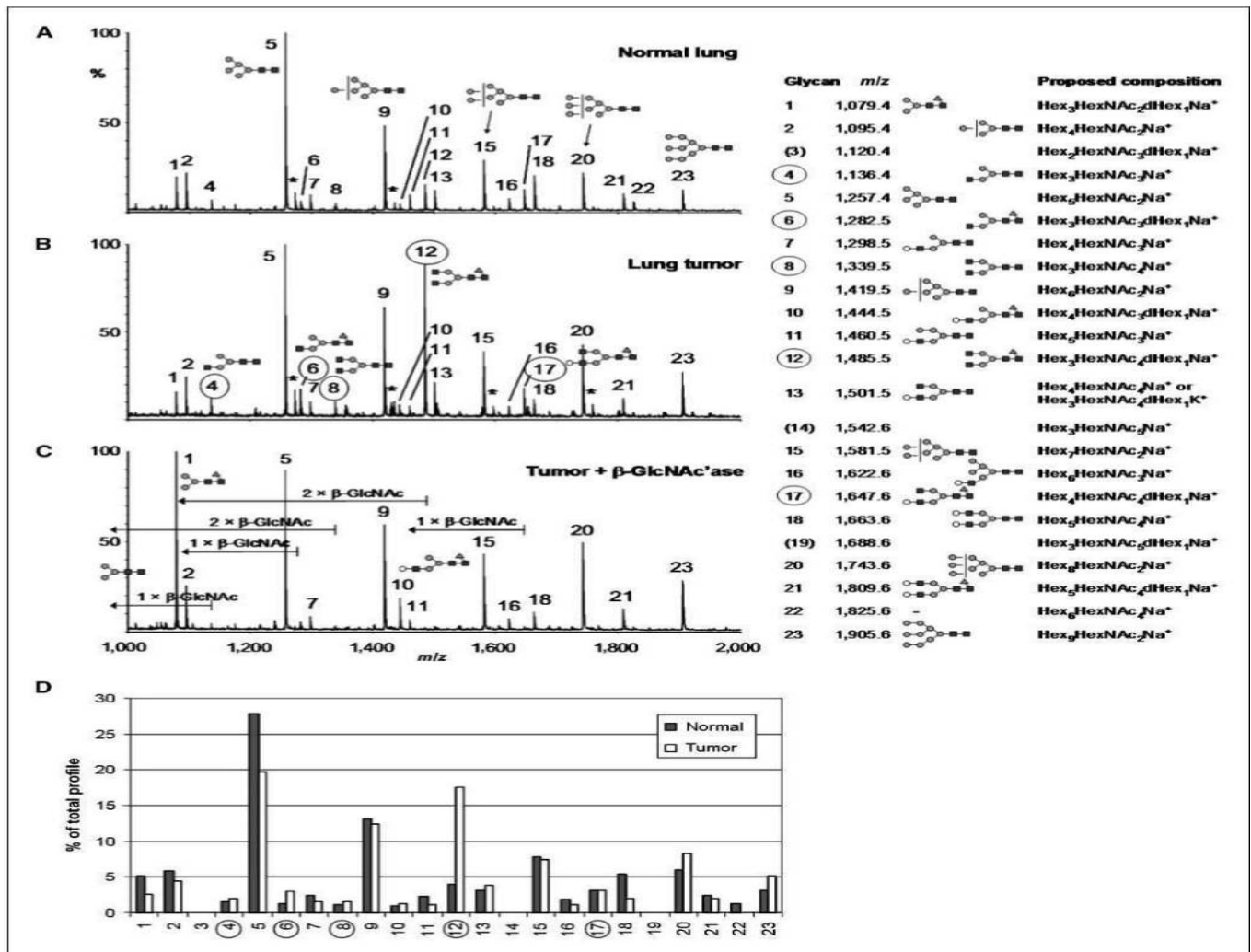


Figure 8. Identification des antigènes glycanes associés au cancer du poumon. A et B, profils de spectrométrie de masse MALDI-TOF de glycanes liés aux protéines neutres entre 1000 et 2000 Da, isolés à partir d'échantillons de tissus archivés paraffiniques de tissu pulmonaire normal (A) ou de carcinome pulmonaire à petites cellules (B). C, l'échantillon de glycanes du cancer du poumon a été traité avec l'enzyme β -N-acétylglucosaminidase pour révéler des glycanes avec des résidus GlcNAc terminaux non réducteurs. L'enzyme digère les signaux glycanes 4, 6, 8, 12 et 17 en fragments plus petits (flèches), indiquant la présence d'une ou de deux GlcNAc terminales dans ces signaux. D, diagramme en colonnes des profils de glycanes de spectrométrie de masse de A et B normalisés à 100% du profil total permettant la comparaison des intensités de signal relatives. Axe y : intensité du signal relatif, 0% à 100%; axe des abscisses : rapport m/z. Astérisques, adductions de potassium. La numérotation du signal glycanes pour chaque m/z et la composition proposée correspondante des adductions de glycanes sont décrites sur la droite. Les signaux apparaissant uniquement dans les données supplémentaires sont entre parenthèses. Les principaux glycanes sont représentés par des figures schématiques : **carrés**, GlcNAc ; **cercles gris**, mannose ; **cercles vides**, galactose ; **triangles**, fucose. [47]

L'identification de structures glycaniques spécifiques du cancer peut être utile dans le développement de nouvelles thérapies anticancéreuses. Des études antérieures ont montré des réponses immunitaires antitumorales contre des structures de type GlcNAc terminales dans des modèles animaux.

Cependant, la pertinence de ces rapports en ce qui concerne le cancer humain devrait être étudiée plus en amont, en raison de la spécificité de l'espèce de la glycosylation. En utilisant des oligosaccharides synthétiques comme ligands, on observe des anticorps humains naturels spécifiques des antigènes GlcNAc terminaux présents dans le sérum humain, ce qui suggère que les antigènes GlcNAc sont immunogènes chez les humains. (**Figure 9**). [47]

Les progrès récents dans l'identification de nouveaux rôles pour GlcNAc dans la signalisation cellulaire indiquent que les études futures continueront à cartographier des rôles supplémentaires pour GlcNAc dans une gamme encore plus large de types de cellules. [48]

3.2. Lectines

Le terme de lectine a été proposé par W.C. Boyd et E. Shapleigh [49] à partir du latin *legere* qui se traduit par choisir. Les lectines sont une classe spéciale de protéines largement distribuées dans la nature, qui reconnaissent sélectivement et se lient de manière réversible aux hydrates de carbone et aux glycoconjugués au niveau de leurs sites de liaison. Ces protéines, qui peuvent être détectées par des tests d'hémagglutination, interagissent avec différents glucides présents dans les surfaces cellulaires.

Les lectines sont généralement classées en fonction de leur structure, de leur spécificité pour les hydrates de carbone et de la localisation des espèces. Les lectines peuvent être utilisées pour l'analyse de la structure et de la physiologie des cellules, des tissus et des micro-organismes pathogènes. En agriculture, ces protéines sont utilisées comme agents insecticides. Il a déjà été démontré que les lectines présentent des activités et des effets biologiques différents, tels que des activités mitogènes et antiprolifératives sur des lignées cellulaires de cancer humain, l'inhibition de la croissance bactérienne et fongique, l'action comme agents promoteurs dans l'agrégation cellulaire, les activités immunomodulatrices et les effets toxiques. Ces protéines sont prometteuses en tant que médicaments pour le traitement et le diagnostic des maladies humaines; ce sont des outils importants en cytochimie, en histochimie et en immunohistochimie et sont également utiles en médecine légale. [50]

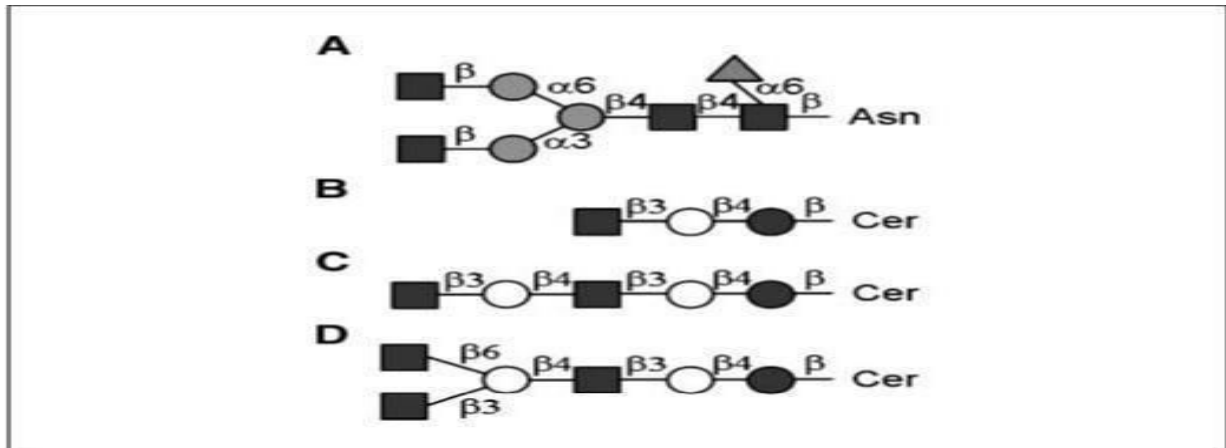


Figure 9. Glycans majeurs caractérisés, détectés dans les tumeurs malignes exprimant les antigènes GlcNAc terminaux (carrés bleus). A, le glycan 12 représente une glycoprotéine N-glycane liée à des résidus d'asparagine (Asn) dans des glycoprotéines tumorales. B, lacto-N-trioseglycosphingolipide. C, néolacto-N-pentose glycosphingolipide linéaire. D, glycosphingolipide ramifié contenant deux unités GlcNAc terminales. Cer, céramide. Les symboles de monosaccharide sont comme sur la **Figure 8**. [47]

3.2.1. Détection et spécificité des lectines

Les lectines sont, dans la plupart des cas, di- ou multivalentes et capables d'interagir avec des hydrates de carbone ou des glycoprotéines en solution ou liées à des membranes cellulaires et leurs sites de liaison interagissent avec des cellules formant diverses liaisons réversibles. En raison de cette capacité, les lectines sont facilement détectées par des tests d'agglutination. [51]

La mesure d'activité hémagglutinante est le test le plus simple et le plus largement utilisé pour la détection des lectines et leur caractérisation. Il est basé sur la propriété de ces protéines de lier des glycoconjugués de la surface des érythrocytes.

Les lectines reconnaissent de manière spécifique des mono et oligosaccharides. Les protéines spécifiques à des monosaccharides sont classifiées en cinq groupes, selon le sucre pour lequel la lectine présente la plus forte affinité: le mannose (Man), le galactose (Gal), le N-acétylgalactosamine (GalNAc), le N-acétylglucosamine (GlcNAc), le fucose (Fuc) et l'acide sialique (NeuAc, acide N-acétylneuraminique).

Cette reconnaissance est souvent désignée comme « la spécificité primaire » des lectines. Ces monosaccharides et leurs dérivés sont ceux qui sont le plus souvent présents sur les épitopes glycaniques des surfaces cellulaires.

Aujourd'hui les lectines sont largement utilisées comme outils dans la recherche et le secteur biomédical. Le **Tableau 2** décrit les principales lectines isolées de plantes ou d'invertébrés qui sont employées pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie ou, plus généralement, en histopathologie. [52]

Tableau 2. Lectines utilisées pour la mise en évidence de glycotopes en oncologie. [52]

Lectines	Source	Sucre inhibiteur
LEA	<i>Lycopersicon esculentum</i>	D-GlcNAc
PWL	<i>Phytolacca americana</i>	D-GlcNAc
WGA	<i>Triticum vulgare (wheat germ)</i>	D-GlcNAc
STA	<i>Solanum tuberosum</i>	D-GlcNAc
L-PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-GlcNAc β 1-6Man α 1-6Man β
GSI-B4	<i>Griffonia (Bandeira) simplicifolia</i>	D-Gal
MPA	<i>Maclura pomifera</i>	D-Gal
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	D-GalNAc
LBL	<i>Phaseolus lunatus (Lima bean)</i>	D-GalNAc
RCA-1	<i>Ricinus communis</i>	D-GalNAc
SBA	<i>Glycine max</i>	D-GalNAc
HAA	<i>Helix aspersa</i>	D-GalNAc
HPA	<i>Helix pomatia</i>	D-GalNAc
VVA-B4	<i>Vicia villosa</i>	D-GalNAc
WFA	<i>Wistaria floribunda</i>	D-GalNAc
ECA	<i>Erythrina crista-galli</i>	D-Gal β 1-4D-GlcNAc
PSL	<i>Laetiporus sulfureus</i>	D-Gal β 1-4D-GlcNAc
GSI-A4	<i>Griffonia (Bandeira) simplicifolia</i>	D-Gal β 1-4D-GlcNAc
ABL	<i>Agaricus bisporus</i>	D-Gal β 1-3GalNAc
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
IAC	<i>Artocarpus integrifolia</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
LDL	<i>Lactarius deliciosus</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
VGA	<i>Vicia graminea</i>	D-Gal β 1-3D-GalNAc
EEA	<i>Euonymus europaeus</i>	D-Gal α 1-3(L-Fuca1-2)D-Gal β 1-3/4D-GlcNAc

3.3. Lectine *Psathyrella velutina* recombinée (rPVL)

3.3.1. Description de rPVL

Les glycoconjugués de surface cellulaire présentant des altérations de leurs structures dans les maladies chroniques et des épitopes oligosaccharidiques distincts ont été associés au cancer. Parmi eux, les glycanes tronqués présentent des résidus terminaux non réducteurs de β -N-acétylglucosamine (GlcNAc), qui sont rares dans les tissus sains.

Une lectine liant GlcNAc provenant du champignon *Psathyrella velutina* (PVL) a été produite en culture bactérienne, avec un bon rendement. Une forte spécificité pour les résidus terminaux de GlcNAc a été mise en évidence par un réseau de glycanes. Les valeurs d'affinité obtenues, par microcalorimétrie et par résonance plasmonique de surface, ont démontré une affinité micromolaire pour les épitopes GlcNAc β 1-3Gal et pour les N-glycanes bi-antennaires avec des branches coiffées GlcNAc β 1-2Man. [53]

3.3.2. Structure cristalline de rPVL / disaccharide

Le rPVL a été cristallisé dans un complexe avec GlcNAc β 1-3Gal, le disaccharide qui coiffe les polylectosamine N-glycanes tronqués. La structure a été résolue à 1,95 Å et a affiché le pli à trois hélices à sept pales attendu (**Figure 10**). La structure globale de la protéine recombinante était très similaire à celle décrite précédemment, pour la PVL de type sauvage. La glycosylation avec des résidus GlcNAc exposés, manquant de galactosylation terminale ou de sialylation, a été rapportée pour plusieurs marqueurs pathologiques tels que les IgG de la polyarthrite rhumatoïde et de l'hépatome de rat. La spécificité remarquable vers la non-réduction du GlcNAc terminale a incité à l'utilisation du PVL comme agent de détection du GlcNAc dans les analyses diagnostiques. [53]

L'analyse de l'expression de la glycosyltransférase, dans les données de transcriptome provenant d'adénocarcinomes pulmonaires, montre des différences, statistiquement, significatives entre le cancer et les tissus sains, pour plusieurs gènes de glycosyltransférase. Ces données sont compatibles avec une augmentation des structures terminées par GlcNAc dans les cellules cancéreuses du cancer du poumon. [54]

3.3.3. Lectine recombinée rPVL, GlcNAc et cancer broncho-pulmonaire

Le marquage de plusieurs types de cellules cancéreuses et l'utilisation d'inhibiteurs du métabolisme des glycanes ont indiqué que la lectine rPVL se lie à la GlcNAc terminale mais également à l'acide sialique (Neu5Ac). L'analyse de l'expression de la glycosyltransférase a confirmé que le taux le plus élevé de GlcNAc se présente sur les cellules cancéreuses. La liaison du rPVL est spécifique au tissu cancéreux et un marquage, faible ou nul, est observé pour les tissus sains, à l'exception des glandes gastriques qui présentent des mucines uniques présentant une unité de GlcNAc. [53]

Il a été confirmé que l'affinité rPVL pour Neu5Ac est inférieure d'au moins un ordre de grandeur à celle de GlcNAc et ne représente pas un problème lorsqu'on travaille sur des lysats cellulaires. La lectine rPVL est un outil prometteur pour étudier la dynamique des processus d'O-GlcNAcylation. Dans un proche avenir, on peut prévoir que le rPVL conjugué à différentes molécules (HRP, Alexa Fluor, FITC, rhodamine, ferritine) soit facilement accessible, permettant son utilisation par ELISA, microscopie confocale, microscopie électronique, co- ou immunoprécipitation et immunohistologie [54].

Dans les carcinomes du poumon, du sein et du côlon, une délimitation claire peut être observée entre les régions cancéreuses et les tissus sains environnants. PVL est donc un outil utile pour le marquage des ga-lacto-glycanes dans le cancer ou d'autres maladies. [53]

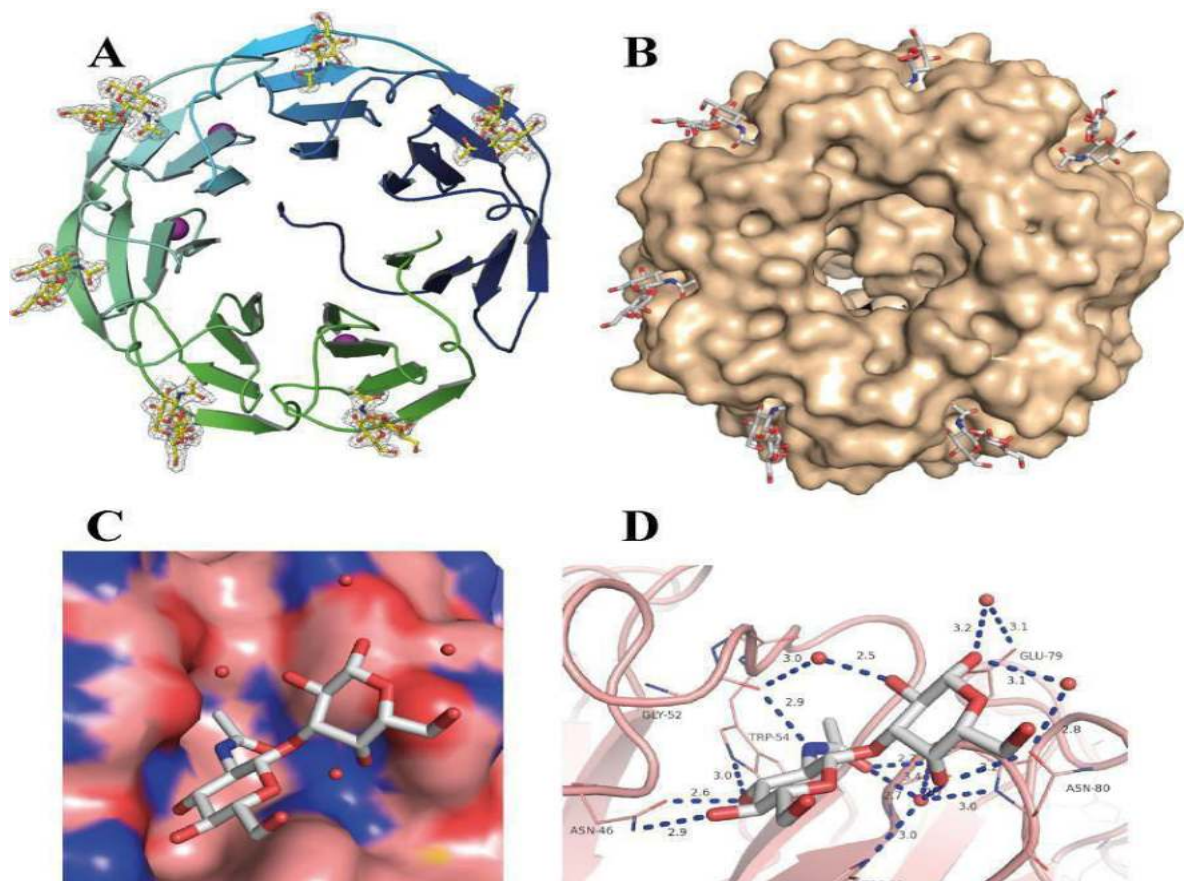


Figure 10. Structure cristalline du complexe rPVL / GlcNAc β 1-3Gal. A. pli-propeller de rPVL avec la chaîne peptidique représentée sous forme de bande de couleur rouge (N-terminale) à vert (extrémité C-terminale). Les disaccharides sont représentés sous la forme d'un bâton avec une carte d'électrondensité $2mF_o-DF_c$ convertie en 1σ ($0,4 \epsilon \text{ \AA}^{-3}$). Les ions calcium sont représentés en tant que pink sphere. B. Même propulseur avec une surface de la protéine accessible au solvant. C et D, détails de l'interaction dans le site 1 avec des molécules de disaccharide et d'eau. Les liaisons hydrogène sont représentées en pointillés dans le panneau D. Tous les graphiques ont été préparés sur la chaîne A en utilisant le logiciel PyMol (Schrödinger). [53]

MATÉRIEL
ET
MÉTHODES

1. Lignées cellulaires

L'ensemble des lignées cellulaires (13 lignées cellulaires) sont obtenues auprès de 'The American Type Culture Collection' (ATCC, Manassas, VA) :

- Les lignées cellulaires H358 (ATCC[®] CRL5807TM), H441 (ATCC[®] HTB174TM), H322 (ATCC[®] CRL5806TM) et A549 (ATCC[®] CCL185TM) d'adénocarcinome bronchique humain et la lignée cellulaire immortalisée HBEC-3KT (ATCC[®] CRL4051TM) d'épithélium bronchique humain normal.
- La lignée cellulaire CHO (ATCC[®] CCL61TM) d'ovaire d'Hamster chinois.
- Les lignées cellulaires MCF7 (ATCC[®] HTB22TM) et MDA-MB231 (ATCC[®] HTB26TM) d'adénocarcinome du sein humain.
- La lignée cellulaire HEK 293 (ATCC[®] CRL1573TM) du rein de l'embryon humain.
- Les lignées cellulaires Colo829 (ATCC[®] HTB72TM) de mélanome métastatique humain, A431 (ATCC[®] CRL1555TM) de carcinome épidermoïde humain de la peau, A375 (ATCC[®] CRL1619TM) et SK-Mel28 (ATCC[®] HTB72TM) de mélanome malin humain.

2. Culture cellulaire

L'ensemble des cellules sont cultivées à 37°C dans du milieu de culture RPMI-1640 (Gibco, Cergy Pontoise, France) (**Annexe 1**) dans un incubateur en atmosphère humide de 95 % avec 5 % de CO₂. Les cellules sont repiquées deux fois par semaine. Pour cela, un mélange de trypsine/EDTA (Gibco) est mis au contact des cellules, après rinçage avec du PBS puis les cellules sont récupérées dans du milieu RPMI-1640 (Gibco) contenant 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF) (Invitrogen), afin d'inhiber l'action de la trypsine. Les cellules de la lignée cellulaire HBEC-3KT sont cultivées en milieu kératinocytes-SFM (Gibco) (**Annexe 1**).

Les numérations des cellules viables sont réalisées sur cellule de Malassez par le test d'exclusion au bleu trypan (Sigma) (les cellules blanches étant viables). Le nombre de cellulesensemencées, pour chaque lignée et pour chaque condition étudiée, est de 1 million de cellules.

3. Blocs de prélèvements paraffinés et congelés

Nous avons utilisé des blocs paraffinés de biopsies humaines de poumon normal (PNL) ou présentant différents sous-types de cancer broncho-pulmonaire (Adénocarcinome: ADK, Squameux: SQC, Adénocarcinome mucineux invasif: IMA) provenant du service d'anatomopathologie du CHU Benflis Touhami (Batna-Algérie) et du département d'anatomie et de cytologie pathologique, du CHU de Grenoble Alpes- Site NORD (La Tronche - France).

Nous avons aussi utilisé des blocs, paraffinés et congelés, de prélèvements de cellules tumorales à partir de la lignée cellulaire H358 d'adénocarcinome bronchique humain, implantés en sous-cutanée ou en ortho-topique, dans des souris provenant de la plateforme d'Imagerie Optique du Petit Animal (OPTIMAL) de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB)-La Tronche (Grenoble-France).

4. Coupe des blocs de prélèvements paraffinés et congelés

Les blocs de prélèvements paraffinés sont coupés à une épaisseur de 3 μm à l'aide du microtome rotatif semi-automatisé Leica RM2245. Les blocs de prélèvements congelés sont déplacés vers le cryostat Leica CM3050 S, ils sont ensuite coupés à une épaisseur de 5 μm . Les coupes sont montées sur des lames avant d'être colorées.

5. Lectine PVL recombinée (rPVL) et lectine PA-IL

La lectine PVL a été produite sous forme recombinée (rPVL) dans *Escherichia coli* et purifiée comme décrit par Dr Audfray A. (2015) au niveau du laboratoire CERMAV (Université Grenoble Alpes, France). Elle reconnaît principalement la N-Acétyleglucosamine (GlcNAc) ainsi que l'acide sialique.

Une étude comparative a été effectuée avec d'autres lectines telle que : La lectine PA-IL (L9895, Merck) qui reconnaît le Galactose.

6. Enzyme et inhibiteurs

L'effet de la présence des enzymes sur l'action de rPVL a été étudié avec l'enzyme : Neuraminidase (Sialidase) (P0722, New England Biolabs (NEB)) qui coupe au niveau de l'Acide sialique.

L'effet des inhibiteurs, tels que la N-Acétyleglucosamine (GlcNAc) (A3286, Merck), inhibiteur de la lectine rPVL et le Galactose (Gal) (G5388 Merck), inhibiteur de la lectine PA-IL, a aussi été étudié.

7. Analyse d'immunofluorescence (IF)

Les cellules ont étéensemencées en lames de culture Lab-Tek à 4 chambres (cellules : 4×10^4 par chambre). Après 24H, les cellules ont été lavées avec du PBS glacé et fixées à 2% de ParaFormaldéhyde (PFA) pendant 10 mn à 4°C. Avant et après l'incubation avec 1% de BSA/PBS (p/v), les cellules ont été lavées avec du PBS froid 3 fois pendant 5 mn chacune.

Les cellules ont ensuite été soumises à une incubation dans des solutions de lectines : rPVL-Alexa488 ou PA-IL-Alexa488 pendant 1H à température ambiante, puis lavées avec du PBS froid trois fois pendant 3 mn chacune.

Afin d'étudier l'effet de l'inhibiteur, ce dernier est incubé en même temps que la lectine étudiée: GlcNAc pour rPVL et Gal pour PA-IL, à une concentration de 100 mM, pendant 30 mn à 37°C suivi de deux lavages au PBS (avec Ca^{2+} et Mg^{2+}).

Le montage sur lame se fait avec du DAPI et les cellules ont été examinées à l'aide d'un microscope BX41 équipé d'un système de caméra numérique DP-70 (Olympus, Tokyo, Japon) et d'un microscope Pseudo-confocal ApoTome équipé de AxioCam GRM (N/B).
(Figure 11)



Figure 11. Microscope de fluorescence ‘Olympus BX41’. [55]

8. Cytométrie en flux (FACS)

Les cellules ont été trypsinées, aliquotées puis lavées deux fois dans du PBS (avec Ca^{2+} et Mg^{2+}). Après incubation avec le rPVL-Alexa488 ($1, 5$ et $10 \mu\text{g ml}^{-1}$), les cellules ont été lavées deux fois et l'analyse a été effectuée sur un cytomètre de débit C6 Accuri à l'aide du logiciel CFlow-plus (BD Biosciences). (**Figure 12**)

Lorsqu'il est indiqué que les cellules sont pré-traitées avec de la Sialidase (Sigma), avec une concentration de $40 \mu\text{g/ml}$, cela se fait pendant 4H à 37°C .

Lorsqu'il est indiqué que les cellules sont mises en présence de l'inhibiteur de rPVL: GlcNAc ou en présence de l'inhibiteur de PA-IL: Gal, avec une concentration de 100 mM , l'incubation se fait simultanément en présence de la lectine étudiée correspondante à l'inhibiteur utilisé.



Figure 12. Cytomètre de flux BD Accuri™ C6 [56]

9. Immunohistochimie (IHC)

Les sections tissulaires ont été paraffinées, puis les peroxydases endogènes ont été bloquées par incubation des sections avec du PBS contenant 3% de peroxyde d'hydrogène (v/v), pendant 5 mn. Les sections ont ensuite été bloquées avec BSA 5% (p/v) pendant 30 mn à la température ambiante, suivie d'une incubation, avec 5–10 µg/ml de rPVL biotinylé, pendant 1H à température ambiante ou pendant 18H à 4° C.

Après avoir lavé les sections deux fois avec du PBS, un système indirect de biotine-streptavidine et un kit de détection DAB (Ventana Medical Systems) a été utilisé selon les instructions du fabricant. Les lames développées ont été lavées deux fois avec du PBS et colorées avec de l'hématoxyline.

Après le lavage avec de l'eau, les sections ont été déshydratées et montées. Des sections ont été observées sous un microscope BX41 équipé d'un système de caméra numérique DP-70 (Olympus, Tokyo, Japon).

Pour le traitement par les glycosidases, des sections ont été incubées (après paraffinage et blocage du peroxyde d'hydrogène) avec de la Sialidase (Neuraminidase) (P0722, New England Biolabs (NEB)) pendant 4 heures à 37° C.

Un contrôle négatif a été effectué par incubation simultanée, avec la lectine rPVL, de 100 mM de GlcNAc. Des lames de contrôle ont été préparées en parallèle. Après une nuit d'incubation, les lames ont été lavées deux fois dans du PBS, bloquées avec du PBS-5% BSA (p/v) et marquées de rPVL.

RESULTATS

ET

DISCUSSION

Etude de la détection des glycanes tronqués par la lectine recombinée rPVL dans les cancers broncho-pulmonaires

I. Au niveau cellulaire

Chaque type cellulaire est caractérisé par une glycosylation membranaire qui est aberrante pour les cellules cancéreuses et plus précisément dans le cancer broncho-pulmonaire.

La lectinohistochimie (ou lectinocytochimie) repose sur l'utilisation de lectines, protéines d'origine animale, végétale ou bactérienne, capables de reconnaître et de se lier à des copules hydrocarbonées des composants cellulaires, notamment des sucres du cell-coat revêtant les membranes plasmiques. Les lectines sont spécifiques d'un sucre donné. [57]

Pour analyser la capacité de rPVL (Lectine *Psathyrella velutina* recombinée) à reconnaître des cellules dérivées de tissus cancéreux humains, on procède à un marquage par rPVL de plusieurs lignées cellulaires et les marqueurs membranaires peuvent être détectés par cytométrie de flux ou microscopie d'immunofluorescence.

I.1. Cytométrie de flux (FACS)

La cytométrie en flux est une technologie puissante qui permet l'examen de plusieurs paramètres de cellules individuelles (par exemple, la taille des cellules, la complexité interne et le niveau d'expression du marqueur de surface). [58] L'analyse a donc été effectuée sur un cytomètre de débit C6 Accuri à l'aide du logiciel CFlow-plus (BD Biosciences).

Le **Tableau 3** représente toutes les lignées de cellules tumorales (poumon, ovaire, rein, sein et peau) et les conditions de culture cellulaire testées (Effet/dose, Effet inhibiteur, Effet Enzyme).

Tableau 3. Lignées de cellules tumorales et conditions de culture cellulaire testées.

Lignées (13)	Conditions
Poumon: H358 H441 H322 A549 HBEC-3KT	*Effet/Dose -rPVL (GlcNAc; Ac Sialique) -PA1L (Gal)
Ovaire: CHO	*Effet Inhibiteur -GlcNAc (rPVL) -Gal (PA1L)
Sein: MCF7 MDA-MB231	*Effet Enzyme - Sialidase (Ac Sialique)
Rein : HEK 293	
Peau: Colo829 A431 A375 SK-Mel28	

Le **Tableau 4** représente le résultat de plusieurs essais qui a permis la mise au point des conditions optimales d'incubation en présence des deux lectines étudiées: rPVL et PA1L, avec pour chaque condition un nombre de cellules d'un million, pour chaque condition.

Tableau 4. Mise au point des conditions optimales d'incubation en présence des deux lectines étudiées: rPVL et PA1L. (PBS++ : CaCl₂ et MgCl₂ (1mM))

<i>Incubation Lectine :</i> rPVL/PA1L	<i>+ Incubation Inhibiteur :</i> GlcNAc (rPVL) Gal (PA1L)	<i>+ Incubation Enzyme :</i> Sialidase (rPVL)
<ul style="list-style-type: none"> . Lavages : 2x PBS ++ . Incubation Lectine : rPVL ou PA1L Concentration : 0,5;1;5;10;20 µg/ml Durée/T° : 30 mn /37°C . Lavages : 2x PBS ++ . Lecture : FACS 	<ul style="list-style-type: none"> . Incubation Inhibiteur : GlcNAc ou Gal Concentration : 100 mM Durée/T° : 30 mn /37°C . Lavages : 2x PBS ++ 	<ul style="list-style-type: none"> . Incubation Sialidase : Concentration 1x : 40 µg/ml Concentration/Durée/T° : 1x/4H/37°C . Lavages : 2x PBS ++

I.1.1. Etude du rapport dose/réponse de l'action de la lectine rPVL sur différentes lignées cellulaires

La lectine rPVL est liée aux cellules cancéreuses de diverses origines, y compris le poumon, avec un rapport « dose/réponse », testé en absence et en présence de rPVL à 1 et 5 $\mu\text{g/ml}$, représenté dans le **Tableau 5**.

Il a été conclu que l'affinité de la lectine PVL pour Neu5Ac est au moins cent fois plus faible que l'affinité pour GlcNAc. [59]

L'intensité de la réponse est différente selon la nature de la lignée cellulaire. Elle est similaire pour la majorité des lignées cellulaires testées à l'exception de la lignée CHO (Ovaire) où le marquage n'apparaît qu'à une concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$. Cette lignée cellulaire présente de faibles taux de GlcNAc terminaux, que de Gal ou d'acide sialique. (**Figure 13**)

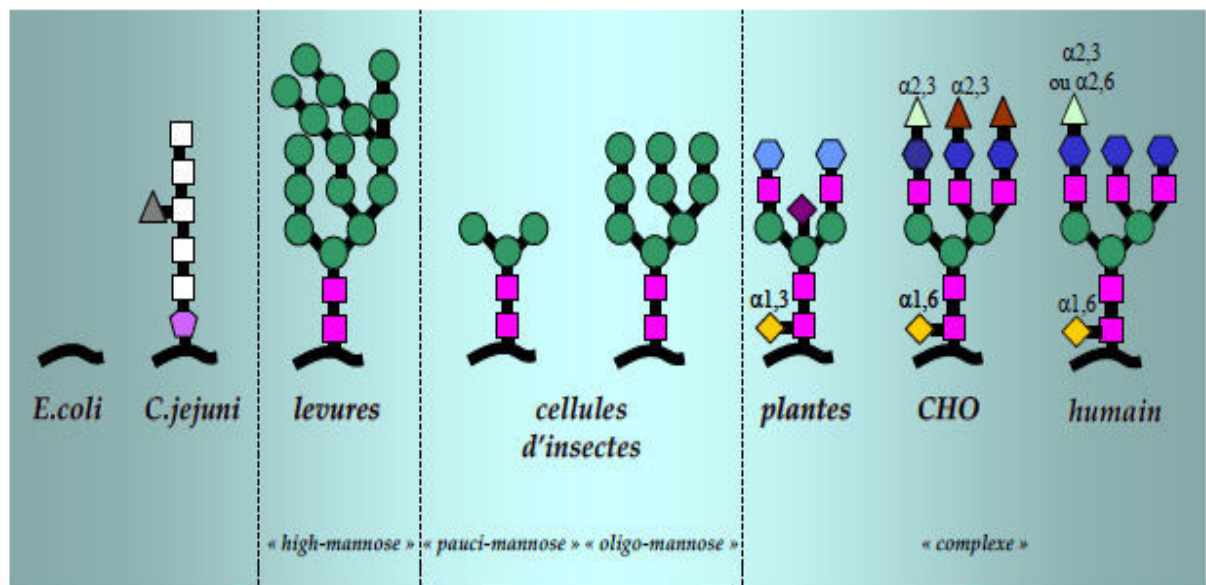


Figure 13. Exemples de structures N-glycanniques caractéristiques des glycoprotéines en fonction du système d'expression considéré. Glucose (\blacktriangle), GlcNAc (\blacksquare), mannose (\bullet), fucose (\blacklozenge), β 1,2-xylose (\blacklozenge), GalNAc (\square), bacillosamine (\blacklozenge), β 1,4 galactose (\blacklozenge), β 1,3 galactose (\blacklozenge), acide N-acétylneuraminique (\triangle), acide N-glycolyneuraminique (\blacktriangle). [60]

Pour la lignée cellulaire MCF7, on observe un faible marquage avec une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$, du à une faible galactosylation des glycanes sur les surfaces de ces cellules cancéreuses. [61]

Tableau 5. Rapport « Dose/Réponse » de l'analyse par cytométrie de flux (FACS) de l'action de la lectine rPVL à différentes concentrations (1 et 5 µg/ml) sur différentes lignées cellulaires.

Lignée	Dose/Réponse (µg/ml)	
	1	5
H358	+	+
A549	+	+
H441	+	+
H322	+	+
HBEC-3KT	+	+
CHO	0	+
MCF7	+/-	+
MDA-MB231	+	+
Colo 829	+	+
A375	+	+
A431	+	+
SK-Mel 28	+	+
HEK 293	+	+

Les diagrammes obtenus par FACS du marquage par rPVL-Alexa488 (5 µg/ml) sur différentes lignées cellulaires (H358, A549, HBEC-3KT, CHO et MCF7) sont étudiées, seuls ceux des lignées cellulaires (H358, HBEC-3KT et CHO) sont représentés dans la **Figure 14**.

Une comparaison faite entre une lignée cellulaire tumorale du poumon (H358) considérée comme riche en GlcNAc, une lignée cellulaire immortalisée du poumon, proche de celle d'un poumon sain (HBEC-3KT) et une lignée cellulaire tumorale de l'ovaire (CHO) ayant la particularité de présenter de faibles taux de GlcNAc terminaux.

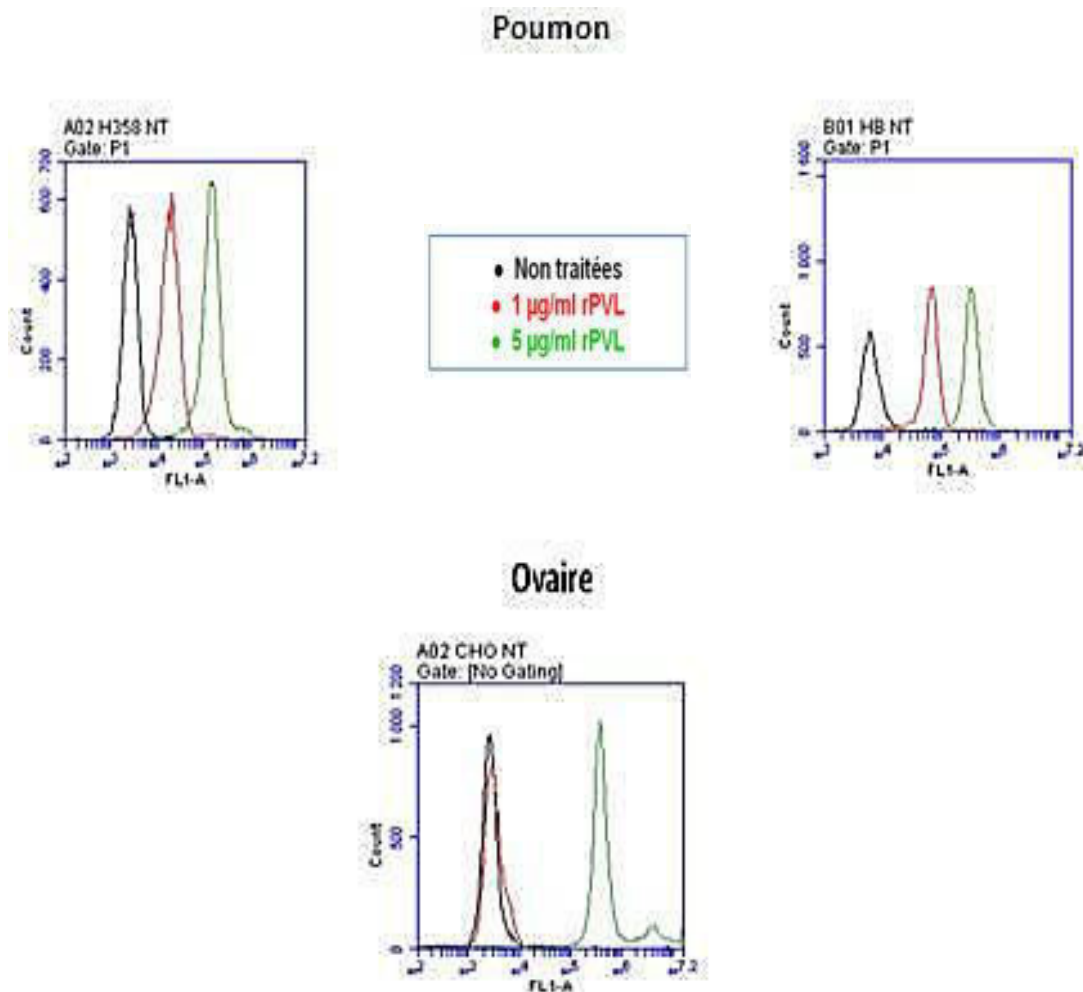


Figure 14. Marquage par rPVL des lignées cellulaires tumorales. Histogrammes de cytométrie en flux montrent rPVL-Alexa488 se liant à une lignée cellulaire immortalisée du poumon (HBEC-3KT), une lignée cellulaire tumorale pulmonaire (H358) ainsi qu’à une lignée cellulaire d’ovaire d’Hamster chinois (CHO). L'axe des x indique l'intensité de la fluorescence. L'axe y indique le nombre de cellules.
Ligne noire: cellules témoins non traitées; **ligne rouge:** rPVL-Alexa488 (1 µg/ml); **ligne verte:** rPVL-Alexa488 (5 µg/ml). Analyse effectuée sur un cytomètre de débit C6 Accuri à l'aide du logiciel CFlow-plus (BD Biosciences).

Les résultats montrent, pour le poumon, un rapide marquage par la lectine rPVL-Alexa488 à une faible concentration (1 µg/ml) avec la lignée cellulaire tumorale H358, suivie de la lignée cellulaire immortalisée HBEC-3KT. Cela confirme le fait que la lignée cellulaire tumorale H358 a la particularité de présenter un motif glycanique riche en GlcNAc, en position terminale (**Figure 15**) et que la présence des antigènes GlcNAc terminaux est associée aux surfaces des cellules tumorales comparée à leur faible présence aux surfaces des cellules immortalisées HBEC-3KT. [62]

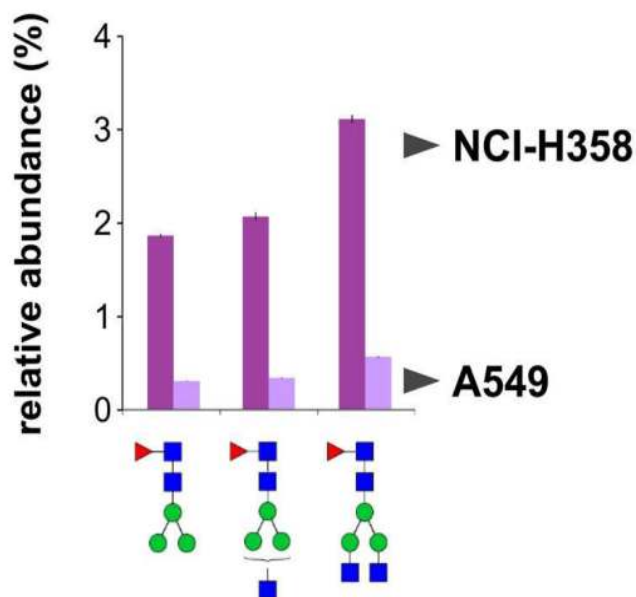


Figure 15. Abondance relative des glycanes liés à la biosynthèse avec des différences entre les lignées cellulaires NCI-H358 (poumon) et A549 (poumon). Augmentation des taux de Man3GlcNAc2Fuc, Man3GlcNAc3Fuc et Man3GlcNAc4Fuc observée chez H358 par rapport à A549. Les glycanes sont présentés, par ordre de biosynthèse, de gauche à droite. [62]

Avec la lignée cellulaire CHO, on observe une extinction du marquage avec une faible concentration de rPVL-Alexa488 (1 µg/ml) et n'est visible qu'avec une concentration de (5 µg/ml). Cette lignée cellulaire montre une résistance à certains sites de liaison de lectines provenant de plantes suite au fait que le glycome membranaire présente de faibles taux de GlcNAc, de Gal et d'acide sialique. [61]

I.1.2. Etude de l'effet de l'inhibiteur sur l'action de la lectine rPVL sur différentes lignées cellulaires

En présence de 100 mM de GlcNAc, inhibiteur de rPVL, la liaison du rPVL aux lignées cellulaires tumorales pulmonaires (H358 et A549) est fortement diminuée, ce qui indique une implication spécifique des sites de fixation des glucides (**Figure 16**).

Fait intéressant, l'inhibition complète n'a été atteinte que pour la lignée cellulaire HBEC-3KT qui est une lignée de cellules pulmonaires normales immortalisée, suggérant que les sites de liaison de rPVL sur cette lignée cellulaire peuvent avoir une affinité inférieure à celle des lignées cellulaires cancéreuses.

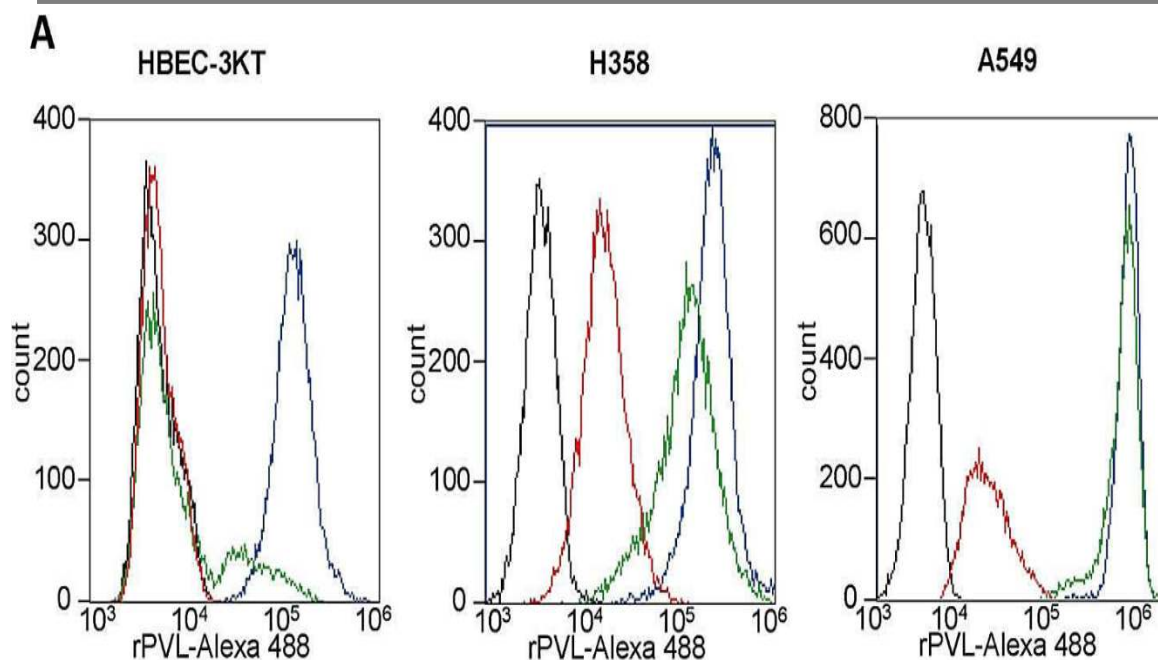


Figure 16. Marquage par rPVL des lignées cellulaires tumorales pulmonaires. Histogrammes de cytométrie en flux montrent rPVL-Alexa 488 se liant à une lignée cellulaire immortalisée du poumon (HBEK-3KT) et deux lignées cellulaires tumorales pulmonaires (H358 et A549). L'axe des x indique l'intensité de la fluorescence. L'axe y indique le nombre de cellules.

Ligne noire : cellules témoins non traitées ; **ligne bleue :** rPVL-Alexa 488 (5 µg/ml) pendant 30 mn ; **ligne rouge :** rPVL-alexa 488 (5 µg/ml) en présence de GlcNAc 100 mM; **ligne verte :** rPVL-Alexa 488 (5 µg/ml) après prétraitement à la sialidase. Analyse effectuée sur un cytomètre de débit C6 Accuri à l'aide du logiciel CFlow-plus (BD Biosciences).

I.1.3. Etude de l'effet de l'enzyme Neuraminidase sur l'action de la lectine rPVL sur différentes lignées cellulaires

Sachant que le traitement par la Neuraminidase provoque l'extinction du marquage par les lectines SNA, LFA, PVL et PSL [63] et puisque une microarray de glycanes a montré une liaison à ceux contenant du Neu5Ac, le traitement par la Neuraminidase a été effectué afin de déterminer si les glycanes de surface cellulaire terminés par le Neu5Ac pouvait être reconnus par la lectine rPVL.

Afin d'optimiser les conditions de traitement par la Neuraminidase, deux concentrations différentes de Neuraminidase ont été appliquées (1x : 40 µg/ml et 5x : 200 µg/ml) ainsi que deux temps d'incubation différentes (2H et 4H) avec un marquage au rPVL-Alexa488 (5 µg/ml) sur deux lignées cellulaires : H358 et CHO (**Figure 17**).

On observe pour les deux lignées cellulaires (H358 et CHO) et surtout pour H358, un déplacement du pic avec diminution du marquage par rPVL plus prononcée suite au changement de temps d'incubation plutôt qu'à la concentration de la Neuraminidase. Suivant ces résultats, il a été convenu d'appliquer une concentration de 40 µg/ml de Neuraminidase pour une incubation de 4H.

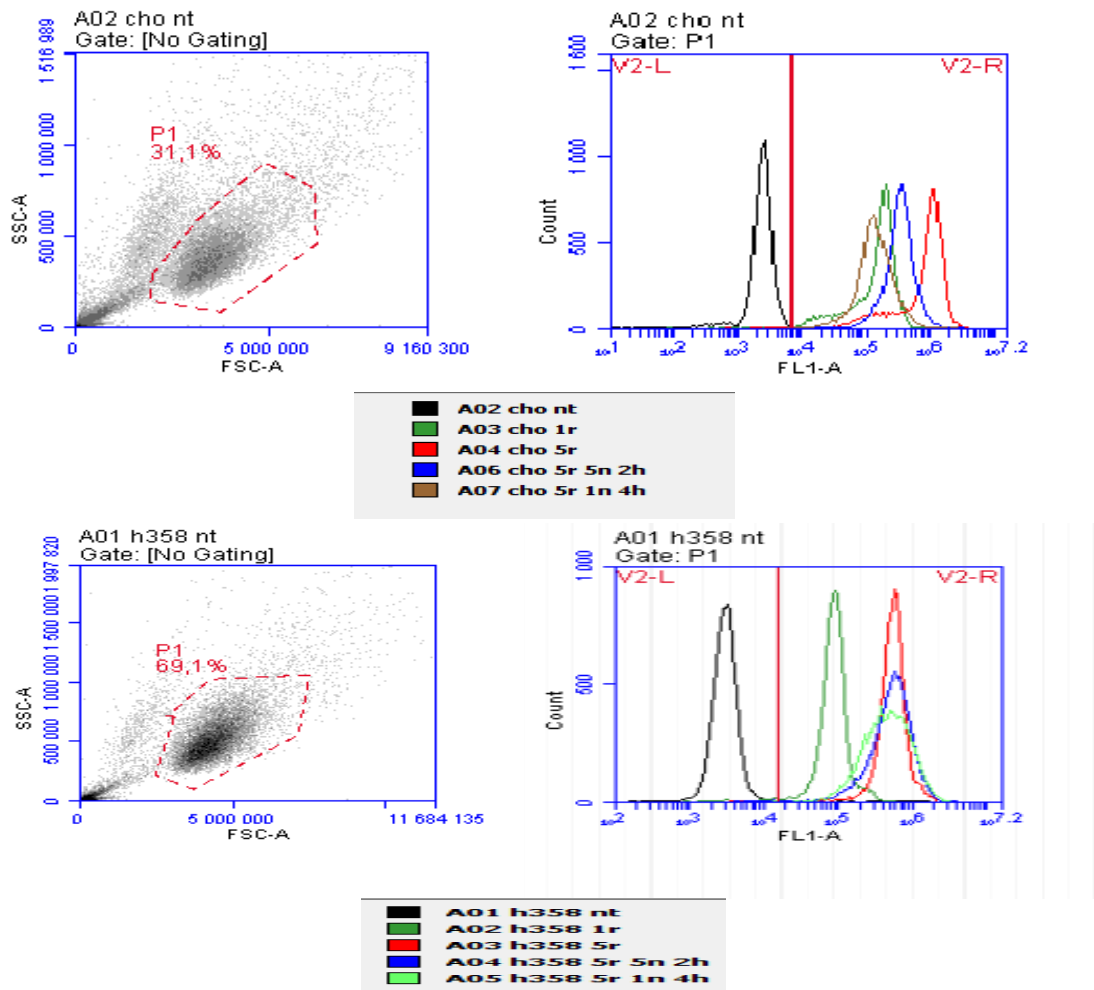


Figure 17. Analyse par cytométrie de flux (FACS) de l'action de la lectine rPVL à différentes concentrations (1 et 5 µg/ml) sur deux lignées cellulaires : H358 et CHO, en présence de l'enzyme Neuraminidase (1x : 40 µg/ml et 5x : 200 µg/ml) sous des temps d'incubation différents (2H et 4H) à 37°C. Analyse effectuée sur un cytomètre de débit C6 Accuri à l'aide du logiciel CFlow-plus (BD Biosciences).

La **Figure 18**, après le traitement par la sialidase, montre que le marquage cellulaire a été presque complètement perdue pour la lignée cellulaire HBEC-3KT, mais beaucoup moins pour d'autres lignées cellulaires comme le MCF-7 ou le A549 ou le H358 (**Annexe 2**).

Ce résultat indique que les glycanes à terminaison acide sialique (Neu5Ac) représentent les principaux ligands rPVL sur la lignée de cellules pulmonaires normales de HBEC-3KT, alors que les structures GlcNAc peuvent être impliquées dans les lignées cellulaires cancéreuses.

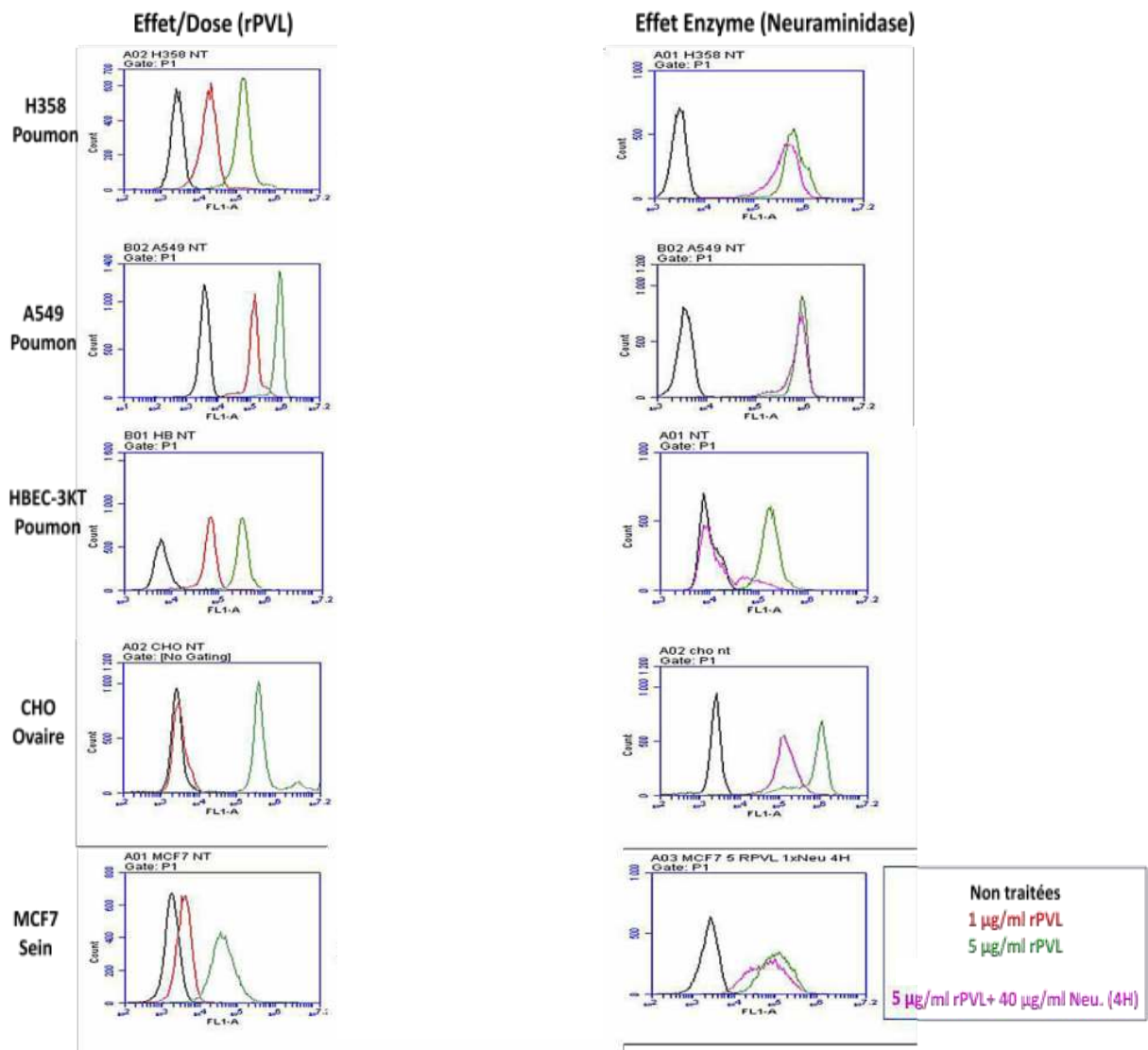


Figure 18. Analyse par cytométrie de flux (FACS) de l'action de la lectine rPVL à différentes concentrations (1 et 5 µg/ml) sur différentes lignées cellulaires : H358, A549, HBEC-3KT, CHO et MCF7, en présence de l'enzyme Neuraminidase (40 µg/ml).

I.1.4. Etude comparative sur l'action de deux lectines rPVL et PA-IL sur différentes lignées cellulaires

Afin de mettre en évidence la faible galactosylation des glycanes sur les surfaces des cellules cancéreuses dans les tumeurs humaines, une étude est faite sur l'action de PA-IL sur différentes lignées tumorales telles que : H358, MCF7 et Colo 829.

Le rapport « Dose/Réponse » étudié avec deux concentrations de PA-IL-alexa488 (5 et 10 µg/ml) est nulle vu que les pics sont superposables avec un faible marquage même à 10 µg/ml de PA-IL ce qui confirme la faible présentation des terminaisons galactosiques à la surface des cellules cancéreuses. Les résultats sont représentés dans la **Figure 19**.

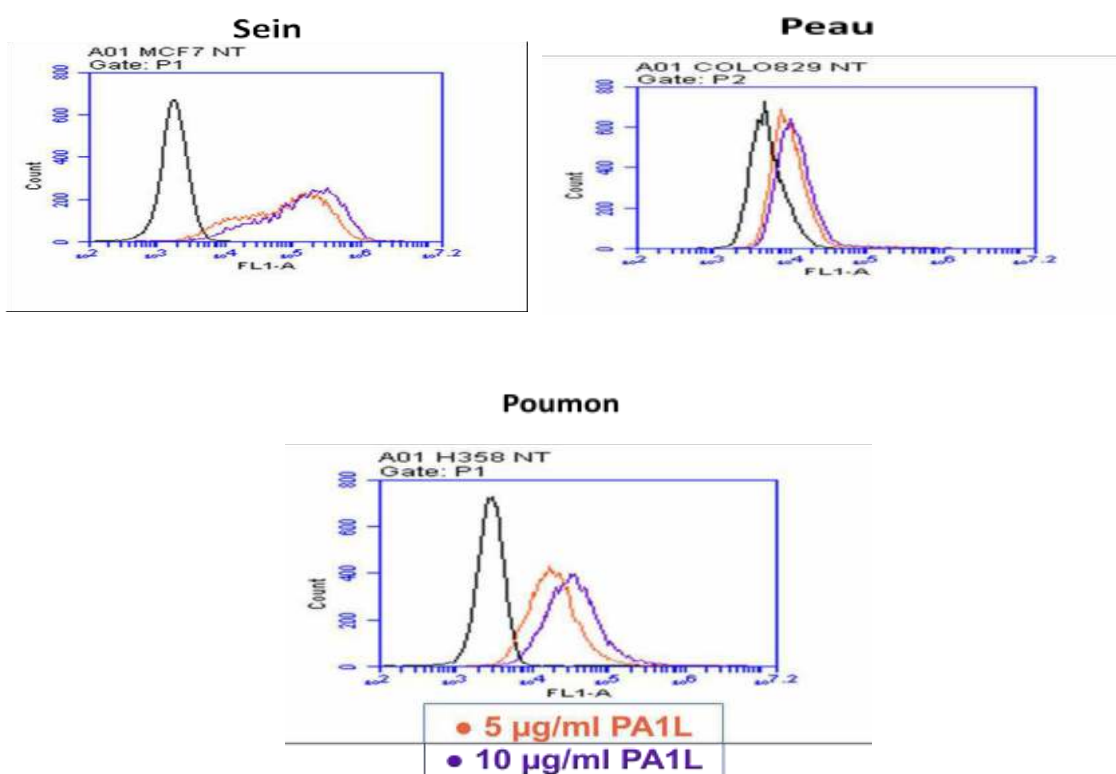


Figure 19. Marquage par PA-IL des lignées cellulaires tumorales. Histogrammes de cytométrie en flux montrent PA-IL-Alexa488 se liant à une lignée cellulaire tumorale pulmonaire (H358), à une lignée cellulaire tumorale du sein (MCF7) et à une lignée cellulaire tumorale de la peau (Colo829). L'axe des x indique l'intensité de la fluorescence. L'axe y indique le nombre de cellules.

La **Figure 20** montre qu'en présence de 100 mM de Gal, la liaison des PA-IL aux lignées cellulaires est fortement diminuée. Sachant que la lectine PA-IL est spécifique au D-galactose avec une constante d'association (K_a) de $3,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ [64], on constate que la présence de l'inhibiteur Gal déplace le pic de marquage par PA-IL, vers l'extinction, ce qui confirme la faible galactosylation des glycanes sur les surfaces des cellules cancéreuses.

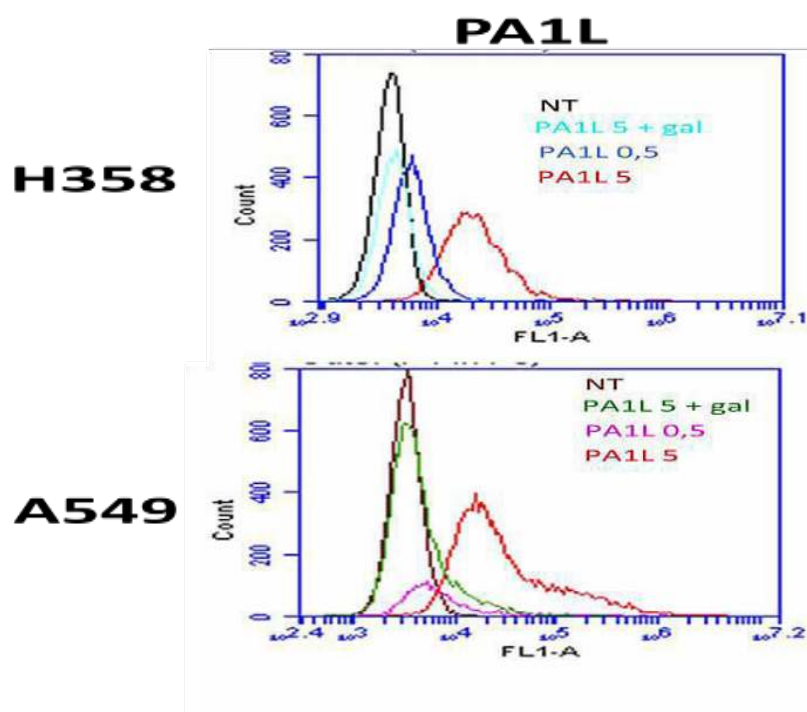


Figure 20. Marquage par PA-IL des lignées cellulaires tumorales. Histogrammes de cytométrie en flux montrent PA-IL-Alexa 488 se liant à deux lignées cellulaires tumorales pulmonaires (H358 et A549). L'axe des x indique l'intensité de la fluorescence, en présence de 100 mM de Gal. L'axe y indique le nombre de cellules.

Analyse effectuée sur un cytomètre de débit C6 Accuri à l'aide du logiciel CFlow-plus (BD Biosciences).

I.2. Immunofluorescence (IF)

I.2.1. Etude du rapport « dose/réponse » de l'action de la lectine rPVL sur différentes lignées cellulaires

Les résultats obtenus par immunofluorescence, avec du rPVL à différentes concentrations (2, 6 et 10 $\mu\text{g/ml}$) exécuté sur différentes lignées cellulaires de cancer broncho-pulmonaire, montrent des relations « dose/réponse » différentes avec un maximum observé avec la lignée cellulaire d'adénocarcinome bronchique humain H358 (**Figure 21**), ayant la particularité de présenter un motif glycanique riche en GlcNAc, en position terminale (**Figure 15**) [62] et avec une claire localisation membranaire (**Figure 22**).

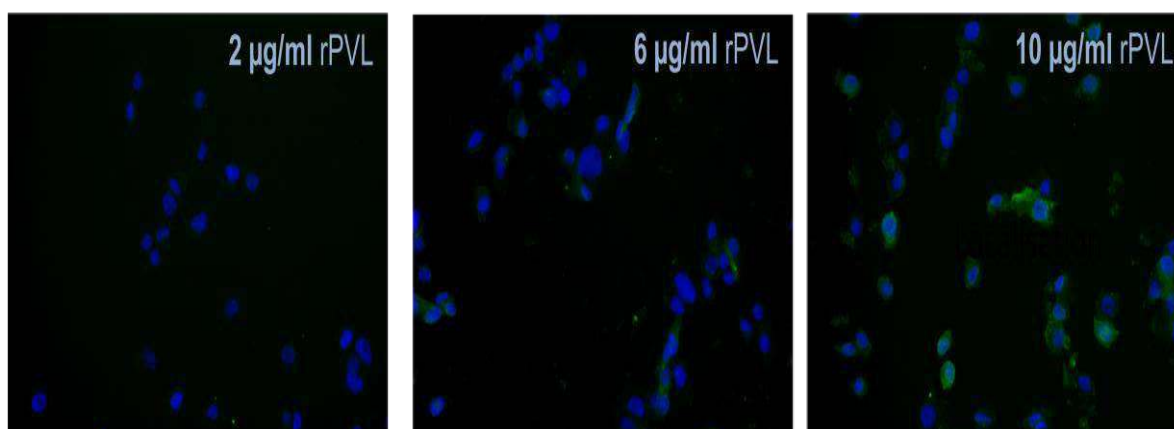


Figure 21. Marquage par immunofluorescence de la lignée cellulaire H358 avec différentes concentrations de la lectine rPVL-Alexa488 (2, 6 et 10 $\mu\text{g/ml}$). Examen à l'aide d'un microscope BX41 équipé d'un système de caméra numérique DP-70 et d'un microscope Pseudo-confocal ApoTome équipé de AxioCam GRM (N/B). Echelle: x5

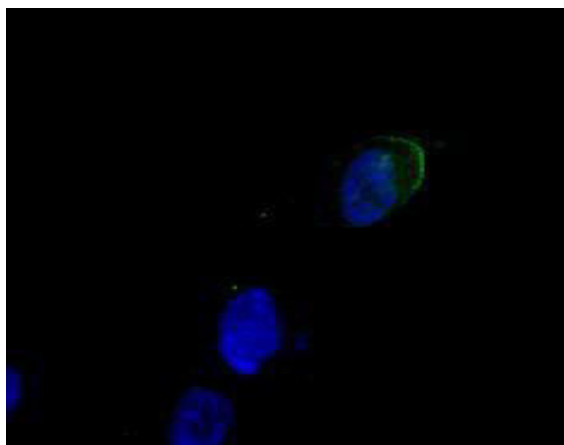


Figure 22. Mise en évidence de la location membranaire du marquage par immunofluorescence de la lignée cellulaire H358 avec la lectine rPVL-Alexa488 (5 $\mu\text{g/ml}$). Examen à l'aide d'un microscope BX41 équipé d'un système de caméra numérique DP-70 et d'un microscope Pseudo-confocal ApoTome équipé de AxioCam GRM (N/B). Echelle : x20

I.2.2. Etude de l'effet de l'inhibiteur sur l'action de la lectine rPVL sur différentes lignées cellulaires

Afin de mettre en évidence la spécificité du marquage de rPVL pour GlcNAc par rapport à l'acide sialique, les lignées cellulaires sont mises en présence de l'inhibiteur de rPVL: GlcNAc. Le marquage de la lignée cellulaire H358 par rPVL-Alexa488 (5 $\mu\text{g/ml}$), en présence et en absence de GlcNAc (100 mM) montre une extinction du marquage au niveau des cellules cancéreuses, en présence du GlcNAc (**Figure 23**).

Kochibe N. et Matta K.L. (1989) [65] ont observé que La lectine PVL reconnaît principalement les résidus de GlcNAc et, plus précisément, le GlcNAc terminal non-réduit, mais pas le GalNAc ou le NeuAc, basé sur le comportement de divers types de complexes et d'oligosaccharides du lait maternel sur colonne de PVL.

Les travaux de **Machon O. et al. (2017)** [66] ont confirmé que rPVL a une forte spécificité pour le GlcNAc, avec un effet de multivalence évident entraînant une très forte affinité pour les protéines ou les surfaces avec plusieurs GlcNAc. La liaison aux oligosaccharides sialylés est 10 fois plus faible mais devrait être prise en compte lors de l'analyse des glycoprotéines de surface.

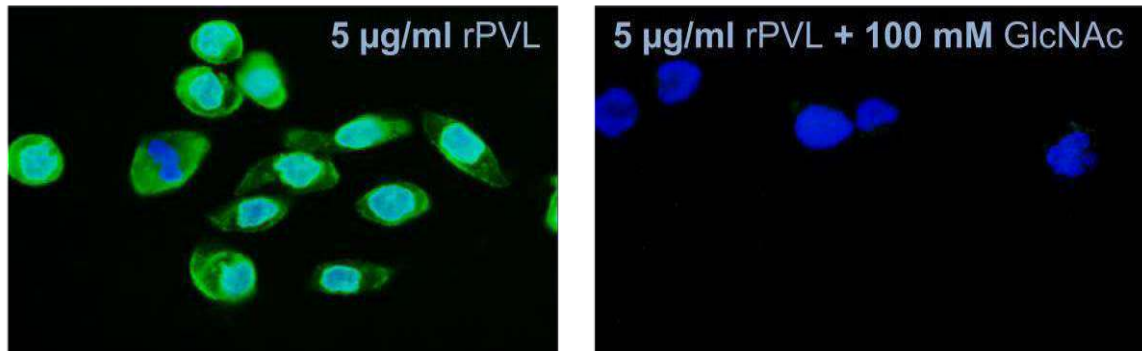


Figure 23. Marquage par immunofluorescence de la lignée cellulaire H358 avec de la lectine rPVL-Alexa488 (5 µg/ml), en présence de son inhibiteur GlcNAc (100 mM). Examen à l'aide d'un microscope BX41 équipé d'un système de caméra numérique DP-70 et d'un microscope Pseudo-confocal ApoTome équipé de AxioCam GRM (N/B). Echelle: x20

I.2.3. Etude comparative entre l'action de deux lectines rPVL et PA-IL sur différentes lignées cellulaires

La distribution des résidus GlcNAc et Gal terminaux à la surface des cellules cancéreuses est étudié en utilisant un marquage au rPVL-Alexa488 et au PA-IL-Alexa488, respectivement, de différentes lignées cellulaires du cancer broncho-pulmonaire telle que H358.

Les résultats montrent un marquage de forte intensité avec le rPVL et l'absence de marquage avec le PA-IL (**Figure 24**). Cela se traduit par le fait que les antigènes GlcNAc terminaux se sont révélés très rares sur les surfaces cellulaires humaines. Ils ont été observés comme étant associés aux surfaces des cellules tumorales.

Une galactosylation réduite des glycanes peut conduire à une exposition des antigènes GlcNAc terminaux sur les surfaces des cellules cancéreuses dans les tumeurs humaines, et que l'accumulation de ces glycanes peut devenir un déterminant majeur dans le glycome tumoral. [51]

L'inhibition de l'expression de la β 1,4-galactosyltransférase I (β 1,4-GalT I) qui transfère le galactose à la N-acétylglucosamine terminale du N-glycane de type complexe et contribue à la prolifération, à la différenciation et à la migration des cellules. L'expression de β 1,4-GalT I est régulée par les facteurs de transcription E2F1 [29] qui est surexprimé dans 92% des carcinomes pulmonaires à petites cellules (SCLC) et dans 50% des carcinomes neuroendocriniens à grandes cellules (LCNEC) alors qu'il est indétectable dans 90% des cas d'adénocarcinome et 82% du carcinome épidermoïde par rapport au poumon normal correspondant. [28]

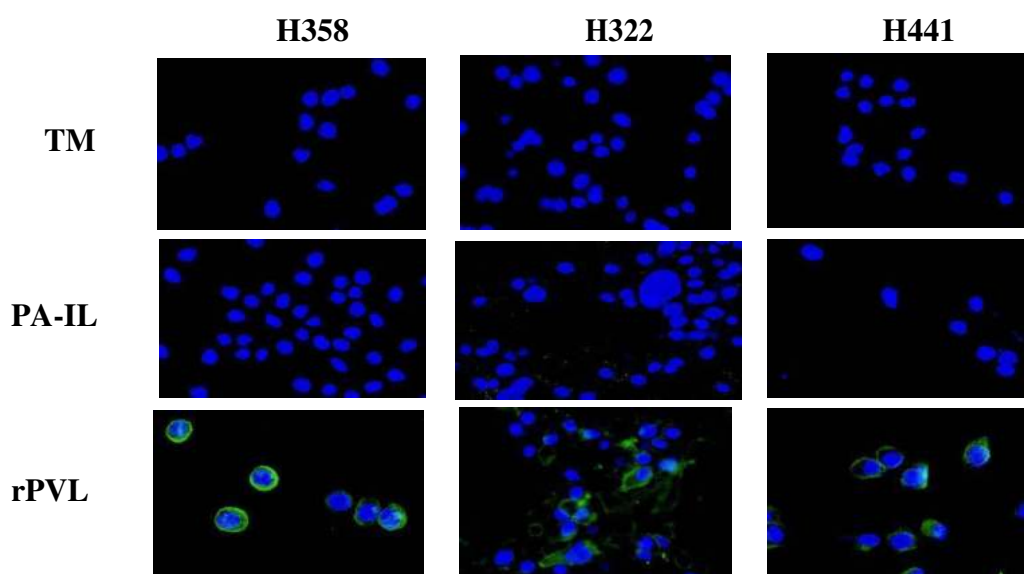


Figure 24. Marquage par immunofluorescence de différentes lignées cellulaires H358, H322 et H441 avec de la lectine rPVL-Alexa488 (5 μ g/ml) et de la lectine PA-IL-Alexa488 (5 μ g/ml). Examen à l'aide d'un microscope BX41 équipé d'un système de caméra numérique DP-70 et d'un microscope Pseudo-confocal ApoTome équipé de AxioCam GRM (N/B). Echelle: x10

Une superposition des résultats obtenus par FACS et par IF confirme que :

- Le marquage par PA-IL est faible comparé à celui par rPVL pour toutes les lignées cellulaires tumorales pulmonaires, ce qui confirme une galactosylation réduite des glycanes, qui conduit à une exposition des antigènes GlcNAc terminaux sur les surfaces des cellules cancéreuses dans les tumeurs humaines.
- La lignée cellulaire H358 présente le plus fort marquage par rPVL, ce qui confirme sa particularité de présenter un motif glycanique riche en GlcNAc, en position terminale, comparée aux autres lignées cellulaires tumorales pulmonaires. (**Figure 25**)

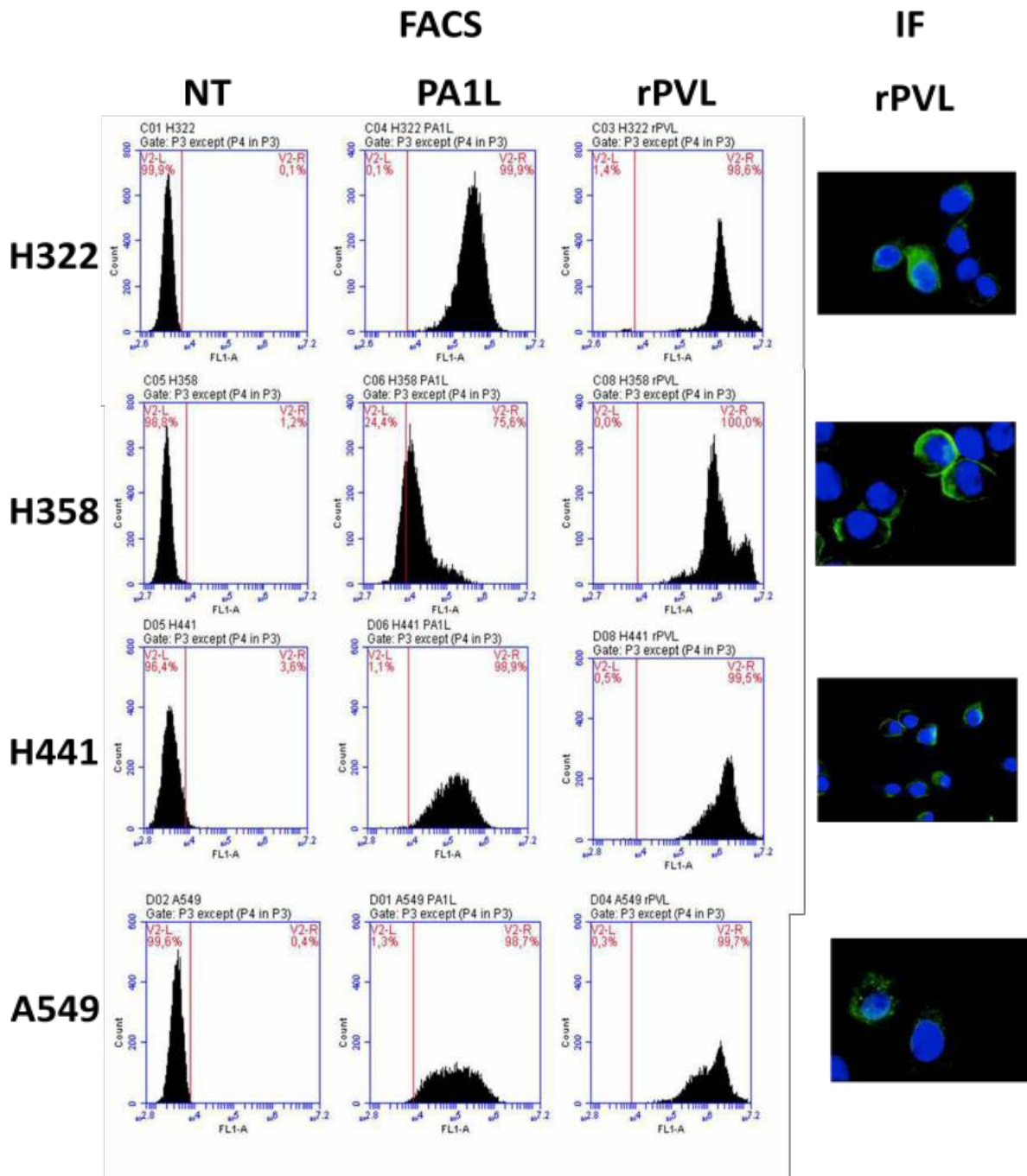


Figure 25. Analyse par cytométrie de flux (FACS) de l'action de la lectine rPVL et de la lectine PA-IL à 5 µg/ml sur différentes lignées cellulaires : H358, H322, H441 et A549 et comparaison avec le marquage par immunofluorescence (IF).

II. Au niveau tissulaire

II.1. Immunohistochimie (IHC)

II.1.1. Analyse par coloration HES de blocs paraffinés de biopsies humaines de poumon provenant du service d'anatomopathologie du CHU Benflis Touhami (Batna - Algérie)

Le marquage HE (Hématoxyline Eosine) de certaines coupes de blocs paraffinés, présentant des tissus sains de poumon et différents types de cancer du poumon, d'une population Algérienne, provenant du service d'anatomopathologie du CHU Benflis Touhami (Batna - Algérie), montrent la détérioration des blocs suite à des traitements préalables (Figure 26).

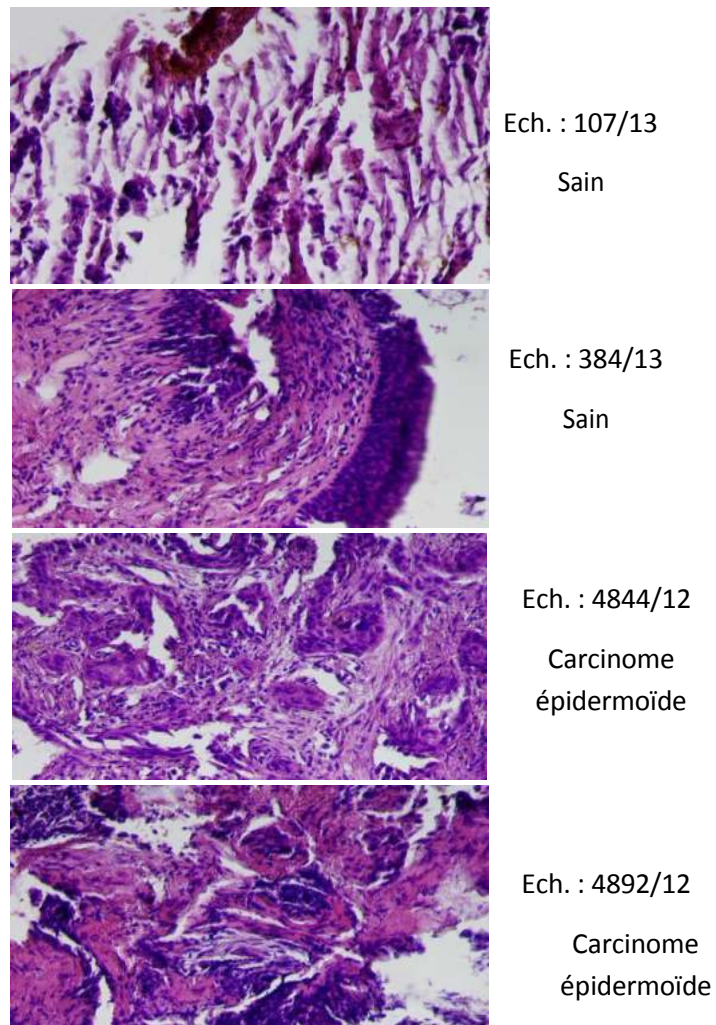


Figure 26. Coloration HES de blocs paraffinés de biopsies humaines du poumon sain et présentant différents sous-types de cancer broncho-pulmonaire. Examen à l'aide d'un microscope BX41. Echelle : x40

II.1.2. Analyse par immunohistochimie (IHC) de l'action de la lectine rPVL sur différents sous-types de cancer broncho-pulmonaire

Le marquage des tissus sains par la lectine rPVL biotinylée montre une absence ou un faible marquage.

On a analysé la coloration de divers types de cancers du poumon avec rPVL. Un clair marquage a été observé sur une proportion de carcinomes épidermoïdes et d'adénocarcinomes du poumon.

La coloration des cellules cancéreuses avec rPVL était systématiquement plus élevée que celle des cellules environnantes normales dans chaque échantillon de tumeur positive (**Figure 27**).

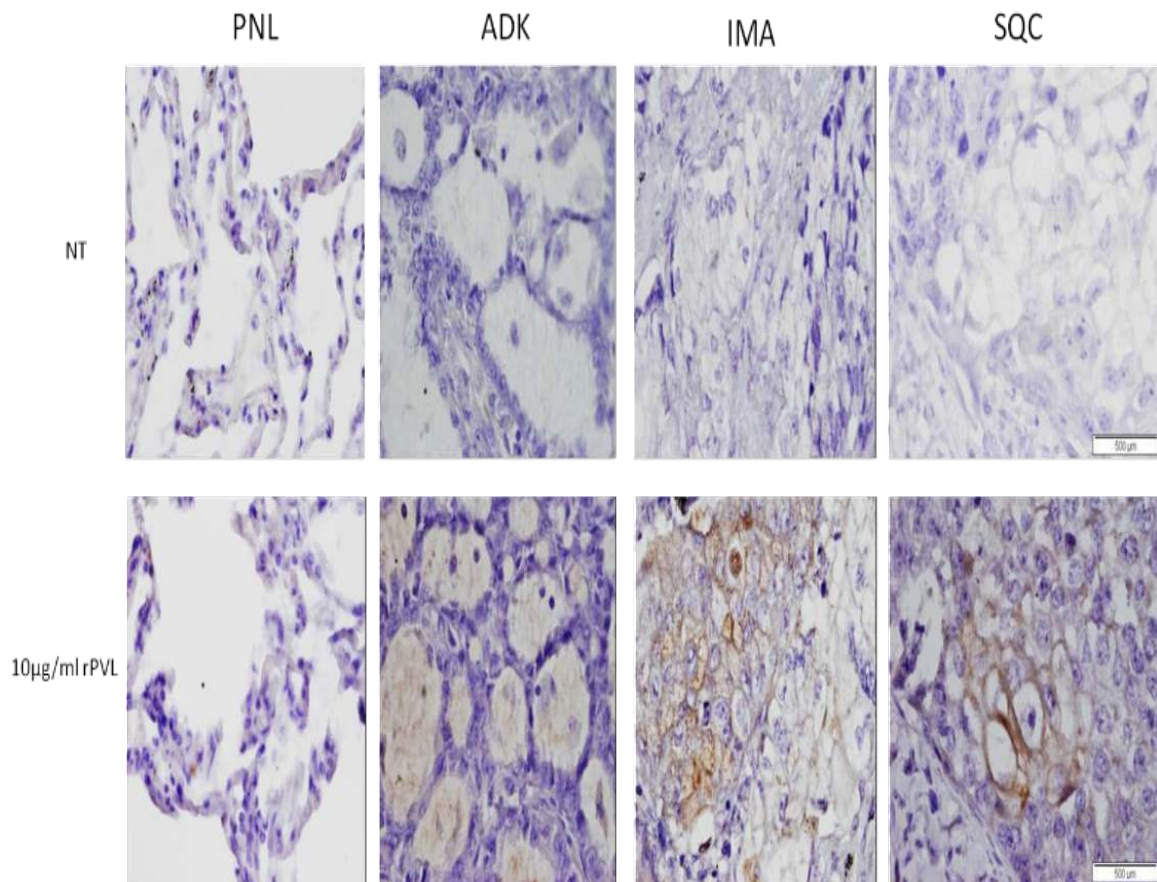


Figure 27. Marquage par immunohistochimie (IHC) avec la lectine rPVL biotinylée (10 µg/ml) de blocs paraffinés de biopsies humaines du poumon sain (PNL) et présentant différents sous-types de cancer broncho-pulmonaire (ADK, IMA, SQC). Examen à l'aide d'un microscope BX41. Echelle : x20

Ce qui nous a orienté vers l'utilisation de blocs paraffinés et congelés :

- Département d'anatomie et de cytologie pathologique du CHU de Grenoble.
- Plateforme d'Imagerie Optique du Petit Animal (OPTIMAL) de l'Institut pour l'Avancée des Biosciences (IAB) de Grenoble.

Afin de mettre en évidence la spécificité du marquage, les tissus sont mis en présence de GlcNAc à 100 mM comme inhibiteur de rPVL (**Annexe 3**).

Les résultats obtenus suggèrent que la lectine rPVL permet de distinguer les types de carcinomes pulmonaires (**Figure 28**). On observe un gradient décroissant de la coloration par la lectine rPVL biotinylée, allant de l'adénocarcinome (ADK) suivi du carcinome épidermoïde (SQC) et enfin l'adénocarcinome mucineux (IMA). (**Figure 29**)

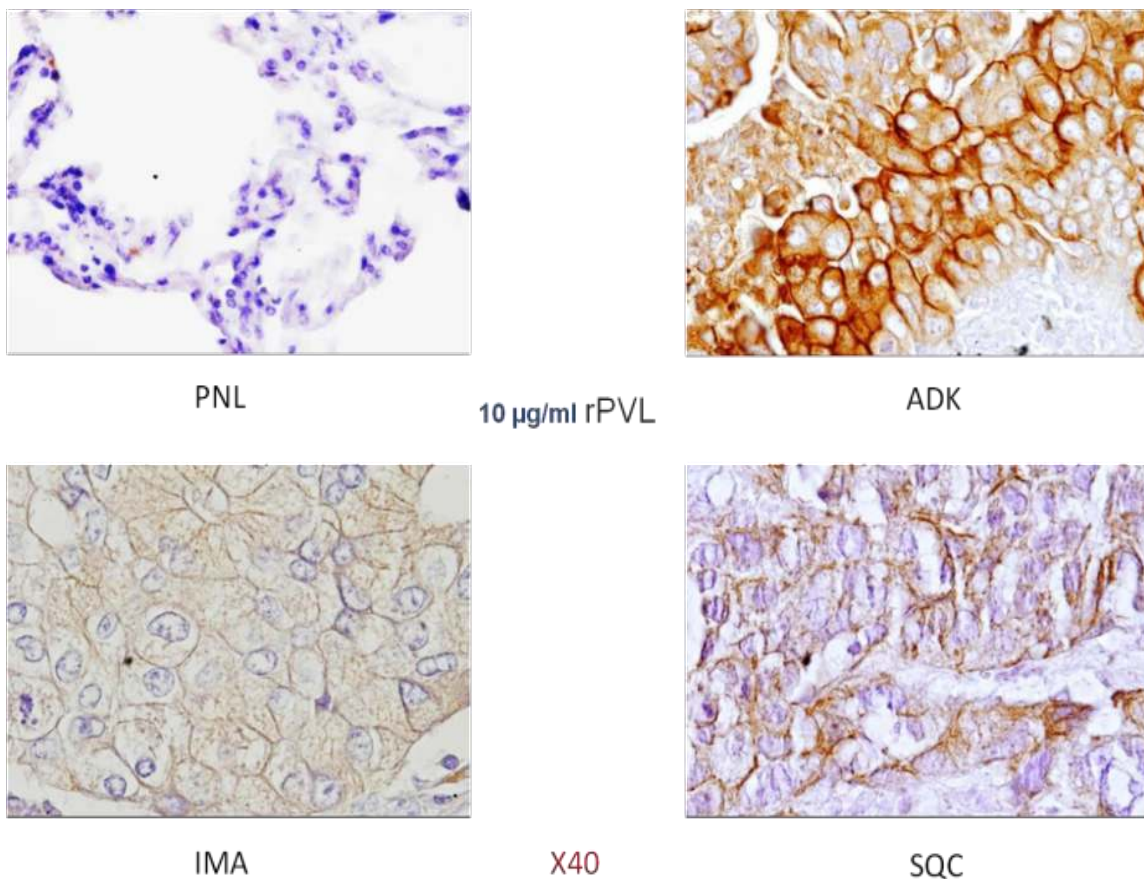


Figure 28. Marquage par immunohistochimie (IHC) avec la lectine rPVL biotinylée (10 µg/ml) de blocs paraffinés de biopsies humaines du poumon sain (PNL) et présentant différents sous-types de cancer broncho-pulmonaire (ADK, IMA, SQC). Examen à l'aide d'un microscope BX41. Echelle : x40

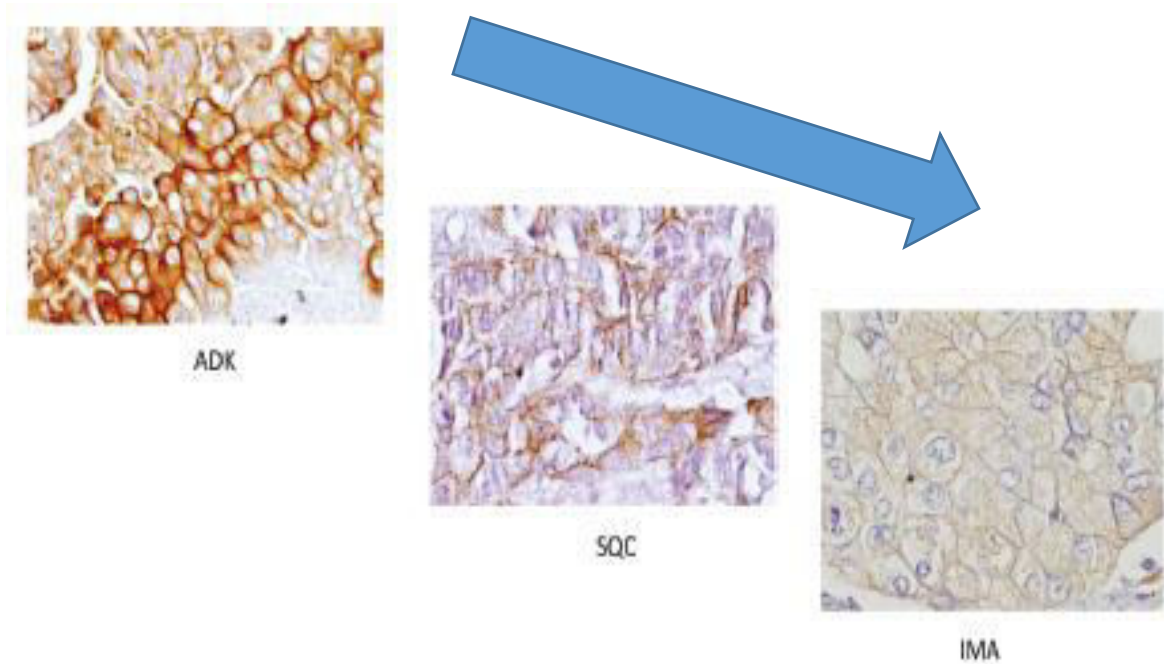


Figure 29. Gradient décroissant de la coloration par la lectine rPVL biotinylée, selon le sous-type de cancer broncho-pulmonaire

Une étude concomitante conforte ces résultats. Un score de 0 à 3 a été attribué à chaque tumeur, basé sur le pourcentage de cellules tumorales colorées et l'intensité de la couleur et la distribution du niveau de coloration selon les sous-types histologiques de la tumeur, a été représenté sous forme d'histogramme. **(Figure 30)** [53]

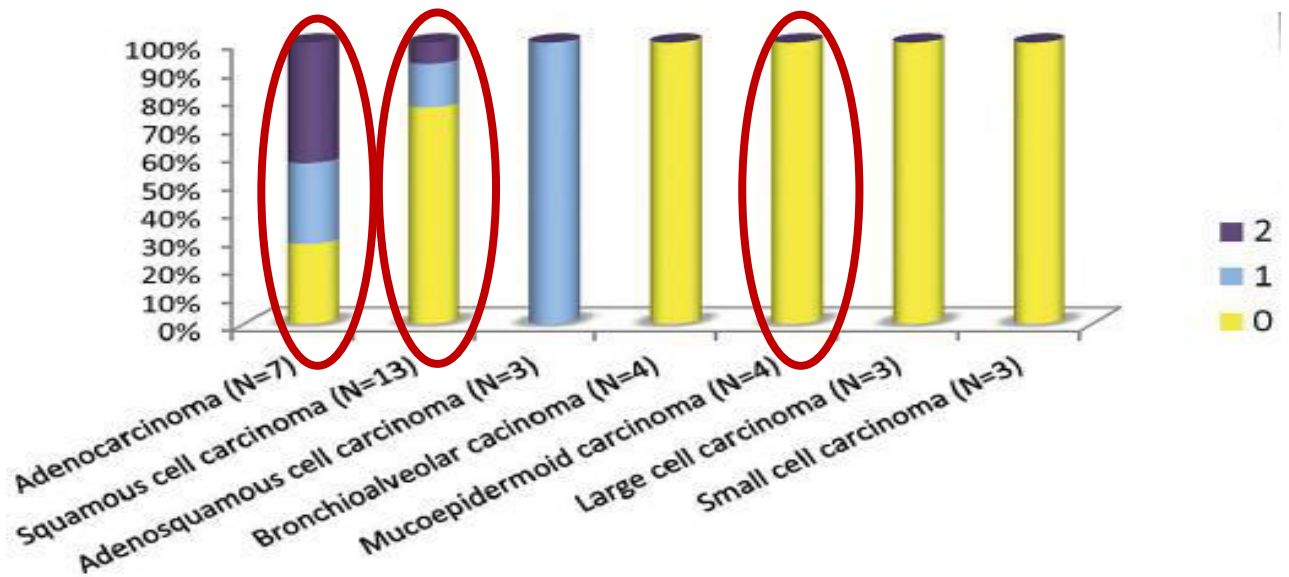


Figure 30. Score de 0 à 3 attribué à chaque tumeur, basé sur le pourcentage de cellules tumorales colorées et l'intensité de la couleur et la distribution du niveau de coloration selon les sous-types histologiques de la tumeur, a été représenté sous forme d'histogramme. [53]

II.1.3. Optimisation des conditions de marquage par IHC avec la lectine rPVL biotinylée

II.1.3.1. Choix du mode de saturation

Afin d'éliminer le marquage non-spécifique par la lectine rPVL biotinylée, on a testé deux types de solutions de saturation, une solution de BSA (0,5%) et une solution Carbo-free, exempt de glucides. Paradoxalement, on observe un marquage non-spécifique avec la solution de Carbo-free (**Figure 31**).

Plusieurs des lectines testées ont interagi avec la solution de saturation Carbo-Free, notamment l'AIA, le MAL II, le SNA, le DSL, le WGA et le SBA. Étant donné que cette solution de saturation ne contient pas de glucides, les interactions doivent être dues aux interactions « protéine-protéine » [67]. Le choix est donc fait sur la solution de BSA (5%).

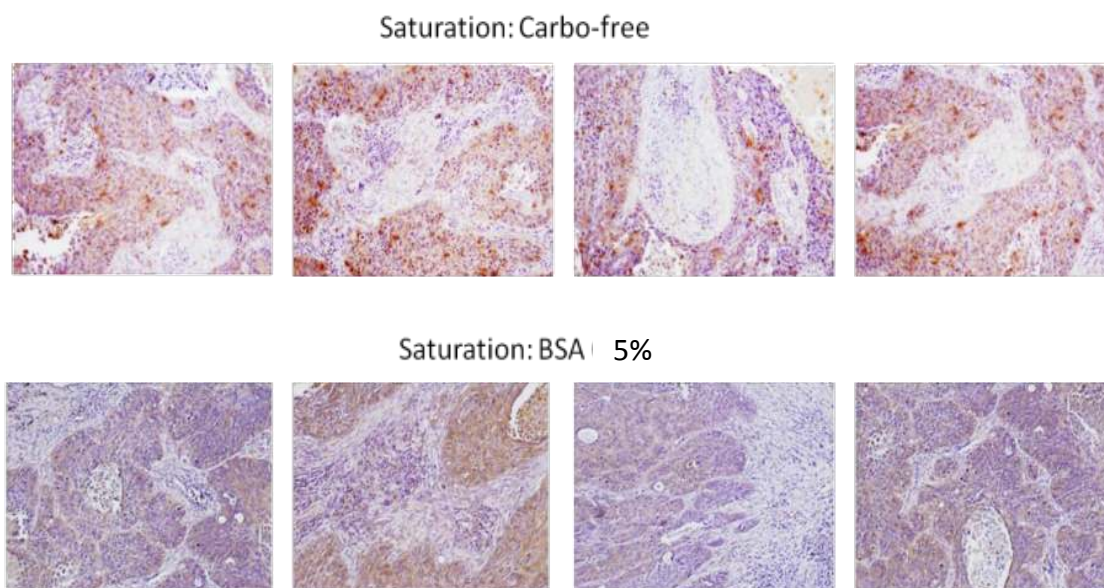


Figure 31. Comparaison entre le mode de saturation par une solution de BSA (5 %) et par une solution de Carbo-free du marquage par immunohistochimie (IHC) avec la lectine rPVL biotinylée (5 µg/ml) du bloc paraffiné d'une biopsie humaine présentant un sous-type de cancer broncho-pulmonaire (SQC). Examen à l'aide d'un microscope BX41. Echelle : x10

II.1.3.2. Choix du lot de rPVL biotinylé

Ayant deux sources de rPVL : Laboratoire du CERMAV de Grenoble et Laboratoire du CNRS de Nantes, on a testé le marquage par immunohistochimie avec les deux lectines.

Celle du CERMAV s'avère la plus adéquate puisqu'on remarque un marquage non-spécifique avec celle du laboratoire de Nantes. Les tests ont été effectués avec une concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$ de rPVL biotinylé sur des sections de carcinome épidermoïde du pumon (SQC) (**Figure 32**).

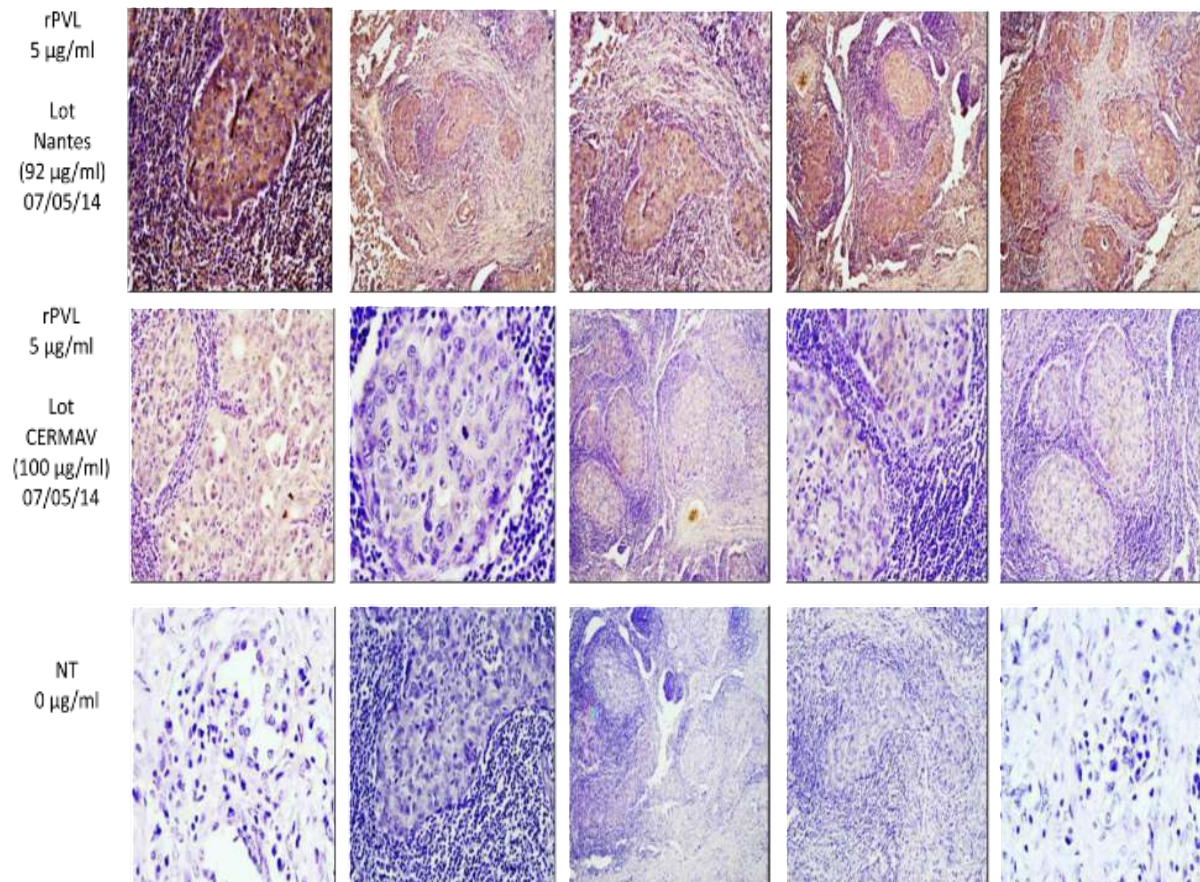


Figure 32. Comparaison entre deux lots différents de rPVL (CERMAV, Nantes) sur le marquage par immunohistochimie (IHC) avec la lectine rPVL biotinylée (5 $\mu\text{g/ml}$) du bloc paraffiné d'une biopsie humaine présentant un sous-type de cancer broncho-pulmonaire (SQC). Examen à l'aide d'un microscope BX41. Echelle : x10

II.1.3.3. Choix du protocole d'immunohistochimie par les lectines

En comparaison avec le protocole d'immunohistochimie par la lectine WJA appliqué sur des sections de tissus normaux et tumoraux de poumon [68]. Quelques modifications ont été faites après avoir testé différentes conditions, telles que : le choix de la solution de saturation, le choix du mode de révélation. Le protocole appliqué est résumé dans la partie « matériel et méthodes ».

II.1.4. Conditions et résultats optimales de marquage par rPVL biotinylé

L'application du protocole optimisé d'immunohistochimie avec 5 µg/ml de lectine rPVL biotinylée sur des sections de tissus sains et d'adénocarcinome du poumon, montre un marquage clair des zones présentant des cellules cancéreuses, systématiquement, plus élevée que celle des cellules environnantes normales, avec une claire délimitation entre les deux zones (**Figure 33**).

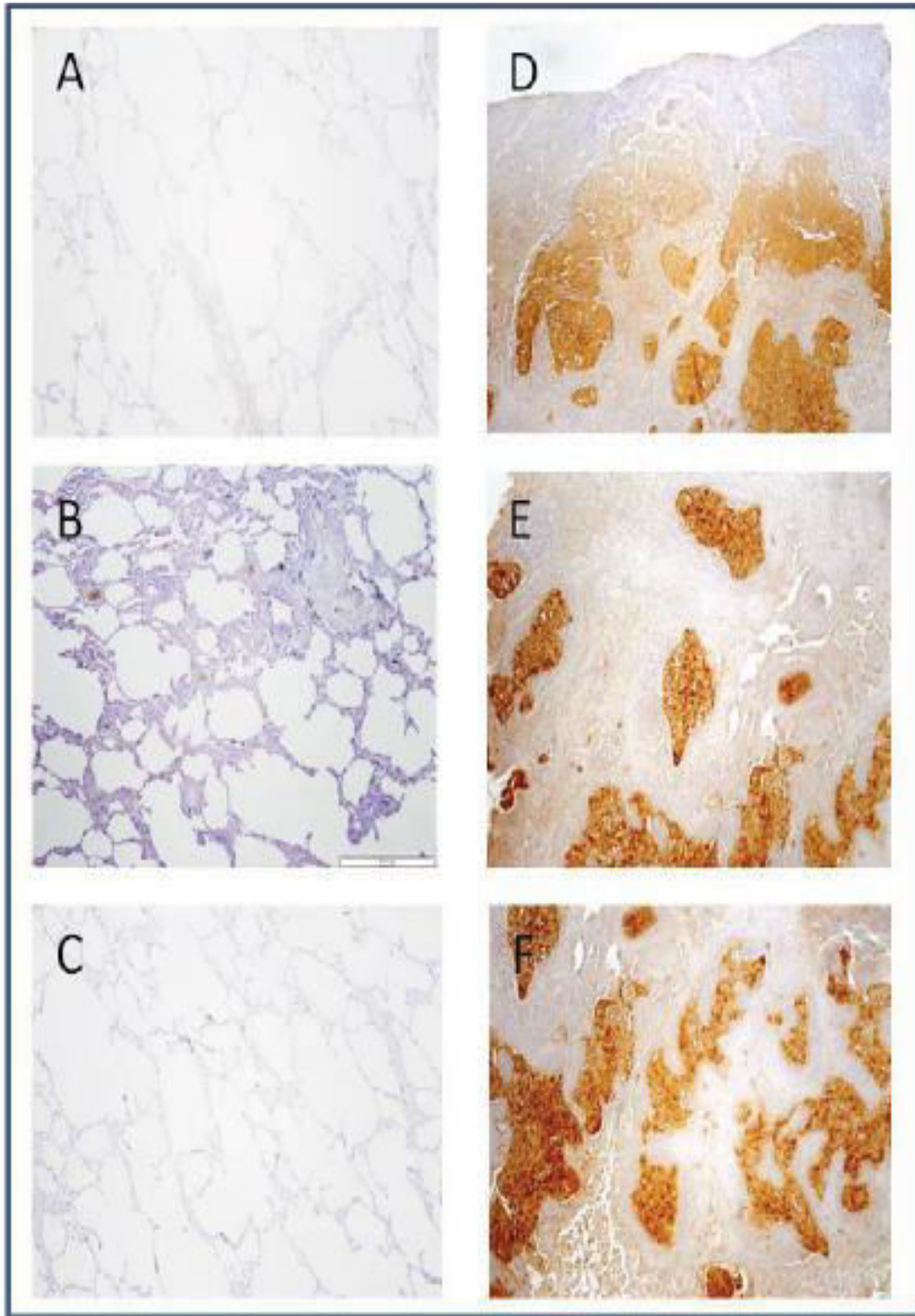


Figure 33. Marquage par immunohistochimie (IHC) avec la lectine rPVL biotinylée (5 µg/ml) du bloc paraffiné d'une biopsie humaine d'un poumon sain (A, B, C) et présentant un sous-type de cancer broncho-pulmonaire (ADK) (D, E, F). Examen à l'aide d'un microscope BX41. Echelle : x10

CONCLUSION

Une forme recombinée de PVL a été produite et caractérisée, et sa spécificité de liaison est différente de celle d'autres lectines liant GlcNAc, selon les modèles de spécificité disponibles auprès du Consortium pour les glycomiques fonctionnelles. L'agglutinine de germe de blé (WGA) et la lectine de la tomate (SLT) reconnaissent la GlcNAc terminale, mais se lient aussi au GlcNAc interne et aux chitooligosaccharides. Les lectines légumineuses d'*Ulex europaeus* (UEA-II) et *Griffonia (Bandereia) simplicifolia* (GSL-II) ont une spécificité pour les N-glycanes de type polylactosamine, tronqués seulement. F17G, une lectine présente sur les pili de certaines souches d'*E. coli*, a également montré, récemment, qu'elle reconnaissait spécifiquement les motifs GlcNAc β 1-3Gal terminaux, bien qu'avec une affinité peu marquée.

Le présent travail ouvre la voie à d'autres investigations. Bien que chacun des six sites de liaison de la PVL soit hautement spécifique de la GlcNAc terminale, la lectine multivalente présente une avidité de marquage pour les surfaces décorées de Neu5Ac qui peut entraîner un faible marquage non-spécifique de certains tissus. Puisqu'on vise à cibler spécifiquement les résidus terminés par du GlcNAc, on a démontré que l'utilisation du traitement par la Neuraminidase et/ou la compétition avec de faibles quantités de GlcNAc supprimaient la liaison non-spécifique. Néanmoins, la connaissance structurelle des sites de liaison devrait permettre l'ingénierie de lectines modifiées avec une sélectivité plus forte.

En raison de sa capacité à se lier à la GlcNAc terminale non-réductrice, rPVL est un bon marqueur. Il a été démontré que les altérations de la glycosylation de surface sur les cellules cancéreuses sont corrélées aux modifications des niveaux d'expression de la glycosyltransférase. Des changements de glycosylation spécifiques peuvent donc se produire dans ces cellules et d'autres travaux sont nécessaires pour étudier les mécanismes sous-jacents de tels changements de glycosylation associés au cancer, tel que l'implication de E2F1 dans le cancer broncho-pulmonaire. Cependant, rPVL pourrait également avoir des applications diagnostiques pour d'autres maladies. Par exemple, une démence âgée, distincte de la maladie d'Alzheimer, est liée à la présence d'un agalacto-N-glycane sur une isoforme de la transferrine.

De plus, un galacto-IgG est présent dans le sérum des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et a été précédemment détecté avec du PVL purifié à partir de champignons ou par des tests de glycosyltransférase. Certains virus à réplication rapide tels que le virus Ebola et le coronavirus du SRAS ont également démontré qu'ils portaient des N-glycanes tronqués avec des résidus GlcNAc exposés. Il a été précédemment proposé que les N-glycanes tronqués observés sur le virus Ebola pourraient être dus à leur rapide réplication. Une telle hypothèse pourrait également être synonyme de cellules cancéreuses anarchiquement développées, pour lesquelles la glycosylation pourrait être mal traitée. Cependant, on a pu démontrer que les altérations de la glycosylation de surface sur les cellules cancéreuses sont corrélées aux modifications des niveaux d'expression de la glycosyltransférase.

Comme démontré dans le présent travail, la coloration histochimique par la lectine recombinée rPVL pourrait être un outil puissant afin d'aider à l'analyse pathologique des cancers humains du poumon non à petites cellules, ainsi que des carcinomes du sein. Cependant, cela nécessitera une validation supplémentaire sur des cohortes plus importantes de patients. Plus particulièrement, une analyse à plus grande échelle permettrait d'établir une corrélation avec le pronostic dans différents sous-groupes de tumeurs. D'autres lectines se sont révélées intéressantes, telles que la lectine de graines de *Wisteria japonica* spécifique du motif GalNAc β 1-3/4GlcNAc qui se lie fortement au carcinome épidermoïde pulmonaire.

La lectine avec le profil de spécificité de rVPL est AAL-2 provenant du champignon *Agrocybe aegerita*. Cette protéine apparentée (60% d'homologie) a également été produite par recombinaison. Il a été démontré qu'elle peut se lier aux cellules de l'hépatome et induire l'apoptose, mais aucune information n'a été fournie sur le type de marquage. La lectine PVL présente une certaine réactivité croisée avec Neu5Ac en raison du mimétisme des deux monosaccharides (c'est pourquoi le WGA succinylé est préférentiellement utilisé pour le marquage GlcNAc). Néanmoins, en comparant les données de glycanes du Consortium pour les glycomiques fonctionnelles obtenues avec rPVL, il est clair que rPVL reconnaît presque exclusivement la GlcNAc non-réductrice terminale, tandis que WGA se lie à divers autres épitopes, y compris Neu5Ac terminal et GlcNAc interne.

Par conséquent, la poursuite du développement des réseaux de lectines est très prometteuse pour une meilleure détection des altérations du glycane à des fins diagnostiques.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. Wissler MP (2012). Bilan de l'analyse du statut mutationnel EGFR de 1000 patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires pris en charge par la plateforme d'oncologie moléculaire du CHU-CAV de Nancy. Thèse de docteur en médecine. Faculté de médecine de Nancy. Université de Lorraine.
2. Travis WD, Brambilla E, Van Schil P, et al (2011). Paradigm shifts in lung cancer as defined in the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification. *Eur Respir J*; 38: 239-43.
3. Mukhopadhyay S, Katzenstein AL (2011). Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens; utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, Napsin A, p63 and CK 5/6. *Am J Surg Pathol*; 35:15-25
4. Travis WD, Rekhtman N, Riley GJ et al (2010). Pathologic diagnosis of advanced lung cancer based on small biopsies and cytology: a paradigm shift. *J Thorac Oncol* ; 5: 411-4.
5. Nicholson AG, Gonzalez D, Shah P et al (2010). Refining the diagnosis and EGFR status of non-small cell lung carcinoma in biopsy and cytologic material, using a panel of mucin staining, TTF-1, cytokeratin 5/6 and p63 and EGFR mutation analysis. *J Thorac Oncol* ; 5: 436-41.
6. Lantuejoul S (2014). Classification anatomopathologique des cancers pulmonaires et de leurs pré-néoplasies. *Rev Mal Resp Actualités* ; 6: 346 – 57
7. FCTC (2003). Convention-cadre de l'OMS pour la lutte antitabac. OMS
8. GLOBOCAN (2018). Percentages of new cases by cancer type, region, and sex. WHO
9. Yoshizawa A, Sumiyoshi S, Sonobe M, Kobayashi M, Fujimoto M, Kawakami F et al (2013). Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *J Thorac Oncol* ; 8: 5261.
10. Spaggiari L et Scanagatta P (2007). Surgery of non-small lung cancer in the elderly. *Curr Opin Oncol*. 19: 84-91
11. Armstrong P, Congleton J, Fountain SW et al. (2001). BTS Guidelines: guidelines in the selection of patients with lung cancer for surgery. *Thorax* ; 56: 89-108
12. Moreau D (2006). Etude de nouvelles cibles moléculaires de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules pharmaco modulées par des substances originales naturelles et synthétiques. Thèse de doctorat. Université de Nantes, Faculté de pharmacie ; 321p.

13. Dautzenberg B, Riquet M et Trosini-Desert V (2005).Conférence d'experts sur le tabagisme péri-opératoire. Recommandation des experts. *Rev Mal Respir*; 22:1090-6
14. Himeji D, Horiuchi T, Tsukamoto H, Hayashi K, Watanabe T et Harada M (2002). Characterization of caspase-8L: a novel isoform of caspase-8 that behaves as an inhibitor of the caspase cascade. *Blood*; 99: 4070–4078.
15. Rocks N, Paulissen G, El Hour M, Quesada F, Crahay C, Gueders M, Foidart JM, Noel A et Cataldo D (2008). Emerging roles of ADAM and ADAM/TS metalloproteinases in cancer. *Biochimie*. 90: 369-379.
16. Massiello A et Chalfant CE (2006). SRp30a (ASF/SF2) regulates the alternative splicing of caspase-9 pre-mRNA and is required for ceramide-responsiveness. *J Lipid Res* ; 47: 892–897.
17. Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL, Wood RE, Obeid LM, Ogretmen B et al (2002). De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem*; 277: 12587–12595.
18. Nahle Z, Polakoff J, Davuluri RV, McCurrach ME, Jacobson MD, Narita M et al (2002). Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat Cell Biol*; 4: 859–864.
19. Haltiwanger RS (2002). Regulation of signal transduction pathways in development by glycosylation. *Current Opinion in Structural Biology*. 12: 593–598.
20. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA et al (1993). Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* ; 74: 597–608.
21. Stevens C, Smith L et La Thangue NB (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*; 5: 401–409.
22. Merdzhanova G (2009). Nouvelles fonctions de la protéine E2F1 dans le contrôle de l'épissage des transcrits: implication dans la carcinogénèse bronchique. Thèse de Doctorat en Biologie Cellulaire et moléculaire. Université Joseph Fourier. Grenoble I.
23. Weir BA, Woo MS, Getz G, et al (2007). Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*; 450: 893-8.
24. Girard N (2011). Tumeurs intra-thoraciques: mutations oncogéniques et problématiques cliniques: prédisposition génétique au cancer broncho-pulmonaire chez le patient non-fumeur: hétérogénéité inter- et intra-tumorale des cancers broncho-pulmonaires: étude

- génomique intégrative des tumeurs épithéliales du thymus. Thèse de Doctorat en Médecine humaine et pathologie. Université Claude Bernard - Lyon I.
25. Van den Broeck A (2009). Aspects épigénétiques des cancers bronchopulmonaires & implication de l'histone acetyltransferase tip60. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et intégrative. Université Joseph Fourier. Grenoble I.
 26. Edmond V (2010). Caractérisation de nouvelles fonctions biologiques et modifications post-traductionnelles du facteur d'épissage SC35 dans des modèles cellulaires de carcinomes pulmonaires. Thèse de Doctorat en Biologie du développement-Oncogène. Université Joseph Fourier. Grenoble.
 27. Gomes Ferreira I, Pucci M, Venturi G, Malagolini N, Chiricolo M et Dall'Olio F (2018). Glycosylation as a Main Regulator of Growth and Death Factor Receptors Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 580.
 28. Eymin B, Gazzeri S, Brambilla C et Brambilla E (2001). Distinct pattern of E2F1 expression in human lung tumours: E2F1 is upregulated in small cell lung carcinoma. *Oncogene*. 20: 1678–1687.
 29. Wei Y, Zhou F, Ge Y, Chen H, Cui C, Liu D, Yang Z, Wu G, Shen J, Gu J et Jiang J (2010). Regulation of the β 1,4-Galactosyltransferase I promoter by E2F1. *J. Biochem.* 148, 3: 263–271.
 30. Munkley J et Elliott DJ (2016). Hallmarks of glycosylation in cancer. *Oncotarget* 7(23).
 31. Pouilly S (2010). Synthèse et évaluation du métabolisme d'analogues immunogènes de la N-acétylgalactosamine (GalNAc). Thèse de Doctorat en Biochimie. Université d'Orléans.
 32. Monsigny M (1994). Les glycoprotéines et les lectines endogènes: Le yin-yang sucré. *médecine/sciences*. 1, 10: 9-11.
 33. Hakomori S (1985). Aberrant Glycosylation in Cancer Cell Membranes as Focused on Glycolipids: Overview and Perspectives. *Cancer Research*. 45: 2405-2414.
 34. Stowell SR, Ju T, Cummings RD (2015). Protein Glycosylation in Cancer. *Annu Rev Pathol.* 10: 473-510.
 35. Park JW, Kerbel RS, Kelloff GJ et al (2004). Rationale for biomarkers and surrogate endpoints in mechanism-driven oncology drug development. *Clin. Cancer Res.* 10 (11): 3885–3896.
 36. Wang PG et Yang S (2017) Method development of glycoprotein biomarkers for cancers. *Bioanalysis*. 9, 12: 903–906.

37. Ambrosi M, Cameron NR et Davis, BG (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Org. Biomol. Chem.*, 3: 1593-1608.
38. Kudelka MR, Ju T, Heimburg-Molinaro J, Cummings RD (2005). Simple Sugars to Complex Disease-Mucin-Type O-Glycans in Cancer. *Adv Cancer Res*; 126: 53–135.
39. Stowell SR, Ju T et Cummings RD (2015). Protein Glycosylation in Cancer. *Annu Rev Pathol*; 10: 473–510.
40. Alhadeff JA (1989). Malignant cell glycoproteins and glycolipids. *Crit Rev Oncol Hematol.* 9, 1: 37-107.
41. Ségala G (2012). *Cancer : les mécanismes biologiques*. Futura Sciences. France.
42. Peracaula R, Barrabés S, Sarrats A, Rudd PM, de Llorens R (2008). Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Disease Markers.* 25: 207-218.
43. Konopka JB (2012). *N-Acetylglucosamine Functions in Cell Signaling*. Scientifica. Vol. 2012. Article ID 489208, 15 pages
44. Naseem S, Parrino S, Beuten D et Konopka JB (2012). Novel roles for GlcNAc in cell signaling. *Communicative & Integrative Biology.* 52: 156-159.
45. Sohanpal BK, El-Labany S, Lahooti M, Plumbridge JA et Blomfield C (2004). Integrated regulatory responses of fimB to N-acetylneuraminic (sialic) acid and GlcNAc in *Escherichia coli* K-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 101, 46: 16322–16327.
46. Rivlin M et Navon G (2016). Glucosamine and N-acetyl glucosamine as new CEST MRI agents for molecular imaging of tumors. *Scientific Reports.* 6: 32-48.
47. Satomaa T, Heiskanen A, Leonardsson I, Angström J, Olonen A, Blomqvist M, Salovuori N, Haglund C, Teneberg S, Natunen J, Carpén O et Saarinen J (2009). Analysis of the Human Cancer Glycome Identifies a Novel Group of Tumor-Associated N-Acetylglucosamine Glycan Antigens. *Cancer Res.* 69, 14: 5811-9.
48. Varki A (2017). Biological roles of glycans. *Glycobiology.* 27, 1: 3-49.
49. Poiroux G (2011). *Evaluation du potentiel de lectines végétales dans le ciblage de médicaments anticancéreux: Application à la Photochimiothérapie*. Thèse de Doctorat en Biologie cellulaire et Biochimie. Université Toulouse III - Paul Sabatier.
50. Santos AFS, da Silva MDC, Napoleão TH, Paiva PMG, Correia MTS et Coelho LCBB (2014). Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. *Current Topics in Peptide & Protein Research.* 15: 41-62.

51. Dam TK et Brewer CF (2010). Chapter 5 - Multivalent Lectin-Carbohydrate Interactions: Energetics and Mechanisms of Binding. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. 63: 139-164.
52. Sabóia Aragão K (2008). Etudes structure-fonction de lectines (discI et discII) de *Dictyostelium discoideum*. Thèse de doctorat en biologie structurale et nanobiologie. Université Joseph Fourier-Grenoble I.
53. Audfray A, Beldjoudi MF, Breiman A, Hurbin A, Boos I, Unverzagt C, et al. (2015). A Recombinant Fungal Lectin for Labeling Truncated Glycans on Human Cancer Cells. *PLoS ONE*. 10 (6). 22p.
54. Machon O, Baldini SF, Ribeiro JP, Steenackers A, Varrot A, Lefebvre T et Imberty A. (2017). Recombinant fungal lectin as a new tool to investigate O-GlcNAcylation processes. *Glycobiology*. 27, 2: 123–128.
55. Olympus (2009). Manuel du microscope de fluorescence ‘Olympus BX41’. Japon
56. Biosciences (2012). Manuel du Cytomètre de flux BD Accuri™ C6. USA
57. André JM, Catala M, Morère JJ (2008). Histologie : les tissus. Cours (Niveau PAES). Université Pierre et Marie Curie (Paris)
58. Moriwaki K, Miyoshi E (2014). Basic procedures for lectin flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 1200:147-52.
59. Cioci G (2006). Etude structure-fonction de glycoconjugués et de lectines bactériennes et fongiques. Doctorat en Biologie structurale et fonctionnelle. Université Joseph Fourier (Grenoble I).
60. Clincke MF (2010). Influence des conditions de culture sur la quantité et la qualité de l’IFN γ recombinant produit par des cellules CHO au cours de procédés discontinus. Docteur des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Université de Technologie de Compiègne.
61. Gottlieb C, Baenziger J et Kornfeld S (1975). Deficient uridine diphosphate-N-acetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminyltransferase activity in a clone of Chinese hamster ovary cells with altered surface glycoproteins. *J Biol Chem*. 250(9):3303-9.
62. Hua S, Saunders M, Dimapasoc LM, Jeong SH, Kim BJ, Kim S, So M, Lee KS, Kim JH, Lam KS, Lebrilla CB et An HJ (2014). Differentiation of cancer cell origin and molecular subtype by plasma membrane N-glycan profiling. *Glycobiology*. 24, 13(2): 961-8.

63. Wearne KA, Winter HC, O'Shea K et Goldstein IJ (2006). Use of lectins for probing differentiated human embryonic stem cells for carbohydrates. *Glycobiology*. 16 (10): 981– 990.
64. Winzer K, Falconer C, Garber NC, Diggle SP, Camara M et Williams P (2000). The *Pseudomonas aeruginosa* Lectins PA-IL and PA-IIL Are Controlled by Quorum Sensing and by RpoS. *J Bacteriol*. 182(22): 6401–6411.
65. Kochibe, N et Khushi M (1989). Purification and properties of a N-acetylglucosamine specific lectin from *Psathyrella velutina* mushroom. *The Journal of biological chemistry*. 264: 173-7.
66. Machon O, Baldini SF, Ribeiro JP, Steenackers A, Varrot A, Lefebvre T et Imberty A (2017). Glycan Recognition Recombinant fungal lectin as a new tool to investigate O-GlcNAcylation processes. *Glycobiology*, 27 (2): 123–128
67. Thompson R, Creavin A, O'Connell M, O'Connor B et Clarke P (2011). Optimization of the enzyme-linked lectin assay for enhanced glycoprotein and glycoconjugate analysis. *Anal Biochem*. 413 (2): 114-22.
68. Soga K, Teruya F, Tateno H, Hirabayashi J et Yamamoto K (2013). Terminal N-Acetylgalactosamine-Specific Leguminous Lectin from *Wisteria japonica* as a Probe for Human Lung Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 8(12): e83886.

ANNEXES

ANNEXE

1

RPMI-1640

(Roswell Park Memorial Institute)

Media Lab Product #: 10-500

Vender: Gibco

Catalog #: 31800-105

Package Size: 1X50L

RPMI (Roswell Park Memorial Institute) Media 1640 are enriched formulations with extensive applications for mammalian cells. They were originally formulated for suspension cultures or monolayer cultures of human leukemia cells.

Description:

Powder, contains L-glutamine, but no sodium bicarbonate.

Media Lab adds:

Sodium bicarbonate (2.0 g/L)

Molarity:

D-glucose, 11.11mM

L-glutamine, 2.05 mM

Sodium bicarbonate, 24mM

Phenol red, 0.0133 mM

Storage:

2°C to 8°C

18 months shelf life

Liquid

Intended use(s):

in vitro diagnostic (IVD).

Media Formulation: See attached

Technical Resources - Media Formulations

31800 - RPMI 1640, powder

Catalog Number(s):

31800022 ,31800089 ,31800105

Components	Molecular Weight	Concentration (mg/L)	mM
Amino Acids			
Glycine	75	10	0.133
L-Arginine	174	200	1.15
L-Asparagine	132	50	0.379
L-Aspartic acid	133	20	0.15
L-Cystine 2HCl	313	65	0.208
L-Glutamic Acid	147	20	0.136
L-Glutamine	146	300	2.05
L-Histidine	155	15	0.0968
L-Hydroxyproline	131	20	0.153
L-Isoleucine	131	50	0.382
L-Leucine	131	50	0.382
L-Lysine hydrochloride	183	40	0.219
L-Methionine	149	15	0.101
L-Phenylalanine	165	15	0.0909
L-Proline	115	20	0.174
L-Serine	105	30	0.286
L-Threonine	119	20	0.168
L-Tryptophan	204	5	0.0245
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	261	29	0.111
L-Valine	117	20	0.171
Vitamins			
Biotin	244	0.2	0.00082
Choline chloride	140	3	0.0214
D-Calcium pantothenate	477	0.25	0.000524
Folic Acid	441	1	0.00227
Niacinamide	122	1	0.0082
Para-Aminobenzoic Acid	137	1	0.0073
Pyridoxine hydrochloride	206	1	0.00485
Riboflavin	376	0.2	0.000532

Thiamine hydrochloride	337	1	0.00297
Vitamin B12	1355	0.005	0.0000037
i-Inositol	180	35	0.194
Inorganic Salts			
Calcium nitrate (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236	100	0.424
Magnesium Sulfate (MgSO ₄ -7H ₂ O)	246	48.84	0.199
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5.33
Sodium Chloride (NaCl)	58	6000	103.45
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O)	268	800	2.99
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180	2000	11.11
Glutathione (reduced)	307	1	0.00326
Phenol Red	376.4	5	0.0133

Reference:

1. Moore, G.E., Gerner, R.E. and Franklin, H.A. (1967) A.M.A., 199, 519.

Keratinocyte-SFM (1X)

Description

Keratinocyte-SFM (serum-free medium) is optimized for the growth and maintenance of human keratinocytes and other types of epithelial cells without the need for a feeder layer of cells. Keratinocyte-SFM is a complete serum-free medium when supplemented with human recombinant Epidermal Growth Factor (rEGF) and Bovine Pituitary Extract (BPE) at the time of use. Both supplements, rEGF and BPE, are supplied in separate packaging with the basal medium. The complete medium may be used to cultivate human epidermal keratinocytes for studies involving dermal substitutes, *in vitro* toxicology, and gene therapy. This medium has been successfully used to cultivate cervical epithelial cells and is recommended for the culture of Human Corneal Epithelial Cells (HCECs). It may also be suitable as a medium for cultivating other epithelial cells, such as human bronchial epithelial cells, which have been shown to grow under serum-free conditions. Keratinocyte-SFM without calcium is available to allow researchers to adjust the Ca⁺⁺ concentration to meet the demands of their specific application.

Product	Catalog no.	Amount	Storage	Shelf Life*
Keratinocyte-SFM (1X), liquid	17005-042	1 Kit		
Contains:				
Keratinocyte-SFM	10724-011	1 × 500 mL	2°C to 8°C; Protect from light	12 months
Keratinocytes Supplements	37000-015	1 Kit	-20°C to -5°C	18 months
Contains:				
Bovine Pituitary Extract (BPE)	13028-014	1 × 25 mg	-20°C to -5°C	18 months
EGF, Human Recombinant	10450-013	1 × 2.5 µg	-20°C to -5°C	18 months
Keratinocyte-SFM (1X), liquid w/o CaCl ₂	37010-022	1 Kit		
Contains:				
Keratinocyte-SFM	10725-018	1 × 500 mL	2°C to 8°C; Protect from light	12 months
Keratinocytes Supplements	37000-015	1 Kit	-20°C to -5°C	18 months
Contains:				
Bovine Pituitary Extract (BPE)	13028-014	1 × 25 mg	-20°C to -5°C	18 months
EGF, Human Recombinant	10450-013	1 × 2.5 µg	-20°C to -5°C	18 months

* Shelf Life is determined from Date of Manufacture.

Product Use

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Important Information

Store the supplemented complete Keratinocyte-SFM Medium at 2°C to 8°C in the dark.

Safety Information

For every chemical, read the Safety Data Sheets (SDSs) and follow the handling instructions. Wear appropriate protective eyewear, clothing, and gloves.

Human origin materials are non-reactive (donor level) for anti-HIV 1 & 2, anti-HCV, and HB_sAg. Handle in accordance with established bio-safety practices.

Supplement Media

Keratinocyte-SFM requires aseptic supplementation with rEGF and BPE before use.

- Aseptically add BPE to Keratinocyte-SFM Basal Medium to a final concentration of 20-30 µg/mL. The concentration is listed on the BPE product label. **Note:** If preparing Keratinocyte-SFM for culture of HCECs, add the entire amount of BPE (25 mg) to 500 mL basal medium.
- Aseptically add rEGF (0.1–0.2 ng/mL) to 500 mL Keratinocyte-SFM with BPE immediately before use in cell culture. **Note:** If preparing Keratinocyte-SFM for culture of HCECs, add the entire amount of rEGF (2.5 µg) to 500 mL basal medium.
- Add antibiotics, if required. We recommend Gentamicin at 5 µg/mL.

Culture Conditions

Media: Complete Keratinocyte-SFM Medium

Cell Type: Human, epidermal keratinocytes, cervical epithelial cells, bronchial epithelial cells

Culture Type: Adherent

Recommended Culture Vessels: T-Flasks

Temperature Range: 36°C to 38°C

Incubator Atmosphere: Humidified atmosphere of 4–6% CO₂ in air. Ensure proper gas exchange and minimize exposure of cultures to light.

Cell Culture of Primary Human Keratinocytes

Prepare Human Foreskin tissue

- At circumcision, place foreskins into complete Keratinocyte-SFM containing 5 µg/mL Gentamicin. Store foreskin tissue at 2°C to 8°C until use.
Note: Human foreskins can be stored in complete Keratinocyte-SFM containing 5 µg/mL Gentamicin at 2°C to 8°C for approximately 5 days without significant loss of viable cell recovery.
- Rinse foreskins with DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) without calcium and magnesium containing 20 µg/mL Gentamicin for approximately 1 hour.
- Dissect foreskins into 2–4 pieces and transfer into a sterile 15-mL centrifuge tube.

Isolate Epidermal Keratinocytes

- Prepare Dispase solution (25 caseinolytic units per mL dispase, 5 µg/mL Gentamicin in DPBS).

- Submerge foreskin sections in Dispase solution and incubate for 18 hours at 2°C to 8°C.
- Separate epidermal layer of human keratinocytes from the dermis and place into a sterile 15-mL conical tube containing 2 mL 0.05% Trypsin-EDTA.
- Incubate at 36°C to 38°C for approximately 15 minutes. Triturate using a 2-mL pipette every 2–3 minutes to aid in cell dissociation.
- Add 10 mL sterile filtered Soybean Trypsin Inhibitor (10 mg/mL in DPBS without calcium and magnesium).
- Pellet cells by centrifuging at 180 × g for 7 minutes at room temperature.

Culture Primary Keratinocytes

- Wash the cell pellet in 5–10 mL complete Keratinocyte-SFM medium and centrifuge 180 × g for 7 minutes at room temperature.
- Resuspend the cell pellet in 5 mL complete Keratinocyte-SFM medium. Determine cell density using Countess® Automated Cell Counter.
- Seed primary keratinocytes into T-75 culture flasks at a density of approximately 3 × 10⁶ cells per flask in 15 mL complete Keratinocyte-SFM medium.
- Exchange spent media with fresh complete Keratinocyte-SFM medium every 2–3 days.

Note: Primary cultures may not reach 60–75% confluence until 10–20 days following isolation.

Secondary Culture of Human Epidermal Keratinocytes

Subculture keratinocytes directly into complete Keratinocyte-SFM medium. Ensure that cell confluency is between 60–75%, cell viability is at least 90%, and cell growth rate is in mid-logarithmic phase prior to secondary culturing.

- Aspirate culture medium from cell monolayer and rinse with 10 mL DPBS without calcium and magnesium, aspirate and discard.
- Add 1–2 mL 0.05% Trypsin-EDTA and incubate at 36°C to 38°C for 5–10 minutes. Observe the cell monolayer using an inverted microscope. When cells have rounded, aspirate Trypsin solution and reincubate until 90% of the cells have detached from the surface of the flask.
- Add 10 mL sterile filtered Soybean Trypsin Inhibitor (10 mg/mL in DPBS without calcium and magnesium).
- Transfer cell suspension into a sterile 15-mL centrifuge tube and centrifuge 180 × g for 7 minutes at room temperature.
- Wash the cell pellet in 5–10 mL complete Keratinocyte-SFM medium and centrifuge 180 × g for 7 minutes at room temperature.
- Resuspend the cell pellet in 5 mL complete Keratinocyte-SFM medium. Determine cell density using Countess® Automated Cell Counter.
- Seed keratinocytes into T-75 culture flasks at a density of approximately 1–3 × 10⁶ cells per flask in 15 mL complete Keratinocyte-SFM medium.
- Exchange spent media with fresh complete Keratinocyte-SFM medium every 2–3 days until the cells reach 60–75% confluence, after which time cells can be further subcultured.

For additional technical information such as Safety Data Sheets (SDS), Certificates of Analysis, visit www.lifetechnologies.com/support
For further assistance, email techsupport@lifetech.com

© 2014 Life Technologies Corporation. All rights reserved. The trademarks mentioned herein are the property of Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) or their respective owners.

DISCLAIMER- LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION AND/OR ITS AFFILIATE(S) DISCLAIM ALL WARRANTIES WITH RESPECT TO THIS DOCUMENT, EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THOSE OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, OR NON-INFRINGEMENT. TO THE EXTENT ALLOWED BY LAW, IN NO EVENT SHALL LIFE TECHNOLOGIES AND/OR ITS AFFILIATE(S) BE LIABLE, WHETHER IN CONTRACT, TORT, WARRANTY, OR UNDER ANY STATUTE OR ON ANY OTHER BASIS FOR SPECIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, MULTIPLE OR CONSEQUENTIAL DAMAGES IN CONNECTION WITH OR ARISING FROM THIS DOCUMENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO THE USE THEREOF.

Cryopreservation










- Obtain the appropriate volume of Synth-a-Freeze® cryopreservation medium and store at 2°C to 8°C until use.
- Prepare the desired quantity of cells, harvest (steps 1–4 Secondary Culture of Human Epidermal Keratinocytes) in mid-log phase of growth with viability >90%. Determine cell density using Countess® Automated Cell Counter prior to centrifugation. **Note:** Typical cell densities for cryopreservation with Synth-a-Freeze® medium are 5 × 10⁵ to 3 × 10⁶ viable cells/mL.
- Resuspend cell pellet in the pre-determined volume of 2°C to 8°C of Synth-a-Freeze® medium.
- Immediately dispense aliquots of this suspension into cryovials according to the manufacturer's specifications (i.e., 1 mL in a 2-mL cryovial).
- Achieve cryopreservation in an automated or manual controlled rate freezing apparatus following standard procedures (1°C decrease per minute).
- Transfer frozen cells to liquid nitrogen. We recommend (vapor phase) storage at –200°C to –125°C.

Related Products

Product	Catalog No.
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, without calcium and magnesium	14190
Gentamicin Reagent Solution (50 mg/mL), liquid	15750
Dispase	17105
HBSS, calcium, magnesium, no phenol red	14025
TrypLE™ Express (1X), liquid, without Phenol Red	12563
Trypsin-EDTA, 1X	25300
Trypan Blue Stain	15250
Countess® Automated Cell Counter	C10227
Human Corneal Epithelial Cells (HCEC)	C-018-5C
Synth-a-Freeze®, Defined Protein-Free Cryopreservation Medium	A12542

Explanation of Symbols and Warnings

The symbols present on the product label are explained below:

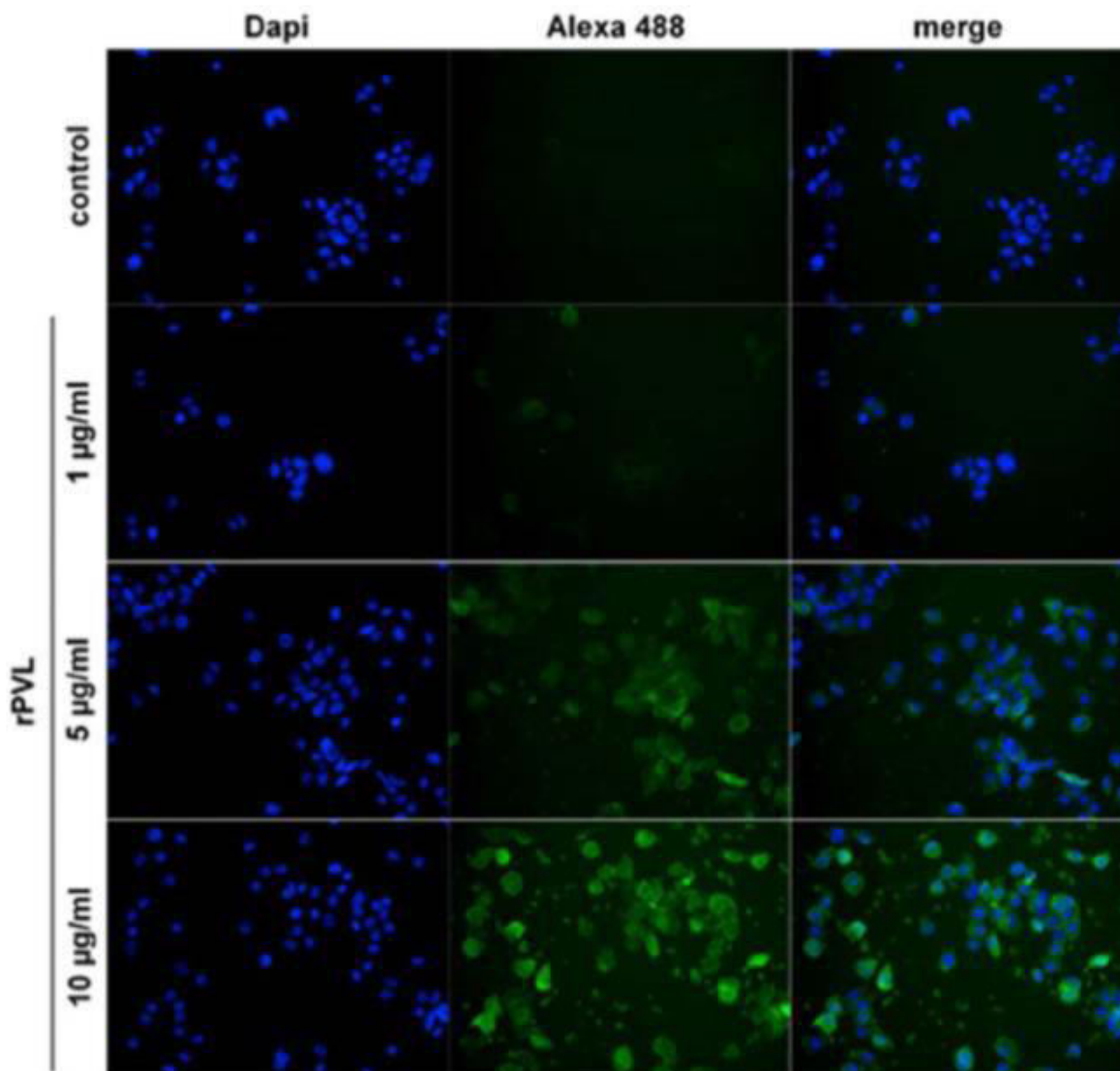
			
Caution, consult accompanying documents	Temperature Limitation	Sterilized using aseptic processing techniques	Consult instructions for use
			
Keep away from light	Catalog number	Manufacturer	Batch Code
			 Use By:

Limited Product Warranty

Life Technologies Corporation and/or its affiliate(s) warrant their products as set forth in the Life Technologies' General Terms and Conditions of Sale found on Life Technologies' website at www.lifetechnologies.com/termsandconditions. If you have any questions, please contact Life Technologies at www.lifetechnologies.com/support.

ANNEXE

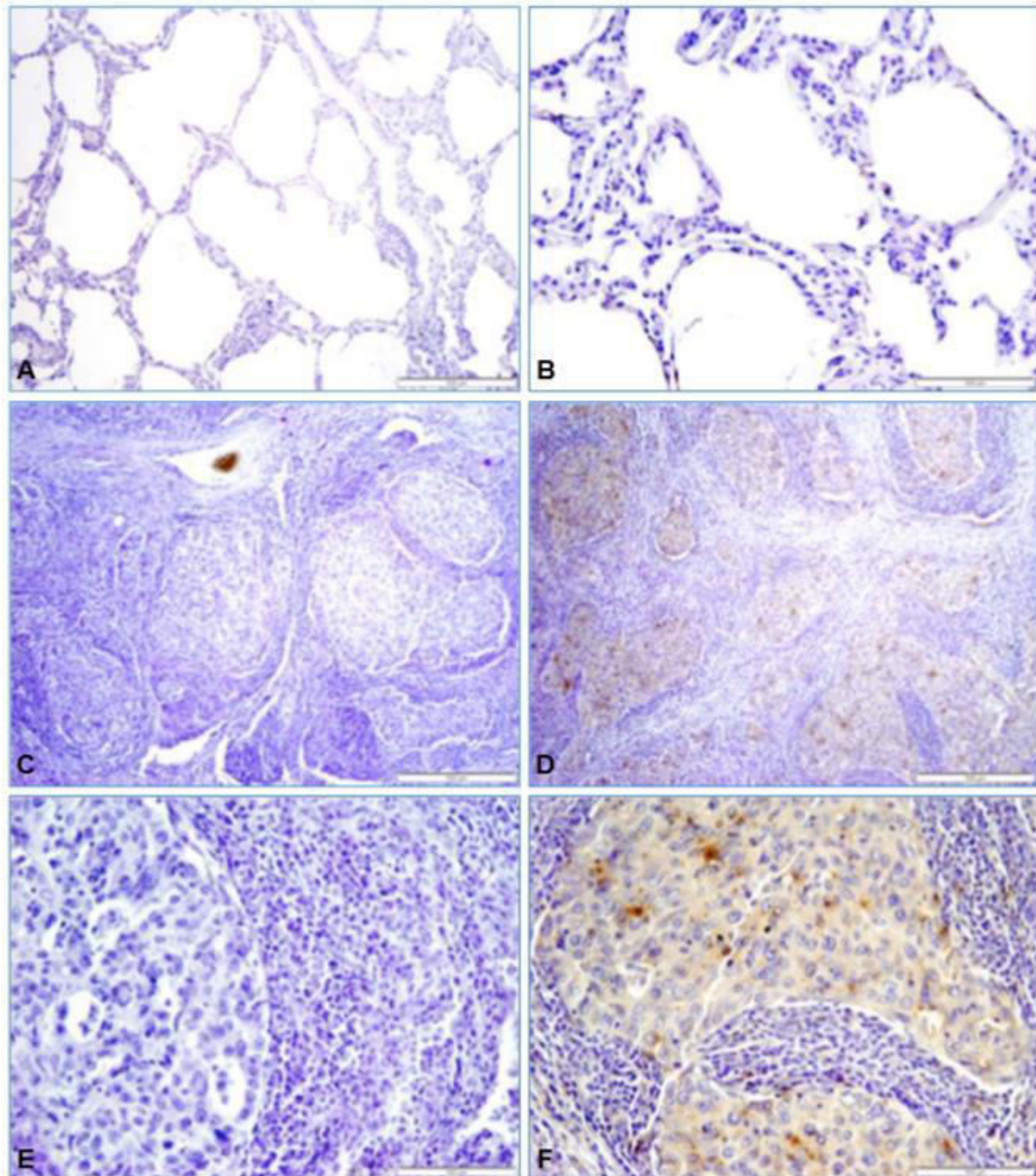
2



Annexe 2. Images microscopiques de cellules NSCLC H358 non traitées ou traitées pendant 30 min à 37 ° C avec des concentrations croissantes de rPVL marquées avec Alexa 488. La chaîne verte montre rPVL-Alexa 488, le canal bleu montre des noyaux marqués avec une coloration DAPI.

ANNEXE

3



Annexe 3. rPVL marqué avec de la biotine avec des coupes de tissu inclus en paraffine dans des poumons humains normaux (A et B) ou des adénocarcinomes pulmonaires humains (C-F), en utilisant la technique streptavidine-peroxydase. Les sections sont contre-colorées avec de l'hématoxyline.

Colonne de gauche (A, C et E) : contrôle sans rPVL. Colonne de droite (B, D et F) : $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ de sections traitées par rPVL. Grossissements d'origine : x4 (A, C, D) ; x20 (B, E, F).

RESEARCH ARTICLE

A Recombinant Fungal Lectin for Labeling Truncated Glycans on Human Cancer Cells

Aymeric Audfray¹*, Mona Beldjoudi^{2,3,4}, Adrien Breiman^{5,6,7,8}, Amandine Hurbin^{2,3}, Irene Boos⁹, Carlo Unverzagt⁹, Mourad Bouras⁴, Sylvie Lantuejoul^{2,3,10}, Jean-Luc Coll^{2,3}, Annabelle Varrot¹, Jacques Le Pendu^{5*}, Benoit Busser^{2,3,10*}, Anne Imberty^{1*}

1 CERMAV, UPR5301, CNRS, University Grenoble Alpes, 38041 Grenoble, France, **2** IAB, University Grenoble Alpes, F-38000 Grenoble, France, **3** INSERM U823, IAB, F-38000 Grenoble, France, **4** University El Hadj Lakhdar, 05000 Batna, Algeria, **5** INSERM, UMR892, 44007 Nantes, France, **6** CNRS, UMR6299, 44007 Nantes, France, **7** IRS UN, University of Nantes, Nantes, France, **8** Nantes University Hospital, 44000 Nantes, France, **9** Bioorganische Chemie, Gebäude NW1, Universität Bayreuth, 95440 Bayreuth, Germany, **10** Grenoble University Hospital, F-38000 Grenoble, France

* These authors contributed equally to this work.

* jacques.le-pendu@inserm.fr (JLP); bbusser@chu-grenoble.fr (BB); imberty@cermav.cnrs.fr (AI)



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Audfray A, Beldjoudi M, Breiman A, Hurbin A, Boos I, Unverzagt C, et al. (2015) A Recombinant Fungal Lectin for Labeling Truncated Glycans on Human Cancer Cells. PLoS ONE 10(6): e0128190. doi:10.1371/journal.pone.0128190

Academic Editor: Els JM van Damme, Ghent University, BELGIUM

Received: January 28, 2015

Accepted: April 24, 2015

Published: June 4, 2015

Copyright: © 2015 Audfray et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. PVL/Ligand complex has been deposited in the Protein Data Bank with code 4UP4.

Funding: Agence Nationale de la Recherche: grants NeoLect-11-BSV5 and ANR-11-LABX-003 (<http://www.agence-nationale-recherche.fr/>). European Cooperation in Science and Technology: COST Action CM1102 (<http://www.cost.eu/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

Abstract

Cell surface glycoconjugates present alterations of their structures in chronic diseases and distinct oligosaccharide epitopes have been associated with cancer. Among them, truncated glycans present terminal non-reducing β -N-acetylglucosamine (GlcNAc) residues that are rare on healthy tissues. Lectins from unconventional sources such as fungi or algae provide novel markers that bind specifically to such epitopes, but their availability may be challenging. A GlcNAc-binding lectin from the fruiting body of the fungus *Psathyrella velutina* (PVL) has been produced in good yield in bacterial culture. A strong specificity for terminal GlcNAc residues was evidenced by glycan array. Affinity values obtained by microcalorimetry and surface plasmon resonance demonstrated a micromolar affinity for GlcNAc β 1-3Gal epitopes and for biantennary N-glycans with GlcNAc β 1-2Man capped branches. Crystal structure of PVL complexed with GlcNAc β 1-3Gal established the structural basis of the specificity. Labeling of several types of cancer cells and use of inhibitors of glycan metabolism indicated that rPVL binds to terminal GlcNAc but also to sialic acid (Neu5Ac). Analysis of glycosyltransferase expression confirmed the higher amount of GlcNAc present on cancer cells. rPVL binding is specific to cancer tissue and weak or no labeling is observed for healthy ones, except for stomach glands that present unique α GlcNAc-presenting mucins. In lung, breast and colon carcinomas, a clear delineation could be observed between cancer regions and surrounding healthy tissues. PVL is therefore a useful tool for labeling agalacto-glycans in cancer or other diseases.

Introduction

Changes in cell surface glycosylation are known to be associated with a large number of chronic diseases and the cancer glycans represent a very promising field for biomarker discovery [1–3].

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Correlation of inflammation or metastasis with overexpression of sialylated and fucosylated epitopes, such as sialyl Lewis x has been the subject of intensive research. However, in other cases, the very active metabolism and division of cancer cells can result in the abnormal exposure of cryptic epitopes. This internal part of glycoconjugates, that would have been decorated by other monosaccharides in normal cells, may therefore be exposed on the cell surface and become available for detection by antibodies or lectins [4].

N-acetylglucosamine (GlcNAc) is a carbohydrate residue that is present in the inner part of N-glycans, as the core chitobiose linked to asparagine residue and more rarely as β 1–4 linked to the core branched mannose in bisected N-glycans. GlcNAc is also present in the branches of these glycoconjugates, either β 1–2-linked to mannose (Man) on the trimannose core or β 1–3-linked to galactose (Gal) as part of polylactosamine extended branches (Fig 1A). Nevertheless, due to the activity of galactosyltransferases and sialyltransferases, these GlcNAc residues are not in terminal positions in normal tissues. Similarly glycosphingolipids contain GlcNAc β 1–3 or β 1–6 linked to Gal but not in exposed terminal positions. The epitopes are similar in mucins with Gal, sialic acid (Neu5Ac) or fucose (Fuc) residues capping the terminal epitopes. The only exception is a rare epitope consisting of α 1–4 linked GlcNAc-terminated mucins from glandular mucous cells in the stomach [5] (Fig 1A).

The occurrence of aberrant β GlcNAc-terminating epitopes has been observed in a limited number of cancers, including human leukemia cells [6]. IgGs with truncated N-glycans have been reported in the serum of prostate cancer patients [7]. Altered mucins with terminal GlcNAc motifs were proposed to form the Tk epitope, a colon tumor associated antigen [8]. The most precise characterization of the alterations of glycosylation with exposure of internal GlcNAc was performed by glycome analysis of different carcinoma, pointing to the occurrence of short truncated N-glycans terminated by GlcNA β 1–2Man on both antenna and of GlcNAc-terminated linear and branched glycosphingolipids, particularly in lung small-cell carcinoma and adenocarcinoma, but also in kidney, breast and ovary carcinoma [9] (Fig 1A).

Lectins, generally derived from plants, have been demonstrated to be very efficient for detecting aberrant glycosylation in biological samples. A new technology is the use of lectin arrays that can contain lectins with large spectra of specificity and therefore characterize variation of glycosylation [10]. The use of lectins extracted from natural organisms may be time-consuming and may generate problems of contamination or variations between batches. Therefore, recombinant lectin technology is starting to be developed [11]. Lectins that are classically used for GlcNAc-binding are extracted from plants such as wheat (WGA), tomato (SLT) and *Griffonia simplicifolia* (GSL-II). A new GlcNAc-specific lectin (PVL) was purified from the fruiting bodies and mycelium of a fungus, *Psathyrella velutina* [12] and then structurally characterized [13]. A closely related protein, lectin 2 from mushroom *Agrocybe aegerita* (AAL-2) has been recently cloned and demonstrated to bind to hepatoma cells [14]. The PVL structure presents a novel fold among lectins, with seven β -sheets arranged in a β -propeller fold. The lectin therefore adopts a donut shape with six GlcNAc binding sites, and is expected to present strong avidity for cell surfaces presenting high density of terminal GlcNAc residues.

The aim of the present work was to produce a recombinant form of PVL and to characterize its fine specificity towards the different GlcNAc-terminated epitopes that could be present on pathology-related truncated forms of human glycoconjugates. The avidity of the lectin for GlcNAc-decorated surface was evaluated on arrays. Finally, the ability of the lectin to label cancer cells and carcinoma tissues was also described.

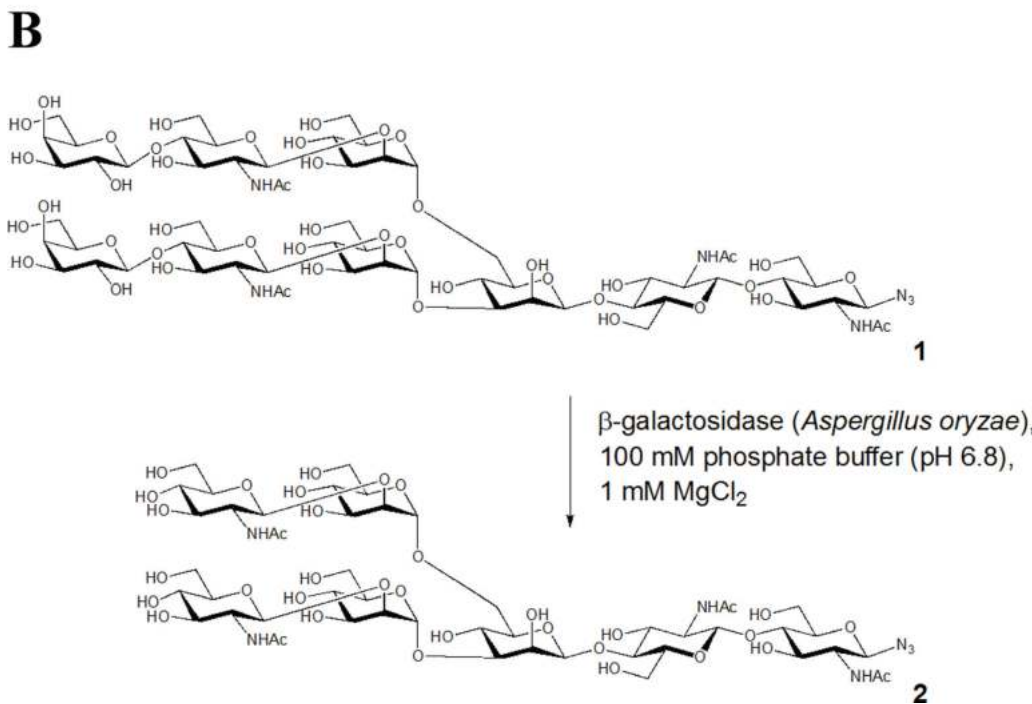
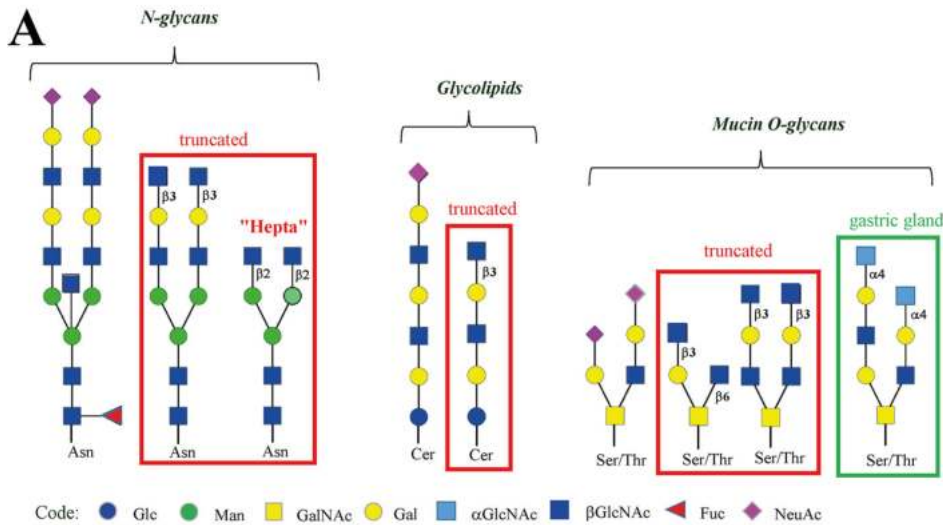


Fig 1. Representation of glycoconjugates and binding of rPVL to glycans on chips. A. Examples of normal and truncated oligosaccharides that can be found on normal or cancer tissues. Coding for schematic representation of monosaccharides is in the lower part of the figure. The heptasaccharide used in binding experiments is indicated as "hepta". B. Synthesis of heptasaccharide azide 2 corresponding to oligosaccharide "hepta" in panel A.

doi:10.1371/journal.pone.0128190.g001

Materials and Methods

Material

GlcNAc has been purchased from Sigma-Aldrich. Disaccharide GlcNAc β 1-3Gal, lacto-N-tetraose (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc), lacto-N-triose (GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc) chitobiose (GlcNAc β 1-4GlcNAc), chitopentaose (GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc) have been purchased from Elicityl (Crolles, France). Sialidase from *Clostridium perfringens* has been purchased from Sigma-Aldrich (ref. N2876) or New England Biolabs (Ipswich, MA). β -D-N-Acetyl-hexosaminidase_f from *Streptomyces plicatus* was purchased from New England Biolabs. The biotin-labeled sialic acid-specific lectin MAH was purchased from Vector Labs (Burlingame, CA)

Synthesis of N-glycan 2

Nonasaccharide azide **1** (Fig 1B) was prepared from egg yolk followed by enzymatic hydrolysis and azidation [15, 16]. 5.1 mg (3.1 μ mol) of nonasaccharide **1** were dissolved in 203 μ l of phosphate buffer (100 mM, pH 6.8, 1 mM MgCl₂). 10 units of lyophilized β -galactosidase (EC 3.2.1.23) were added to the solution. The mixture was incubated at 37°C for 3 days (TLC: 2-propanol, 1 M ammonium acetate, 2:1). After lyophilization, the residue was purified by gel filtration (Superdex 30, 1.6 x 60 cm, 0.1 M NH₄HCO₃, 0.9 ml min⁻¹). The peak, eluting at 86 min, was lyophilized and desalted by gel filtration (Sephadex G-25, 2.5 x 15.5 cm, 5% ethanol in water, 0.6 ml min⁻¹). The peak, eluting at 75 min, was lyophilized yielding 2.9 mg (2.2 μ mol) of heptasaccharide **2** (70%). $[\alpha]_D^{22} = -9.0$ (c = 0.5, H₂O). The purity was confirmed by 360 MHz ¹H NMR in D₂O (S1 Fig) ¹H-NMR (360 MHz, D₂O): $\delta = 5.03$ (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.83 (d, $J_{1,2} < 1$ Hz, 1H, H-1⁴), 4.68–4.64 (m, 2H, H-1¹, H-1³), 4.53 (d, $J_{1,2} = 7.7$ Hz, 1H, H-1²), 4.47 (d, $J_{1,2} = 8.3$ Hz, 2H, H-1⁵, H-1⁵), 4.18–4.15 (m, 1H, H-2³), 4.12–4.09 (m, 1H, H-2⁴), 4.04–4.01 (m, 1H, H-2⁴), 1.99 (s, 3H, NAc), 1.97 (s, 9H, NAc). ESI-MS: m/z calcd for C₅₀H₈₃N₇O₃₅: 1341.49; found 1342.62 (M+H)⁺, 1365.86 (M+Na)⁺

Production of recombinant PVL

A nucleotide sequence coding for the peptide sequence of lectin from fruiting body of mushroom *P. velutina* (GenBank, accession number DQ232759) [13] supplemented at N-terminal position with the amino-acids MSVVVIS was synthesized after codon optimization for expression in *Escherichia coli* (GenScript, Piscataway, NJ). It was introduced into the expression vector pET25b using NdeI and XhoI restriction sites. The pET25-rPVL vector was transformed into *E. coli* BL21(DE3) (Novagen), and cells harboring pET25-rPVL plasmid were grown in LB broth containing 100 μ g ml⁻¹ ampicillin at 37°C until A600 reached 0.7. The cells were then cultured for 16 h after addition of 0.5 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside. After centrifugation (7000 x g for 15 min), bacteria were resuspended in equilibration buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) and broken by cell disruption at a pressure of 1.7 kilobars (Constant systems Ltd). After centrifugation (50000 x g, 30 min at 4°C) and filtration, affinity chromatography on a GlcNAc-agarose column (EY laboratories inc.) was performed on the supernatant. rPVL was allowed to bind to immobilized GlcNAc in equilibration buffer, and after washing (20 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 M NaCl), it was eluted with 200 mM of free GlcNAc in equilibration buffer. Purified protein was dialyzed extensively against ultrapure water for 7 days, freeze-dried, and stored at 4°C.

Glycan array

Purified rPVL were labeled with Alexa Fluor 488 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and repurified on a D-Salt polyacrylamide desalting column (Pierce). Alexa-labeled rPVL was used for glycan array screening with the standard procedure of the Protein-Glycan Interaction Core (H) of the Consortium for Functional Glycomics.

Thermal shift analysis

Thermal shift assays were performed using a Mini Opticon, Real Time PCR machine (Bio-Rad Laboratories) with 0.5 mg ml⁻¹ of protein diluted in 100 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.5, 100 μM CaCl₂, with or without oligosaccharide in a total reaction volume of 25 μl. SYPRO Orange (Molecular Probes, CA) was used as a fluorescent probe detected at 530 nm. The temperature was raised using 1°C/minute steps from 25°C to 100°C and fluorescence readings were taken at each interval. A positive ΔT_m value indicates that the ligand stabilizes the protein from denaturation, and therefore binds to the protein. A minimum of two independent measurements were performed for each condition

Microcalorimetry

Recombinant lyophilized rPVL was dissolved in buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.5, NaCl 150 mM, 100 μM CaCl₂) and degassed. The protein concentration was checked by measuring A₂₈₀ by using a theoretical molar extinction coefficient of 65,890 M⁻¹ cm⁻¹. Carbohydrate ligands were dissolved in the same buffer, degassed, and loaded in the injection syringe. ITC was performed with a ITC200 microcalorimeter (GE Healthcare). The rPVL solution was placed in a 200 μl sample cell at 25°C. Titration was performed with 20 injections of 2 μl carbohydrate ligands every 120 s. The experimental data were fitted to a theoretical titration curve using Origin software supplied by GE Healthcare, with ΔH (enthalpy change), K_a (association constant) and n (number of binding sites per monomer) as adjustable parameters. Free energy change (ΔG) and entropy contributions (TΔS) were derived from the equation ΔG = ΔH - TΔS = -RT ln K_a (with T as the absolute temperature and R = 8.314 J mol⁻¹ K⁻¹). Two independent titrations were performed for each tested ligand.

Surface plasmon resonance

All SPR experiments were performed on a Biacore X100 instrument (GE Healthcare) at 25°C in HBS (10 mM Hepes/NaOH, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) supplemented with 100 μM of CaCl₂ at a flow rate of 30 μl min⁻¹. Binding was measured as resonance units over time after blank subtraction, and data were then evaluated by using the Biacore X100 evaluation software, version 2.0. Dissociation constants were determined by plotting response at equilibrium (Req, 10 s before the end of injection) against analyte concentration. For protein coated chip, 3500 resonance units of rPVL (100 μg ml⁻¹, 10 mM acetate buffer pH 6.2) have been immobilized on flow channel 2 of a research grade CM5 chip using standard amine coupling procedures. Flow channel 1 has been activated/deactivated. Experiments consist of injection (association 360 s, dissociation 400 s) of various concentrations of oligosaccharides (2 fold cascade dilutions, from 0 to 10 μM) on both channels.

Protein crystallography

Crystals of rPVL complexed with GlcNAcβ1-3Gal were obtained by the hanging drop at 20°C. Lyophilized protein was dissolved at 2.5 mg ml⁻¹ in 10 mM Hepes/NaOH buffer, pH 7.5, NaCl 150 mM, 100 μM CaCl₂ and incubated with 1 mM GlcNAcβ1-3Gal during 1h at room

temperature prior to co-crystallization. One big rectangular-like crystal was obtained from 20% PEG3350, 0.2 M Sodium Formate and 0.1 M diammonium phosphate after several months. One piece was directly mounted in a cryoloop and flash-frozen in liquid nitrogen. Diffraction data were collected at 100 K at the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France) at station BM30A using a ADSC Q315r CCD detector [17]. The data were processed using XDS [18]. All further computing was performed using the CCP4 suite [19]. Data quality statistics are summarized in S1 Table. The molecular replacement technique was used to solve the structure with PHASER [20] and the coordinates of the native PVL (Protein Data Bank code 2C4D) [13]. The structure was refined by restrained maximum likelihood refinement using REFMAC 5.8 [21] iterated with manual rebuilding in Coot [22]. Incorporation of the ligand was performed after inspection of the mFo-DFc weighted maps. Water molecules, introduced automatically using Coot, were inspected manually. The stereochemical quality of the models was assessed with the program Molprobity [23], and coordinates were deposited in the Protein Data Bank under codes 4UP4.

Cells lines

Human non-small cell lung cancer (NSCLC) (H358, A549, H441 and H322), bronchial epithelial (HBEC-3KT), breast cancer (MCF-7, MDA-MB-231), ovarian cancer (OVCAR3), prostate cancer (DU-145), skin squamous cell carcinoma (A431), melanoma (A375, Colo829 and SKMel28), and colon cancer (HT-29) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). The M119 melanoma cell line was a gift from Dr Nathalie Labarrière (Inserm U892, Nantes, France). The cells were maintained in RPMI-1640 medium (Gibco, Cergy Pontoise, France), except MDA-MB-231 and HT-29, which were grown in DMEM 4.5 g l⁻¹ glucose (Gibco), and HBEC-3KT, which were maintained in Keratinocyte-SFM medium (Gibco). All the culture media were supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (5% for MDA-MB-231) and cells were kept in a humidified atmosphere with 5% CO₂, at 37°C.

Flow cytometry

Cells were trypsinized, aliquoted, then washed twice in PBS (with Ca²⁺ and Mg²⁺). After incubation with rPVL-Alexa488 (5 and 10 µg ml⁻¹), cells were washed twice and analysis was performed on an Accuri C6 flow cytometer using the CFlow-Plus Software (BD Biosciences). Alternatively, biotinylated rPVL or MAH were used, followed by Streptavidin-phycoerythrin (BD) and analysis was performed on a FACSCalibur with the Cellquest software (BD). Where indicated, cells were pre-treated with sialidase (Sigma) or β-D-N-acetyl-hexosaminidase for 4h at 37°C.

Inhibition of glycosylation

A549 cells were seeded in 6 well plates and treated with different glycosylation inhibitors: a fucosyl transferase inhibitor, 2-fluoro-peracetyl fucose (2FF) and a sialyl-transferase inhibitor, 3-fluoro-peracetyl-neuraminic acid (3F-Neu5Ac) that have been described recently [24]. Treatment was performed for 4 days with 400 µM and 100 µM of 2FF and 3F-Neu5Ac respectively. Medium was replaced and inhibitors were added again after 2 days.

In order to investigate the type of glycosylated ligands that are recognized by rPVL, we used Kifunensin (Sigma) which blocks ER α-mannosidase I and consequently the processing of N-glycans; benzyl-2 acetamido-2 deoxy-α-D-galactopyranoside (Benzyl-GalNAc; Sigma) which blocks the O-glycosylation process and 1R,2R-(+)-1-phenyl-2-palmitoylamino-3-N-morpholine-1-propanol (PPMP; Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) which inhibits synthesis

of glycolipids. Cells were treated with 5 μM Kifunensin for 4 days as above. For Benzyl-GalNAc and PPMP, cells were left in contact with the inhibitors, at 6 mM and 10 μM respectively, over a 24h period, then the medium was changed and the cells were incubated for 1 more day before analysis. As 2FF, 3F-Neu5Ac and PPMP are diluted in DMSO, pure DMSO was added to the medium of control wells in order to have the same DMSO concentration in each well.

Immunofluorescence analysis

Cells were seeded into 4-chamber culture slides (4×10^4 cells per chamber). After 24h, cells were washed with ice-cold PBS and fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min at 4°C. Before and after incubation with 1% BSA/PBS (w/v), cells were washed with cold PBS three times for 5 min each. Cells were then subjected to immunofluorescence staining with rPVL-Alexa488 for 1h at room temperature and then washed with cold PBS three times for 3 min each. Cells were examined using a BX41 microscope equipped with a DP-70 digital camera system (Olympus, Tokyo, Japan) and a pseudo-confocal microscope ApoTome equipped with AxioCam MRm (N/B).

Tissue sections

Ethanol-fixed human trachea, esophagus, duodenal junction, jejunum, colon, pancreas, liver, ovary, uterus and vagina samples were obtained from organ donors. 18 tissue samples from 10 different individuals were used to prepare a tissue microarray (TMA) of healthy tissues. Ethanol-fixed colorectal tumor sections were obtained after cancer surgery. Formalin-fixed paraffin-embedded human NSCLC samples ($n = 3$ squamous cell carcinomas, $n = 3$ adenocarcinomas) were also obtained. A breast tumor and a lung tumor TMA (formalin-fixed; 40 tumors, 10 paired metastasis and 10 paired adjacent “normal” tissue) were bought from SuperBiochip (Seoul, South Korea). Formalin-fixed canine mammary tumors were obtained from “laboratory of animal histopathology of the Nantes Veterinary School, ONIRIS) Immunostaining analysis was performed on 3- μm -thick tissue sections.

Histochemistry

The tissue sections were deparaffinized, then endogenous peroxidases were blocked by incubating the sections with PBS containing 3% hydrogen peroxide (v/v), for 5 min. The sections were then blocked with BSA 5% (w/v) for 30 min at room temperature, followed by incubation with 0.7–1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ biotinylated rPVL 1h at room temperature (Ethanol-fixed sections) or 2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of biotinylated rPVL in PBS at 4°C for 18h (for formalin-fixed sections). After washing the sections twice with PBS, an indirect biotin-streptavidin system and DAB (Ventana Medical Systems) or AEC (Vector laboratories) detection kits were used according to the manufacturer’s instructions. The developed slides were washed twice with PBS and counterstained with hematoxylin. After washing with water, the sections were dehydrated and mounted. Sections were observed under a BX41 microscope equipped with a DP-70 digital camera system (Olympus, Tokyo, Japan) or imaged with a NanoZoomer slide-scanner (Hamamatsu, Hamamatsu City).

For treatment with glycosidases, sections were incubated (after deparaffination and hydrogen peroxide blocking) with 50 U of sialidase (New England Biolabs) or 25 U of β -D-N-acetylhexosaminidase for 2 hours at 37°C. Fresh enzymes were then added and the slides were further incubated overnight at 37°C. Control slides were prepared in parallel with the corresponding enzyme buffers (Sodium Citrate pH 6 and 4.5 respectively). After overnight incubation, the slides were washed twice in PBS, blocked with PBS-5% BSA (w/v), stained with rPVL and imaged as described above.

Ethics statements

All the human ethanol-fixed tissues were collected and stored before the law 88-138 of December 20, 1988 concerning resection of human tissues after death for scientific investigations. For this reason, no approval by a Research Ethics Committee applies. The samples were obtained from the Nantes University Hospital Center for Biological Resources (<http://relib.fr>), under the Cancerology program approved by the ministry of research (approval DC-2011-1399). Tissue banking and research conduct of the formalin-fixed human tissues were approved by the ministry of research (approval AC-2010-1129) and by the regional Institutional Review Board Comité de Protection de Personnes (CPP) 5—Sud Est (regional board). All patients enrolled in this trial provided written informed consent. These specific samples were previously used as described in literature [25, 26]. Regarding the Tissue MicroArrays obtained from Superbiochips Laboratories Ltd (Seoul, Korea), the company certifies that the “human material have been removed or collected with the donor’s prior consent and that no payment whatsoever has been made to the latter”. Formalin-fixed tissues from canine breast tumors were obtained from “laboratory of animal histopathology” of the Nantes Veterinary School (ONIRIS). Cases coming from the Pathology Laboratory of the Veterinary Teaching Hospital of Oniris were used in this study. The owners’ written consent and approval from the Oniris College of Veterinary Medicine local Animal Welfare Committee were obtained prior to inclusion. The animal care and used protocol adhered to the European Directive number 2010/063 and to the national French regulation (Décret n°2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques).

Results

Production and characterisation of rPVL

PVL has been produced recombinantly (rPVL) in *E. coli* and purified in one step on a GlcNAc-agarose column with a final yield of 1 mg l⁻¹ of culture. When assayed on rabbit erythrocytes, the lectin displayed strong hemagglutination activity down to concentration of 2.3 nM. The recombinant protein is stable and demonstrates a denaturation temperature of 56°C by thermal shift analysis (S2 Fig). Further stabilization of rPVL can be obtained in the presence of GlcNAc-containing ligands like GlcNAcβ1-3Gal or chitobiose, with a T_m of 60°C for both, but not in the presence of non-binding carbohydrate such as galactose and sucrose, confirming the GlcNAc binding activity.

rPVL is specific for oligosaccharides with terminating GlcNAc residues

The specificity of recombinant PVL was assayed on the Mammalian Printed Array version 5.1 with 610 glycans, mostly from mammalian origin. The rPVL concentration was varying from 0.2 mg ml⁻¹ to 0.2 μg ml⁻¹ and the four datasets are available from the CFG site with prim-screen_codes 5693, 5695, 5696 and 4697 (<http://www.functionalglycomics.org>). The fluorescence signal was excellent and the lowest concentration was sufficient for the determination of the strong preference for oligosaccharides carrying a GlcNAc at their non-reducing end (Fig 2).

The lectin bound efficiently to GlcNAc present in two different positions in truncated N-glycans: GlcNAcβ1-2Man on the core pentasaccharides and even more strongly on GlcNAcβ1-3Gal on antenna that are extended by polylactosamine motifs. Because of multivalency effect, the signal was maximal for multiantennary structures (2 to 5 antenna) with lactosamine repeats, the occurrence of which is related to cancer progression [27]. Polylactosamine bi- or multi-antennary N-glycans with terminal GlcNAcβ1-3Gal were bound with fluorescence

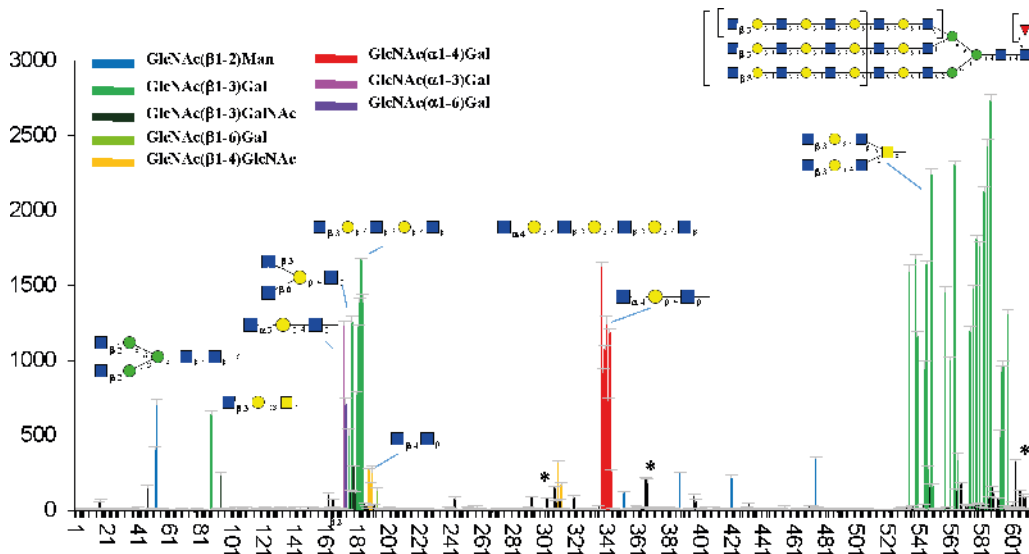


Fig 2. Direct fluorescence measurement obtained with Alexa Fluor 488 labeled rPVL (0.2 $\mu\text{l ml}^{-1}$) on the Mammalian Printed Array version 5.1 from the Consortium for Functional Glycomics. Each hit has been colored according to the terminal disaccharide. Representative oligosaccharides have been schematically displayed. Peaks indicated by a * correspond to minor labeling of sialic-acid terminated oligosaccharides. The full list of oligosaccharides with fluorescence intensities is available from CFG web site (<http://www.functionalglycomics.org>).

doi:10.1371/journal.pone.0128190.g002

signals higher than 1500 RU, while the ones with terminal Gal β 1-4GlcNAc are in the background noise, below 150 RU. No binding is observed to the GlcNAc β 1-4Man motif present in bisected N-glycans, but the presence of this bisecting GlcNAc does not hinder the binding of PVL to neighboring GlcNAc-terminated antenna. The lectin also bound to mucin motifs that bear β GlcNAc on position 3 and 6 of a GalNAc residue (type 4). It bound only weakly to the chitobiose motif (GlcNAc β 1-4GlcNAc) of chitin. The lectin is not selective for the anomeric configuration of the GlcNAc and several oligosaccharides with terminal α GlcNAc residues were also labeled. Such epitopes are present in human heparan sulfate (GlcNAc α 1-4IdoA) and in mucins of gastric glands (GlcNAc α 1-4Gal) [5], but also in class III mucin of carcinoma tissues that express a gastric phenotype [28]. The glycan array contains a variety of oligosaccharides with terminal GalNAc but PVL binding was observed only to the disaccharide GalNAc β 1-3GalNAc (#97) with minor intensity.

Since immobilized wild-type PVL was reported to bind to sialylated glycoproteins [29], the binding to oligosaccharides with sialylated structures was checked. Indeed a weak binding may be observed for biantennary N-glycans with terminating Neu5Ac α 2-3Gal epitopes (#603 in Fig 2). The level of fluorescence was close to the noise level (12% of maximum). Nevertheless, when checking the glycan array data obtained with higher concentration of PVL (0.1 mg ml^{-1}), the binding to sialyl-oligosaccharides became clearly visible.

The affinity of rPVL for various GlcNAc-containing oligosaccharides was tested for both free and surface bound proteins using titration microcalorimetry and surface plasmon resonance, respectively (Table 1 and S3 Fig). The affinity for GlcNAc is in the same range as that previously measured by ITC with native PVL isolated from mushroom ($K_d \approx 200 \mu\text{M}$) [13]. Quantitative measurements confirmed a stronger affinity for GlcNAc β 1-3Gal-terminated structures than for GlcNAc and chitooligosaccharides, with dissociation constant of about 70 μM for the trisaccharide lacto-N-triose. A good agreement was observed between values measured by both methods. Only the N-glycan heptasaccharide presenting two terminal GlcNAc β 1-2Man epitopes showed stronger affinity for rPVL in solution (K_d of 34 μM) than

Table 1. Determination of affinity characteristics and thermodynamic contributions for the binding of rPVL with different oligosaccharides.

glycan	SPR		ITC		
	Kd (μ M)	Kd (μ M)	n	$-\Delta H$ (kJ/mol)	$T\Delta S$ (kJ/mol)
GlcNAc	132	124	5.0 ^b	41.2	-18.0
GlcNAc β 1-4GlcNAc ^a	205	122	5.0 ^b	36.9	-14.6
GlcNAc(β 1-4GlcNAc) ₄	358	n.d.			
GlcNAc β 1-3Gal	103	110	4.9 \pm 0.2	42.1	-19.5
GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc (LNT2)	71	108	5.0 \pm 0.2	41.7	-19.1
Biantennary N-glycan (2) (with terminal GlcNAc β 1-2Man)	179	34.4	1.9 \pm 0.6	13.7	11.8
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc (LNT)	No binding	n.d.			

^a only one experiment by ITC

^b stoichiometry value fixed during fitting procedure.

Standard deviation lower than 20% were obtained for ITC experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0128190.t001

on SPR chip. This may be due to the bivalent character of this particular interaction that may be more easily established with the protein in solution than fixed on a chip. The binding of both terminal GlcNAc residues of the biantennary heptasaccharide was confirmed by comparing the stoichiometry of linear GlcNAc β 1-3Gal (five ligands per rPVL) and of biantennary heptasaccharide (two ligands per rPVL). The thermodynamics of binding was also different since the biantennary glycan is the only one to present a favorable entropy of binding (Table 1), that could be explained by the preorientation of the two GlcNAc residues in space.

Crystal structure of rPVL/disaccharide

rPVL was crystallized in complex with GlcNAc β 1-3Gal, the disaccharide that caps truncated polylactosamine N-glycans. The structure was solved at 1.95 Å resolution (S1 Table) and displayed the expected seven-bladed β -propeller fold (Fig 3). Two β -propellers are present in the asymmetric unit, but since they are very similar, only chain A is described below. The overall structure of the recombinant protein was very similar to the one described previously for wild-type PVL [13]. The main difference was the presence of an additional calcium ion since rPVL presents calcium in three loops. Clear electron density was observed for the GlcNAc β 1-3Gal in five binding sites while site 2 was occupied only by a GlcNAc residue (Fig 3A and 3B).

In each of the six binding sites, the terminal GlcNAc was in the same orientation as in the PVL/GlcNAc complex, and established the same network of hydrogen bonds. The galactose residue interacted in a shallow area near the GlcNAc binding site (Fig 3C). The interaction of the galactose residue were not very strong, and varied from one site to the other. Nevertheless, one common feature was the involvement of a water molecule that was present in all the sites and bridges the disaccharides (atoms O-acetyl of GlcNAc and O-4 of galactose) with backbone nitrogen atoms of the protein and with side chains of the conserved aromatic rings (Trp or Tyr) that stacked against the GlcNAc surface (Fig 3D). This water molecule played a role in PVL specificity since only the galactose residue presented an axial O-4 hydroxyl in an appropriate position to bind to it.

The limited interaction of the galactose residue with the PVL surface was in agreement with the limited change of affinity that was observed when comparing GlcNAc β 1-3Gal with GlcNAc ligands. Nevertheless, the orientation of the reducing ends on the protein ring was in perfect agreement with the strong binding to glycoconjugate surfaces. Indeed, all galactose reducing

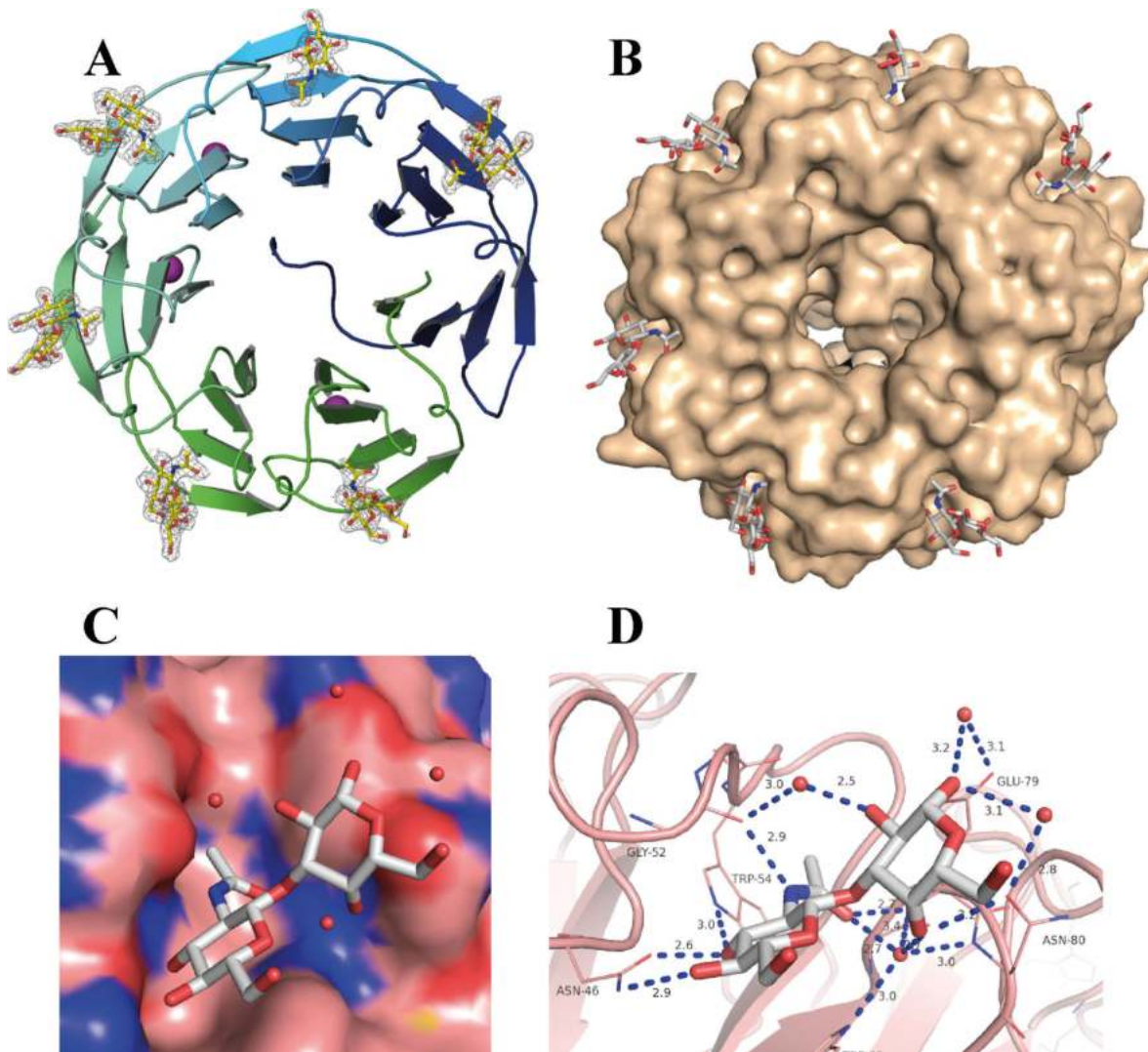


Fig 3. Crystal structure of rPVL/GlcNAcβ1-3Gal complex. A. β-propeller fold of rPVL with the peptide chain represented as ribbon colored from blue (N-terminal) to green (C-terminal). Disaccharides are represented as stick with 2mFo-DFc electron density maps contoured at 1σ ($0.4\text{ e}\text{\AA}^{-3}$). Calcium ions are represented as pink sphere. B. Same propeller with solvent accessible surface of the protein. C and D, details of the interaction in site 1 with disaccharide and water molecules. Hydrogen bonds are represented as dotted lines in panel D. All graphics have been prepared on chain A using the PyMol software (Schrödinger).

doi:10.1371/journal.pone.0128190.g003

ends pointed in the same direction, so that multiantennary glycans or glycoproteins could easily display a strong multivalency effect

Several GlcNAc-transferases are upregulated in lung carcinoma

As lung carcinoma have been previously shown to express high levels of GlcNAc-terminated glycans, we analyzed glycosyltransferase expression in transcriptomic data from 27 paired lung adenocarcinoma and adjacent “normal” tissues, available in the NCBI database [30]. We found statistically significant variations between cancer and healthy tissues for several glycosyltransferase genes (S2 Table). In particular, expression of the GlcNAc transferases *GcNT3* (one of the GlcNAcTs responsible for the synthesis of the core 2 O-glycan structures) and *B3GNT3* (responsible for the synthesis of the extended core 1 O-glycan structure) were found to be

markedly increased in the adenocarcinoma tissues. Those data are compatible with an increase of the GlcNAc terminated structures in lung cancer cells.

rPVL strongly binds to GlcNAc and Neu5Ac epitopes on human cancer cells

To examine the capacity of rPVL to recognize cells derived from human cancer tissues, lectin staining of several cell lines was performed and quantitatively analyzed using flow cytometry. rPVL strongly bound to cancer cells from various origins, including lung (Fig 4 and S4 Fig and S3 Table), breast, prostate, ovary and colon carcinomas, as well as melanomas.

In the presence of 100 mM GlcNAc, the binding of rPVL to the cell lines was strongly decreased, indicating specific involvement of the carbohydrate binding sites (Fig 4). Interestingly, complete inhibition was achieved only for the HBEC-3KT cell line which is an immortalized normal lung cell line, suggesting that rPVL's binding sites on this cell line may be of lower affinity than on the cancer cell lines. Since the glycan microarray showed some binding to Neu5Ac containing glycans, sialidase treatment was performed in order to determine if Neu5Ac-terminated cell surface glycans could be recognized by the lectin. As shown on Fig 4A, following sialidase treatment, cell staining was almost completely lost for the HBEC-3KT cell line, but much less so for other cell lines such as MCF-7 or A549. This result indicated that Neu5Ac-terminated glycans represent the major rPVL ligands on the HBEC-3KT normal lung cell line, whereas GlcNAc-terminated structures may be involved on the cancerous cell lines.

To confirm involvement of GlcNAc-terminated glycans on cancer cells such as A549 that showed little decrease of rPVL binding following sialidase treatment, cells were grown in the presence of 3F-Neu5Ac, an inhibitor of sialyltransferases. As a control for specificity, 2F-fucose, an inhibitor of fucosyltransferases was used (Fig 5A). The latter compound did not affect binding of either the Neu5Ac-specific lectin MAH or of rPVL. By contrast, 3F-Neu5Ac, decreased MAH binding by 75%, as expected, but also rPVL binding by 59%, indicating that a significant level of rPVL binding to these cells is due to recognition of Neu5Ac epitopes. Treatment of A549 cells by an exo β -D-N-acetyl—hexosaminidase also resulted in a major decrease of rPVL binding in a dose-dependent manner, indicating that GlcNAc-terminated glycans are also recognized by rPVL on this cell line. To further delineate which type of glycans are involved, A549 cells were treated with kifunensin, an inhibitor of N-glycan maturation, with benzyl-GalNAc, an inhibitor of O-glycosylation and with PPMP, an inhibitor of glycolipid synthesis (Fig 5B). Treatment by all three inhibitors resulted in a decrease of the MAH Neu5Ac-specific lectin, indicating that Neu5Ac termini are present on these three major types of glycans. Likewise, each inhibitor decreased rPVL binding to some extent. Yet, inhibition of rPVL binding was much clearer following benzyl-GalNAc treatment than following the other treatments. Collectively, these data indicate that both Neu5Ac and GlcNAc present on O-glycans constitute the major ligands for rPVL binding on the A549 lung carcinoma cell line.

Labeling of healthy tissues by rPVL

Labeling of healthy tissues by biotinylated rPVL was performed in the presence of either fucose or GlcNAc to delineate specific binding. Most tissues were either not stained or only weakly stained by the labeled lectin. When present, staining was mainly restricted to epithelial cells or occasionally to some macrophages in the lung parenchyma and was inhibited by the presence of 100 mM GlcNAc (Fig 6 and S4 Table). However, a strong binding was observed on the glandular compartment of the stomach and small intestine. In this case, only a partial inhibition could be obtained in the presence 100 mM GlcNAc, consistent with the presence of mucin presenting terminal α -linked GlcNAc in these tissues, as previously described [5, 31].

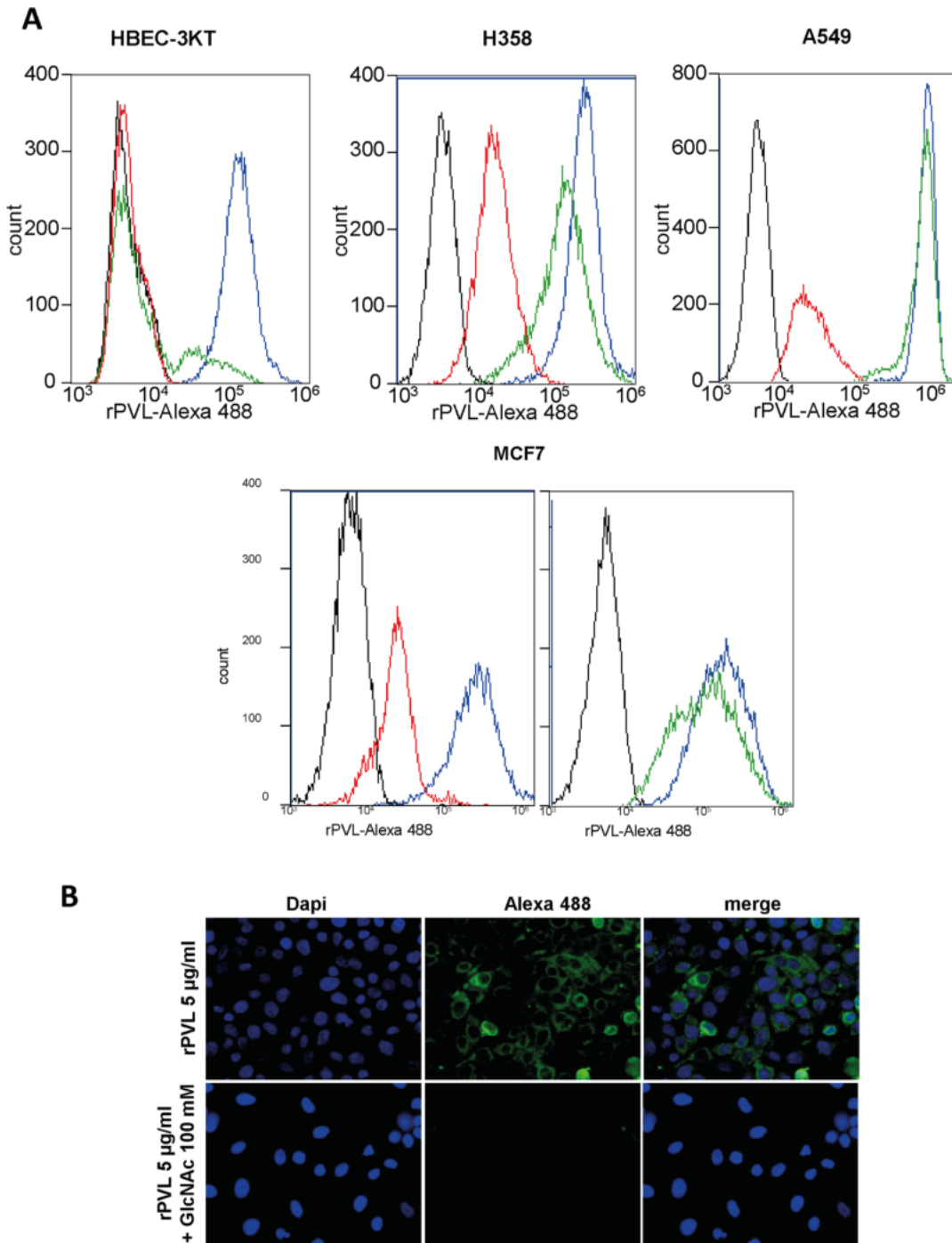


Fig 4. PVL binding of tumor cell lines. A. Flow cytometry histograms show rPVL-Alexa 488 binding to a lung immortalized cell line (HBEC-3KT), two lung tumor cell lines (H358 and A549) as well as on a breast tumor cell line (MCF-7). The x axis indicates fluorescence intensity. The y axis indicates cell number. Black line: untreated control cells; blue line rPVL-Alexa 488 $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ for 30 min; red line: rPVL-alexa 488 $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ in the presence of GlcNAc 100 mM; green line: rPVL-Alexa 488 $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ after sialidase pretreatment. B. Microscopy images of A549 NSCLC cells treated for 30 min at 37°C with $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ rPVL labeled with Alexa 488 in the presence or absence of 100 mM GlcNAc. Green channel shows rPVL-Alexa 488, blue channel shows nuclei labeled with DAPI staining.

doi:10.1371/journal.pone.0128190.g004

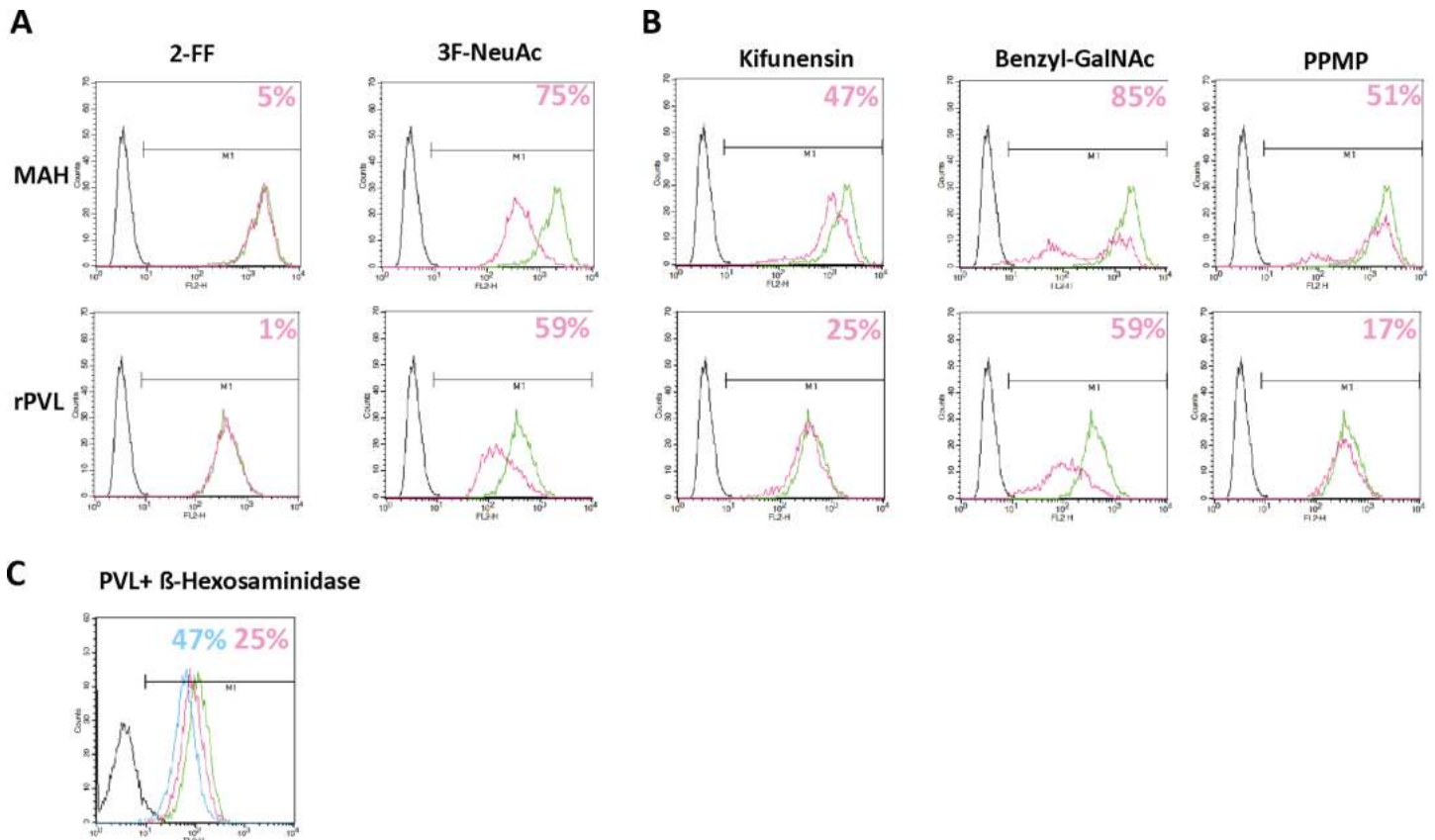


Fig 5. PVL binding in the presence of glycosylation inhibitors or after treatment with glycosidases. A. Biotinylated rPVL ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) or MAH ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) were incubated with A549 cells grown for 4 days in presence of DMSO (green line) or of either $400 \mu\text{M}$ 2-Fluoro-Fucose or $100 \mu\text{M}$ Fluoro-Neu5Ac (pink line). Lectin binding was revealed by PE conjugated Streptavidin. Percentage of inhibitions are indicated according to the mean fluorescence intensities. B. Similar experiment than in A but with A549 cells grown in the presence of $5 \mu\text{M}$ Kifunensine for 4 days or in the presence of either 6mM Benzyl-GalNAc or $10 \mu\text{M}$ PPMP for 48h. C. Similar experiment than in A and B but with cells treated with 2.5U (pink line) or 12.5U β -D-N-acetyl-hexosaminidase (blue line).

doi:10.1371/journal.pone.0128190.g005

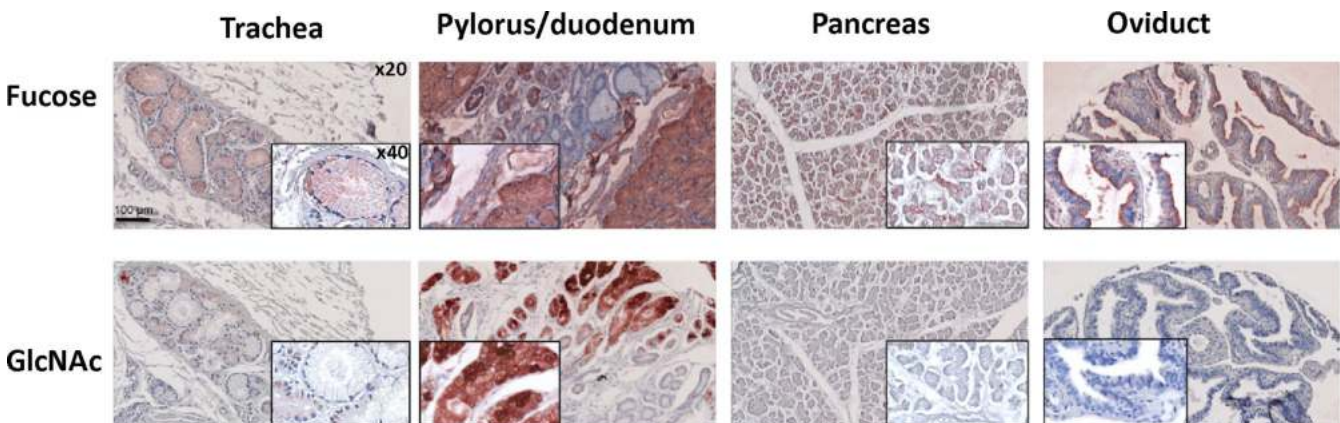


Fig 6. PVL staining of healthy tissues. A tissue microarray (TMA) comprising healthy tissues from respiratory, digestive and genital origin was stained with $0.7 \mu\text{g ml}^{-1}$ rPVL-biot in presence of 0.1M Fucose or 0.1M GlcNAc followed by Streptavidin-HRP. AEC was used as a peroxidase substrate to reveal the PVL staining and counterstaining was performed using hematoxylin. Slides were imaged using a NanoZoomer slide scanner with a 20x magnification. 40x digital magnifications are also shown as insets.

doi:10.1371/journal.pone.0128190.g006

Labeling of cancer tissues by rPVL

Since rPVL labeled various cancer cell lines, a histochemical staining of healthy and cancer tissues was performed. As shown on Fig 7A a strong labeling, inhibited in the presence of GlcNAc, was observed on colon carcinomas, whilst a weak labeling was only found on the adjacent normal tissue. To determine if the staining of carcinoma cells was dependent on either Neu5Ac or GlcNAc-terminated glycans, tissue sections of canine breast carcinoma were treated with either sialidase or exo- β -D-N-acetyl-hexosaminidase prior to incubation with the biotinylated lectin (Fig 7B). Canine breast carcinoma sections were used since they were more easily available than human breast carcinoma sections and since the tumors are remarkably homologous to their human counterparts [32]. Both enzyme treatments led to a clear reduction of the staining, indicating that similar to what was observed on cell lines, both Neu5Ac and GlcNAc were involved in the lectin staining.

We next analyzed staining of various types of lung and breast carcinomas with rPVL. A clear labeling was observed on a proportion of lung squamous cell carcinomas, and lung adenocarcinomas (Fig 8 and S5 Fig). The staining of cancer cells with rPVL was systematically higher than that of the normal surrounding cells in each positive tumor sample. By contrast, none of the tested bronchioalveolar, mucoepidermoid, large cell or small cell carcinomas that we tested was labeled, suggesting that the lectin could distinguish between distinct types of lung carcinomas.

When biotinylated rPVL was applied to breast tumor sections (Fig 9), the majority of samples appeared positive, although labeling intensity ranged from moderate to very strong. By contrast, in normal breast tissue adjacent to the tumors, only weak staining at the apical surface of canular epithelial cells could be occasionally observed. With the limited number of samples available, no significant difference in staining intensity could be observed between tumors with different HER2, hormone receptors or p53 status.

Discussion and Conclusion

The recombinant form of PVL has been produced and characterized, and its binding specificity is different from that of other GlcNAc-binding lectins according to the specificity patterns available from the Consortium for Functional Glycomics. Wheat germ agglutinin (WGA) and tomato lectin (SLT) recognize terminal GlcNAc, but also bind to internal GlcNAc and to chitooligosaccharides. The legume lectins from *Ulex europeus* (UEA-II) and *Griffonia (Bandereia) simplicifolia* (GSL-II) display high specificity to truncated poly lactosamine-type N-glycans only. F17G, a lectin present on the pili of some *E. coli* strains, has also recently been shown to specifically recognize terminal GlcNAc β 1-3Gal motifs, although with a rather low affinity [33]. The lectin with the closest specificity pattern to PVL is AAL-2 from the mushroom *Agrocybe aegerita*. This related protein (60% identity) has also been produced recombinantly and demonstrated to bind to hepatoma cells and to induce apoptosis, although no information was provided on the binding event. [14].

The present work opens the route for further investigations. Although each of the six binding sites of PVL is highly specific for terminal GlcNAc, the multivalent lectin displays weak avidity for Neu5Ac-decorated surfaces that may result in weak non-specific labeling of some tissues. Since we aim at targeting specifically GlcNAc-terminated residues, we demonstrated that the use of sialidase treatment and/or competition with low amounts of GlcNAc suppressed the non-specific binding. Nevertheless, the structural knowledge of the binding sites should allow for engineering of modified lectins with stronger selectivity.

Because of its capacity to bind to nonreducing terminal GlcNAc, rPVL is a marker of interest for cancer cells, as demonstrated here. However, rPVL could also have diagnostic applications for other diseases. For example, an elderly dementia, distinct from Alzheimer disease, is

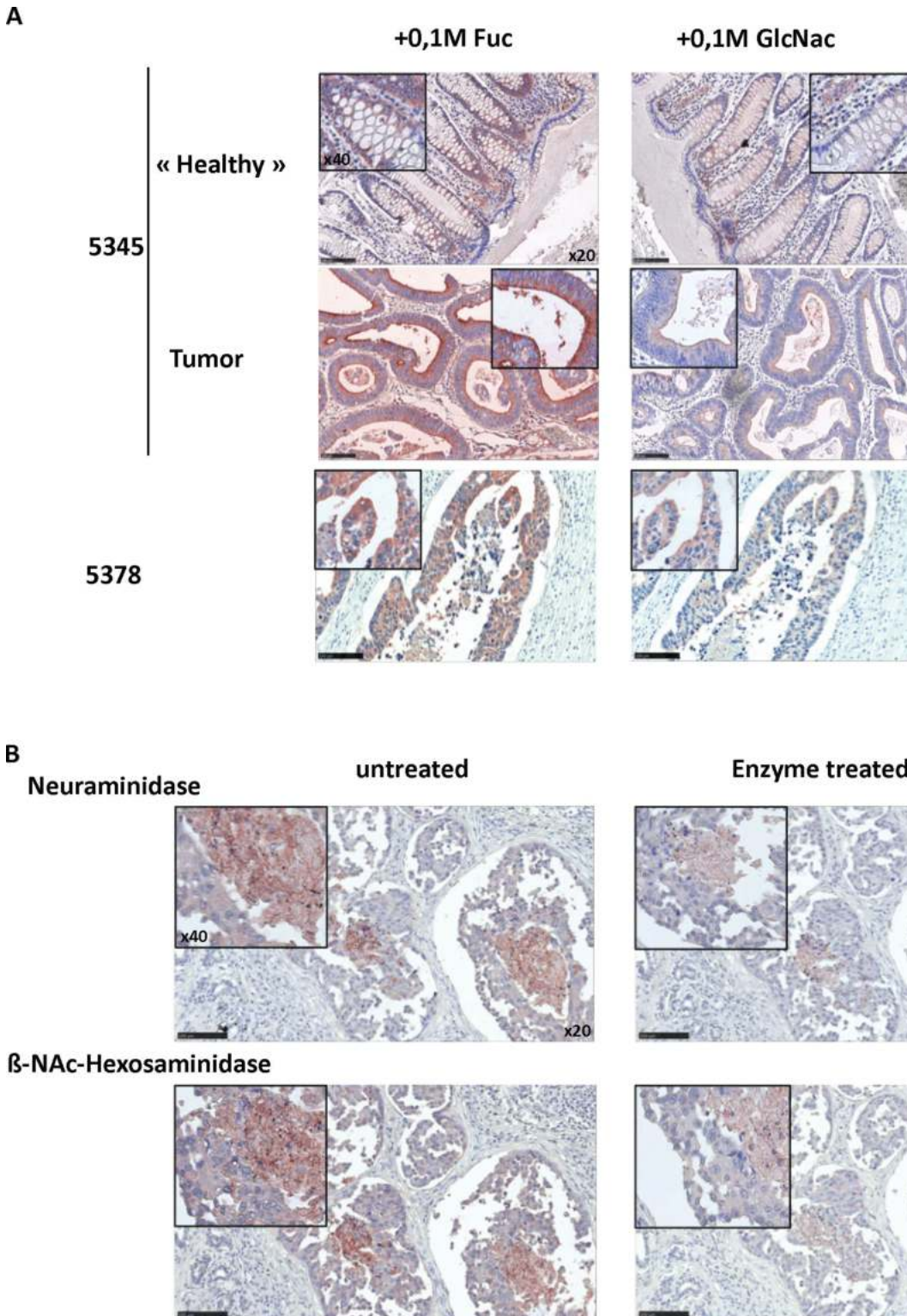


Fig 7. PVL binds to tumor tissue with a mixed Neu5Ac and GlcNAc specificity. A. Sections from ethanol-fixed colon carcinoma and adjacent healthy tissue from 2 different patients (# 5345 and 5378) were stained with $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ rPVL-biot in presence of 0.1 M Fucose or 0.1 M GlcNAc followed by Streptavidin-HRP. AEC was used as a peroxidase substrate to reveal the rPVL staining and counterstaining was performed using hematoxylin. Slides were imaged using a NanoZoomer slide scanner with a 20x magnification. 40x digital magnifications are also shown as insets. B. Canine breast tumor sections (formalin fixed) were treated or not with glycosidases and then stained with $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ rPVL-biot and imaged as in A.

doi:10.1371/journal.pone.0128190.g007

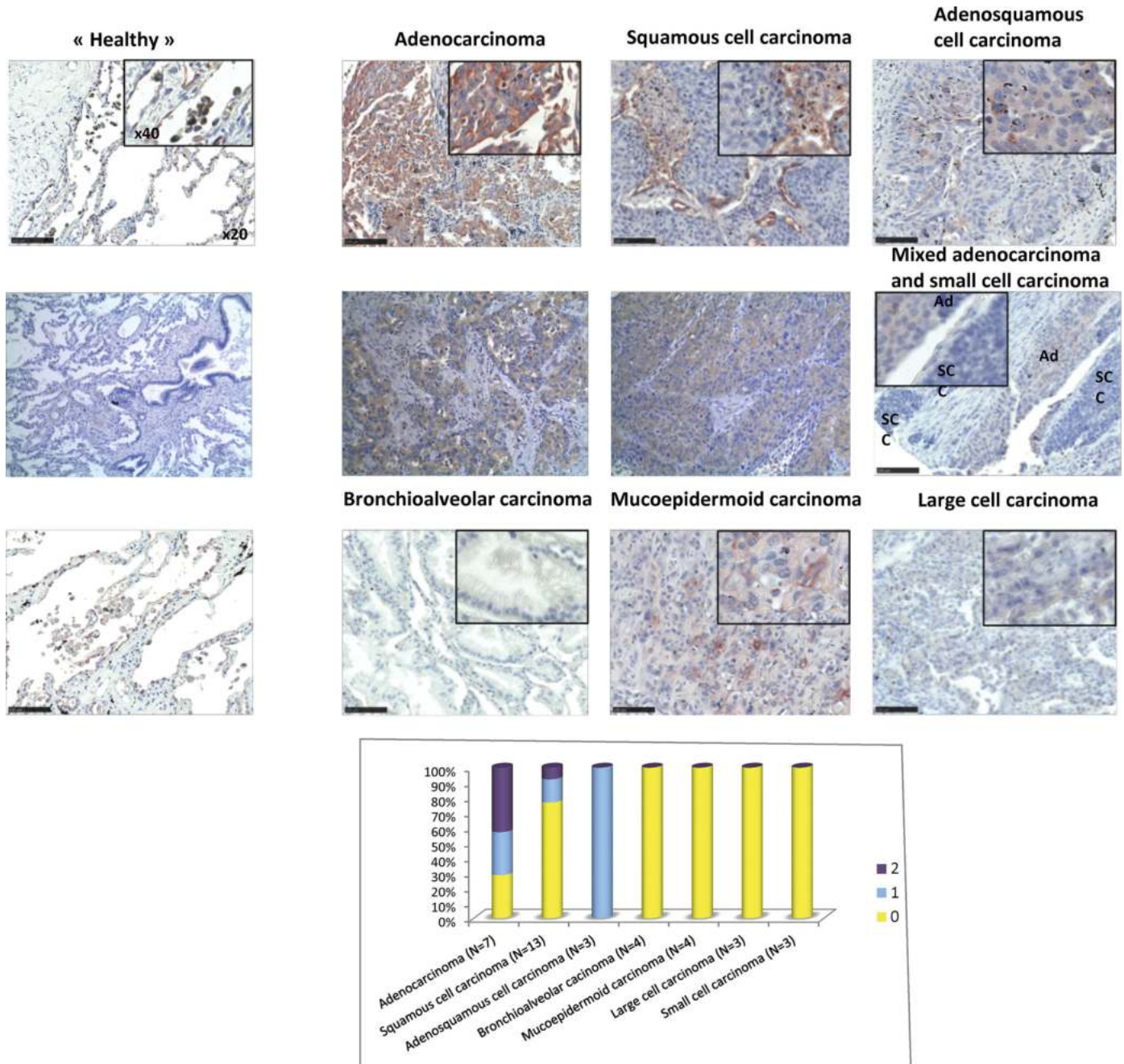


Fig 8. PVL staining of Lung tumoral tissues. A. A lung tumor TMA (formalin-fixed) was stained with $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ rPVL-biot in presence of 0.1 M fucose followed by Streptavidin-HRP. AEC was used as a peroxidase substrate to reveal the PVL staining and counterstaining was performed using hematoxylin. Slides were imaged using a NanoZoomer slide scanner with a 20x magnification. 40x digital magnifications are also shown as insets. (Ad = adenocarcinoma; SCC = small cell carcinoma) Representative images of the different histological tumor types are shown B. A score from 0 to 3 was attributed to each tumor, based on the percentage of tumor cell stained and the color intensity and the staining level distribution according to tumor histological subtypes has been represented as an histogram.

doi:10.1371/journal.pone.0128190.g008

related to the presence of an agalacto-N-glycan on one isoform of transferrin [34]. Also agalacto-IgGs are present in the serum of patients with rheumatoid arthritis [35] and were previously detected with PVL purified from fungi [36, 37] or by use of glycosyltransferase assays

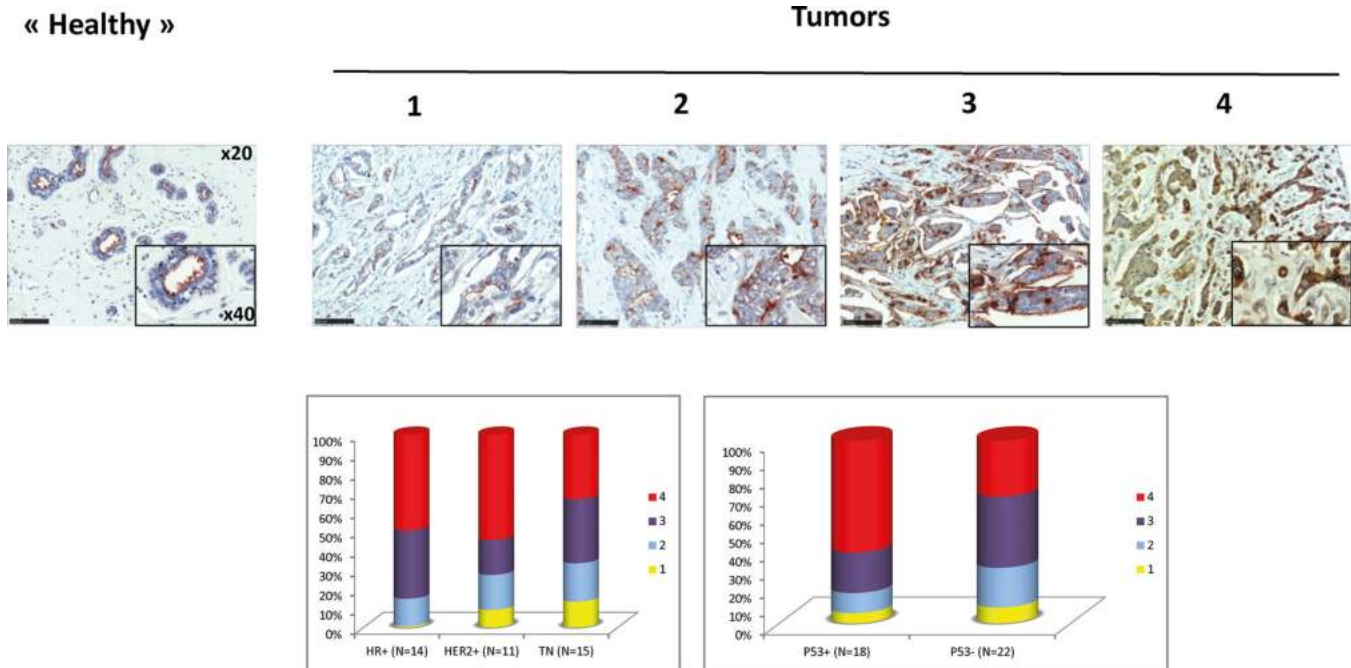


Fig 9. PVL staining of breast tumoral tissues. A. A Breast tumor TMA (formalin-fixed) was stained and imaged as described in Fig 8A. Tumors were all positive with a vast majority of cancer cells stained. Labeling intensity was estimated on a scale ranging from 1 to 4. Representative examples of tumors of each staining level are shown. B. Staining level distributions according to tumor molecular characteristics. (HR = Hormone Receptors, TN = Triple Negative).

doi:10.1371/journal.pone.0128190.g009

[38]. Some fast replicating viruses such as Ebola virus [39] and SARS coronavirus [40] were also demonstrated to carry truncated N-glycans with exposed GlcNAc residues.

It was previously proposed that the truncated N-glycans observed on Ebola virus may be due to their fast replication resulting in overloading of the processing machinery [39]. Such a hypothesis could also stand for anarchically developing cancer cells for which glycosylation could be poorly processed. However, we could demonstrate that the alterations of surface glycosylation on cancer cells are correlated to modifications of glycosyltransferase expression levels (S2 Table). Specific glycosylation changes may therefore occur in these cells and further work is needed to investigate the mechanisms underlying such changes of glycosylation associated with cancer.

As demonstrated in the present work, rPVL histochemical staining could be a powerful tool to help the pathological analysis of human non-small cell lung cancers, as well as breast and colon carcinomas. However, this will require further validation on larger cohorts of patients. More particularly, larger scale analysis would permit to establish correlation with prognosis in different subgroups of tumors. Other lectins were proven to be of interest, such as the GalNAc β 1-3/4GlcNAc specific lectin from *Wisteria japonica* seeds that binds strongly to lung squamous cell carcinoma [41]. Therefore, the further development of lectin arrays is very promising for a better detection of glycan alterations for diagnostic purposes.

Supporting Information

S1 Fig. ¹H NMR of heptasaccharide azide 2. ¹H-NMR (360 MHz, D₂O): δ = 5.03 (d, $J_{1,2}$ < 1 Hz, 1H, H-1⁴), 4.83 (d, $J_{1,2}$ < 1 Hz, 1H, H-1⁴), 4.68–4.64 (m, 2H, H-1¹, H-1³), 4.53 (d, $J_{1,2}$ = 7.7 Hz, 1H, H-1²), 4.47 (d, $J_{1,2}$ = 8.3 Hz, 2H, H-1⁵, H-1⁵), 4.18–4.15 (m, 1H, H-2³), 4.12–4.09

(m, 1H, H-2⁴), 4.04–4.01 (m, 1H, H-2⁴), 1.99 (s, 3H, NAc), 1.97 (s, 9H, NAc).
(PDF)

S2 Fig. Thermal stability of rPVL. (A) Evolution of fluorescence of Sypro Orange binding to denaturing rPVL at 0.5 mg ml⁻¹ and 0.1 m. ⁻¹ (*) with glycan ligands. (B) Denaturation curve derivatives. RFU: Relative Fluorescence Units.

(PDF)

S3 Fig. ITC data. Raw ITC data (top) obtained by injections of oligosaccharides in a solution of rPVL and the respective integrated titration curve (bottom). Left, 7 mM of GlcNAcβ1-3Gal into 0.06 mM of rPVL. Right, 9 mM of Heptasaccharide in 0.1 mM of rPVL.

(PDF)

S4 Fig. Microscopy images of H358 NSCLC cells untreated or treated for 30 min at 37°C with increasing concentrations of rPVL labelled with Alexa 488. Green channel shows rPVL-Alexa 488, blue channel shows nuclei labelled with DAPI staining.

(PDF)

S5 Fig. rPVL labelled with biotin with paraffin-embedded tissue sections of normal human lung (A and B) or human lung adenocarcinoma (C-F), using the streptavidin-peroxidase technique. Sections are counterstained with hematoxylin. Left column (A, C, and E): control without rPVL. Right column (B, D, and F): 5 μg ml⁻¹ rPVL-treated sections. Original magnifications: x4 (A, C, D); x20 (B, E, F).

(PDF)

S1 Table. Data Collection and Refinement Statistics for rPVL- GlcNAcβ1-3Gal complex structure.

(PDF)

S2 Table. Expression of glycosyltransferases in lung cancer. Glycosyltransferases expression levels were extracted from a transcriptome analysis of 27 lung adenocarcinoma and adjacent normal tissues, available in the NCBI database (Su L et al., *BMC Genomics* 2007; GEO accession: GSE 7670), thanks to the BioGPS programme (<http://biogps.org>). A) Summary of the glycosyltransferase expression trends in tumor versus normal tissues. A 2-sided paired t-Test was used to check for statistical difference between the normal and cancer tissue expression (note that the given p-values have not been corrected for multiple testing). B) Raw data. The left column corresponds to the patient identification numbers as recorded in the dataset. Data for B3GNT 6, 7, 8, 9 and ST3GAL 3 were not available in this dataset. Note that B3GalT3 mainly shows a GalNAc transferase activity in the Gb4Cer globoside synthesis (P antigen).

(PDF)

S3 Table. rPVL binding on various cancer cells. Binding of rPVL was determined by flow cytometry on cancer cell lines from various histological origins as described in Material and Methods. ND: not determined.

(PDF)

S4 Table. PVL staining of healthy tissues. A TMA prepared with tissues from various origins coming from 10 different donors was stained with rPVL-biot at 0,7 μg/ml as such or in presence of 0,1 M of fucose or N-acetylglucosamine. Digestive tissues showed the strongest staining; some of it could not be completely removed even in presence of an excess of free GlcNAc.

(PDF)

Acknowledgments

The glycan array resources were provided by the Consortium for Functional Glycomics (GM62116). Crystal data collection was performed at the European Synchrotron Radiation Facility and the authors are grateful for access and technical support to beamline BM30A (proposal 20130700). The authors acknowledge Emilie Gillon for excellent technical assistance for ITC measurements. The authors are grateful to the CHEM-Symbiose core facility of the University of Nantes for synthesis of the 2FF and 3F-Neu5Ac compounds and to the Cellular and Tissular Imaging core facility of the Nantes University (MicroPiCell). The tissues from canine breast tumors were obtained from "laboratory of animal histopathology" of the Nantes Veterinary School (ONIRIS) and the healthy human tissues were obtained thanks to Dr. J. Bara, Villejuif, France.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CU AV JLC JLP BB AI. Performed the experiments: AA M. Beldjoudi AB IB SL AV. Analyzed the data: AA M. Beldjoudi AB AH M. Bouras SL AV JLP BB AI. Contributed reagents/materials/analysis tools: IB CU. Wrote the paper: CU JLP BB AI.

References

1. Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation—potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 477–488. PMID: [15931257](#)
2. Hakomori S. Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res.* 1996; 56: 5309–5318. PMID: [8968075](#)
3. Svarovsky SA, Joshi L. Cancer glycan biomarkers and their detection – past, present and future. *Analyt Meth.* 2014; 6: 3918–3936
4. Newsom-Davis TE, Wang D, Steinman L, Chen PF, Wang LX, Simon AK, et al. Enhanced immune recognition of cryptic glycan markers in human tumors. *Cancer Res.* 2009; 69: 2018–2025. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-08-3589](#) PMID: [19223535](#)
5. Ishihara K, Kurihara M, Goso Y, Urata T, Ota H, Katsuyama T, et al. Peripheral alpha-linked N-acetylglucosamine on the carbohydrate moiety of mucin derived from mammalian gastric gland mucous cells: epitope recognized by a newly characterized monoclonal antibody. *Biochem J.* 1996; 318: 409–416. PMID: [8809027](#)
6. Hu J, Stults CL, Holmes EH, Macher BA. Structural characterization of intermediates in the biosynthetic pathway of neolacto glycosphingolipids: differential expression in human leukaemia cells. *Glycobiology.* 1994; 4: 251–257. PMID: [7949652](#)
7. Kyselova Z, Mechref Y, Al Bataineh MM, Dobrolecki LE, Hickey RJ, Vinson J, et al. Alterations in the serum glycome due to metastatic prostate cancer. *J Proteome Res.* 2007; 6: 1822–1832. PMID: [17432893](#)
8. Meichenin M, Rocher J, Galanina O, Bovin N, Nifantev N, Sherman A, et al. Tk, a new colon tumor-associated antigen resulting from altered O-glycosylation. *Cancer Res.* 2000; 60: 5499–5507. PMID: [11034094](#)
9. Satomaa T, Heiskanen A, Leonardsson I, Angstrom J, Olonen A, Blomqvist M, et al. Analysis of the human cancer glycome identifies a novel group of tumor-associated N-acetylglucosamine glycan antigens. *Cancer Res.* 2009; 69: 5811–5819. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-08-0289](#) PMID: [19584298](#)
10. Hsu KL, Mahal LK. Sweet tasting chips: microarray-based analysis of glycans. *Curr Opin Chem Biol.* 2009; 13: 427–432. doi: [10.1016/j.cbpa.2009.07.013](#) PMID: [19716334](#)
11. Oliveira C, Teixeira JA, Domingues L. Recombinant lectins: an array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools. *Crit Rev Biotechnol.* 2013; 33: 66–80. doi: [10.3109/07388551.2012.670614](#) PMID: [22530774](#)
12. Kochibe N, Matta KL. Purification and properties of a N-acetylglucosamine-specific lectin from *Psathyrella velutina* mushroom. *J Biol Chem.* 1989; 264: 173–177. PMID: [2909513](#)
13. Cioci G, Mitchell EP, Chazalet V, Debray H, Oscarson S, Lahmann M, et al. b-Propeller crystal structure of *Psathyrella velutina* lectin: An integrin-like fungal protein interacting with monosaccharides and calcium. *J Mol Biol.* 2006; 357: 1575–1591. PMID: [16497330](#)

14. Jiang S, Chen Y, Wang M, Yin Y, Pan Y, Gu B, et al. A novel lectin from *Agrocybe aegerita* shows high binding selectivity for terminal N-acetylglucosamine. *Biochem J.* 2012; 443: 369–378. doi: [10.1042/BJ20112061](https://doi.org/10.1042/BJ20112061) PMID: [22268569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22268569/)
15. Seko A, Koketsu M, Nishizono M, Enoki Y, Ibrahim HR, Juneja LR, et al. Occurrence of a sialylglycopeptide and free sialylglycans in hen's egg yolk. *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1335: 23–32. PMID: [9133639](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9133639/)
16. Ullmann V, Radisch M, Boos I, Freund J, Pohner C, Schwarzinger S, et al. Convergent solid-phase synthesis of N-glycopeptides facilitated by pseudoprolines at consensus-sequence Ser/Thr residues. *Angew Chem Int Ed.* 2012; 51: 11566–11570. doi: [10.1002/anie.201204272](https://doi.org/10.1002/anie.201204272) PMID: [22945377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22945377/)
17. Roth M, Carpentier P, Kaikati O, Joly J, Charraut P, Pirocchi M, et al. FIP: a highly automated beamline for multiwavelength anomalous diffraction experiments. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr.* 2002; 58: 805–814. PMID: [11976492](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11976492/)
18. Kabsch W. Xds. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr.* 2010; 66: 125–132.
19. Collaborative Computational Project Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr.* 1994; 50: 760–763.
20. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr.* 2007; 40: 658–674. PMID: [19461840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19461840/)
21. Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr.* 2011; 67: 355–367.
22. Emsley P, Lohkamp B, Scott W, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2010; 66: 486–501. doi: [10.1107/S0907444910007493](https://doi.org/10.1107/S0907444910007493) PMID: [20383002](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20383002/)
23. Chen VB, Arendall WB 3rd, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr.* 2010; 66: 12–21.
24. Rillahan CD, Antonopoulos A, Lefort CT, Sonon R, Azadi P, Ley K, et al. Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome. *Nat Chem Biol.* 2012; 8: 661–668. doi: [10.1038/nchembio.999](https://doi.org/10.1038/nchembio.999) PMID: [22683610](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22683610/)
25. Audfray A, Claudinon J, Abounit S, Ruvoën-Clouet N, Larson G, Smith DF, et al. The fucose-binding lectin from opportunistic pathogen *Burkholderia ambifaria* binds to both plant and human oligosaccharidic epitopes. *J Biol Chem.* 2012; 287: 4335–4347. doi: [10.1074/jbc.M111.314831](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.314831) PMID: [22170069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22170069/)
26. Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaidye B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacois G, et al. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterology.* 2002; 122: 1967–1977. PMID: [12055602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12055602/)
27. Dennis JW, Granovsky M, Warren CE. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1473: 21–34. PMID: [10580127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10580127/)
28. Nakamura N, Ota H, Katsuyama T, Akamatsu T, Ishihara K, Kurihara M, et al. Histochemical reactivity of normal, metaplastic, and neoplastic tissues to alpha-linked N-acetylglucosamine residue-specific monoclonal antibody HIK1083. *J Histochem Cytochem.* 1998; 46: 793–801. PMID: [9632738](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9632738/)
29. Ueda H, Matsumoto H, Takahashi N, Ogawa H. *Psathyrella velutina* mushroom lectin exhibits high affinity toward sialoglycoproteins possessing terminal N-acetylneuraminic acid a2-3-linked to penultimate galactose residues of trisialyl N-glycans. *J Biol Chem.* 2002; 277: 24916–24925. PMID: [11986305](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11986305/)
30. Su L-J, Chang C-W, Wu Y-C, Chen K-C, Lin C-J, Liang S-C, et al. Selection of DDX5 as a novel internal control for Q-RT-PCR from microarray data using a block bootstrap re-sampling scheme. *BMC Genomics.* 2007; 8: 140. PMID: [17540040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17540040/)
31. Hanisch FG, Bonar D, Schloerer N, Schrotten H. Human trefoil factor 2 is a lectin that binds alpha-GlcNAc-capped mucin glycans with antibiotic activity against *Helicobacter pylori*. *J Biol Chem.* 2014; 289: 27363–27375. doi: [10.1074/jbc.M114.597757](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.597757) PMID: [25124036](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25124036/)
32. Liu D, Xiong H, Ellis AE, Northrup NC, Rodriguez CO Jr., O'Regan RM, et al. Molecular homology and difference between spontaneous canine mammary cancer and human breast cancer. *Cancer Res.* 2014; 74: 5045–5056. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-14-0392](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0392) PMID: [25082814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25082814/)
33. Lonardi E, Moonens K, Buts L, de Boer AR, Olsson JD, Weiss MS, et al. Structural sampling of glycan interaction profiles reveals mucosal receptors for fimbrial adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biology.* 2013; 2: 894–917. doi: [10.3390/biology2030894](https://doi.org/10.3390/biology2030894) PMID: [24833052](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24833052/)
34. Futakawa S, Nara K, Miyajima M, Kuno A, Ito H, Kaji H, et al. A unique N-glycan on human transferrin in CSF: a possible biomarker for iNPH. *Neurobiol Aging.* 2012; 33: 1807–1815. doi: [10.1016/j.neurobiolaging.2011.02.023](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.02.023) PMID: [21459485](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21459485/)

35. Parekh RB, Dwek RA, Sutton BJ, Fernandes DL, Leung A, Stanworth D, et al. Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG. *Nature*. 1985; 316: 452–457. PMID: [3927174](#)
36. Liljeblad M, Lundblad A, Pahlsson P. Analysis of agalacto-IgG in rheumatoid arthritis using surface plasmon resonance. *Glycoconj J*. 2000; 17: 323–329. PMID: [11261841](#)
37. Tsuchiya N, Endo T, Matsuta K, Yoshinoya S, Takeuchi F, Nagano Y, et al. Detection of glycosylation abnormality in rheumatoid IgG using *N*-acetylglucosamine-specific *Psathyrella velutina* lectin. *J Immunol*. 1993; 151: 1137–1146. PMID: [8335895](#)
38. Boeggeman E, Ramakrishnan B, Kilgore C, Khidekel N, Hsieh-Wilson LC, Simpson JT, et al. Direct identification of nonreducing GlcNAc residues on N-glycans of glycoproteins using a novel chemoenzymatic method. *Bioconjug Chem*. 2007; 18: 806–814. PMID: [17370997](#)
39. Powlesland AS, Fisch T, Taylor ME, Smith DF, Tissot B, Dell A, et al. A novel mechanism for LSECtin binding to Ebola virus surface glycoprotein through truncated glycans. *J Biol Chem*. 2008; 283: 593–602. PMID: [17984090](#)
40. Krokhin O, Li Y, Andonov A, Feldmann H, Flick R, Jones S, et al. Mass spectrometric characterization of proteins from the SARS virus: a preliminary report. *Mol Cell Proteomics*. 2003; 2: 346–356. PMID: [12775768](#)
41. Soga K, Teruya F, Tateno H, Hirabayashi J, Yamamoto K. Terminal *N*-acetylgalactosamine-specific leguminous lectin from *Wisteria japonica* as a probe for human lung squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013; 8: e83886. doi: [10.1371/journal.pone.0083886](#) PMID: [24349556](#)

Résumé.

Le cancer du poumon est classé en deux grands types : cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) à 85 % et le cancer du poumon à petites cellules (SCLC). Les thérapies combinées qui inhibent les différentes voies de signalisation ont le potentiel d'être plus efficaces que l'inhibition d'une seule voie et d'éviter la résistance tumorale.

Dans les carcinomes pulmonaires humains, de faibles taux de E2F1 contribuent à la carcinogénèse, on peut observer une diminution de la bêta 1,4 galactosylation et donc une surexpression de N-Acétyleglucosamine terminal.

Les glycoconjugués présents à la surface cellulaire présentent des altérations de leurs structures dans les maladies chroniques et des épitopes oligosaccharidiques distincts ont été associés au cancer. Parmi eux, les glycanes tronqués, qui présentent des résidus terminaux non réducteurs de β -N-acétyleglucosamine (GlcNAc) et qui sont rares dans les tissus sains.

Une lectine liant le GlcNAc, a été produite dans une culture bactérienne d'Escherichia coli, à partir du champignon Psathyrella velutina (PVL). Le marquage avec rPVL est spécifique du tissu cancéreux et un faible marquage, ou nul, est observé pour les tissus sains. Dans le carcinome pulmonaire, une délimitation claire a pu être observée entre les régions cancéreuses et les tissus sains environnants.

PVL est donc un outil utile pour le marquage des agalacto-glycanes dans le cancer du poumon, avec un potentiel comme vecteur de médicaments anticancéreux.

Mots-clés : Cancer broncho-pulmonaire, E2F1, Lectine, rPVL, N-Acétyleglucosamine.

Abstract.

Lung cancer is classified into two main types: 85% non-small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC). Combination therapies that inhibit different signaling pathways have the potential to be more effective than inhibiting a single pathway and to avoid tumor resistance.

In human pulmonary carcinomas, low levels of E2F1 contribute to carcinogenesis, we can observe a decrease in beta 1,4 galactosylation and therefore an overexpression of N-Acetylglucosamine terminal.

The glycoconjugates present on the cell surface show structural changes in chronic diseases and distinct oligosaccharide epitopes have been associated with cancer. Among them, truncated glycans, which have non-reducing terminal residues of β -N-acetylglucosamine (GlcNAc) and which are rare in healthy tissues.

A GlcNAc-binding lectin was produced in a bacterial culture of Escherichia coli from the fungus Psathyrella velutina (PVL). Labeling with rPVL is specific for cancerous tissue and little or no labeling is observed for healthy tissue. In pulmonary carcinoma, a clear delineation has been observed between the cancerous regions and the surrounding healthy tissue.

PVL is therefore a useful tool for labeling agalactoglycans in lung cancer, with potential as a vector for anticancer drugs.

Keywords : Broncho-pulmonary cancer, E2F1, Lectin, rPVL, N-Acetylglucosamine.

ملخص.

يصنف سرطان الرئة إلى نوعين رئيسيين: 85% سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة (NSCLC) وسرطان الرئة ذي الخلايا الصغيرة (SCLC). العلاجات المركبة التي تثبط مسارات الإشارات المختلفة من المحتمل أن تكون أكثر فعالية من تثبيط مسار واحد ولتجنب مقاومة الأورام.

في الأورام السرطانية البشرية، تساهم المستويات المنخفضة من E2F1 في التسرطن، يمكننا ملاحظة انخفاض في بيتا 1,4 galactosylation وبالتالي زيادة التعبير عن محطة N-Acetylglucosamine.

توضح الجلوكوكوجينات الموجودة على سطح الخلية تغيرات هيكلية في الأمراض المزمنة وقد ارتبطت حُصَيَّبات السكريات القليلة المميزة بالسرطان. من بينها، glycans مبتورة، والتي تحتوي على بقايا طرفية غير مختزلة لـ β -N-acetylglucosamine (GlcNAc) وهي نادرة في الأنسجة السليمة.

تم إنتاج الليكتين المرتبط بـ GlcNAc في مزرعة بكتيرية من الإشريكية القولونية من الفطر Psathyrella velutina (PVL). يعد وضع العلامات باستخدام الـ rPVL خاصًا بالأنسجة السرطانية ولا يلاحظ سوى القليل من العلامات على الأنسجة السليمة. في سرطان الرئة، لوحظ رسم واضح بين المناطق السرطانية والأنسجة الصحية المحيطة بها.

وبالتالي، يعد PVL أداة مفيدة لتمييز agalactoglycans في سرطان الرئة، مع احتمال كونها ناقلات للأدوية المضادة للسرطان.

الكلمات الرئيسية : سرطان القصبات الرئوية، E2F1، Lectin، rPVL، N-Acetylglucosamine